

## **CURSO “TRANSPORTE IÓNICO EN LA CÉLULA: ASPECTOS MOLECULARES Y METODOLÓGICOS”**

### **Profesorado:**

Francisco Fernández Belda (fbelda@um.es; 968-364763) (Prof. responsable)  
José A. Teruel Puche (teruel@um.es; 968-364772)  
Fernando Soler Pardo (fsoler@um.es; 968-364771)  
María Senena Corbalán García (senena@um.es; 968-364775)

### **Créditos y distribución:** 5 créditos ECTS (125 horas)

33 horas teóricas      12 horas prácticas      80 horas de trabajo personal

### **Objetivos pedagógicos:**

Proporcionar una visión estructural y funcional del transporte iónico celular. Conocer los principios básicos del transporte. Analizar estrategias para aislar y caracterizar transportadores de membrana. Estudiar técnicas experimentales para medir el transporte iónico. Conocer la estructura y función de algunos transportadores y su relación con procesos patológicos.

### **Programa Teórico:**

I. Transporte iónico a través de membranas.

Introducción. Transporte de tipo poro. Transporte de tipo portador. Aspectos termodinámicos del transporte. Estructuras y modelos de proteínas transportadoras. Relación entre estructura y especificidad de transporte. Regulación de transportadores. Estrategias para identificar, aislar y caracterizar un transportador de membrana. Criterios cinéticos. Uso de inhibidores. Aislamiento de proteínas transportadoras.

II. Cinética del transporte en biomembranas

Procedimientos experimentales. Intercambio en equilibrio. Procedimiento trans-cero. Procedimiento trans-infinito. Procedimiento cis-infinito. Flujo en dirección contraria. Modelos de transporte. Utilización de vesículas de membrana para estudios de cinética del transporte.

III. Técnicas para el estudio de canales iónicos

Utilización de radioisótopos. Uso de electrodos de iones. Determinación del potencial de membrana con sondas espectroscópicas. Medidas de diferencia de potencial: pinzamiento de voltaje. Técnicas de cinética rápida. Flow-quench. Stopped-flow. Filtración rápida.

IV. Métodos para medir transporte de iones.

Medidas de H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>. Consideraciones prácticas. Indicadores fluorescentes. Métodos para visualizar Ca<sup>2+</sup> intracelular. (1) Fotoproteínas: Definición, estructura de acuorina, método para medir la concentración de proteína activa en la célula, localización de acuorina en distintos compartimentos intracelulares y modificación de su afinidad por el Ca<sup>2+</sup> mediante el uso de técnicas de biología molecular. (2) Indicadores fluorescentes: detección intracelular. (3) Proteínas fluorescentes. Aplicación de la transferencia de energía de fluorescencia (FRET): FRET entre derivados de proteína verde fluorescente (GFP) fusionados a calmodulina (camaleones) y FRET entre derivados de acuorina y GFP.

V. Transporte de Ca<sup>2+</sup> y su regulación en la célula.

Entrada de Ca<sup>2+</sup> desde el medio extracelular. Canales intracelulares de Ca<sup>2+</sup>. ATPasas dependientes de Ca<sup>2+</sup>. Intercambiador Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>. Transporte de Ca<sup>2+</sup> en la mitocondria. Señales elementales y globales de Ca<sup>2+</sup>. Papel del Ca<sup>2+</sup> como regulador intracelular.

VI. Temas seleccionados

ATPasas de tipo P. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa. Intercambiador Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> y regulación del pH.

Cotransportador de Na<sup>+</sup>-aminoácidos. Canales de K<sup>+</sup> sensibles a voltaje en mamíferos. Canales rectificadores de K<sup>+</sup> (Kir). Canales de Na<sup>+</sup> sensibles a voltaje en mamíferos. Canal de Ca<sup>2+</sup> asociado al receptor de glutamato en sistema nervioso central. Canal de Ca<sup>2+</sup> sensible a voltaje en sinapsis neuronal. Canal aniónico mitocondrial (VDAC). Receptores ionotrópicos P2X en sistema nervioso.

#### VII. Transporte y enfermedad

Inhibición de Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa y efectos en músculo cardíaco. Inhibición de H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa de mucosa gástrica y antiinflamatorios no esteroideos. Canales de K<sup>+</sup> sensibles a voltaje y patologías asociadas. Canal de K<sup>+</sup> sensible a ATP y diabetes. Canales de Na<sup>+</sup> y patologías asociadas. Receptor de rianodina e hipertermia maligna. Canal de Cl<sup>-</sup> y fibrosis quística. Glicoproteína-P (transportador ABC) y resistencia a quimioterapia. Poro de transición de permeabilidad mitocondrial y apoptosis. Canales TRP y patologías asociadas. Transportadores renales de Na<sup>+</sup> e hipertensión.

#### **Programa Práctico:**

##### VIII. Actividad de la bomba de Ca<sup>2+</sup> de retículo sarcoplásmico

Efecto activador de Ca<sup>2+</sup> sobre la velocidad de hidrólisis de ATP. Activación por ATP: cinética. Inhibición por concentraciones elevadas de Ca<sup>2+</sup>.

IX. Propiedades eléctricas de una célula excitable modelo: simulaciones en un cardiomiocito de ventrículo de rata. El modelo describe con precisión el efecto de los distintos iones sobre el potencial de acción cardíaco.

Efecto de distintos transportadores sobre el potencial de acción. Efecto de concentraciones intra y extracelulares de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> y Ca<sup>2+</sup> sobre corrientes iónicas. Efecto de bloqueadores de canales sobre el potencial de acción. Acoplamiento excitación-contracción: papel de canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje, canal intracelular de Ca<sup>2+</sup> y Ca<sup>2+</sup>-ATPasa.

#### **Trabajo Personal del Alumno:**

Preparación de seminarios a impartir en clase, elaboración de resúmenes, y preparación y estudio del programa para la evaluación global.

#### **Bibliografía:**

- Biomembranes Transport. Lon J. Van Winkle (1995). Academic Press.
- Ionic Channels of Excitable Membranes 2a ed. B. Hille (1992), Sinauer.
- Electrogenic Ion Pumps. P. Läuger (1991). Sinauer.
- Channels, Carriers and Pumps: An Introduction to Membrane Transport. W.D. Stein (1990). Academic Press.
- Ion Channels and Disease. F.M. Ashcroft (2000). Academic Press.
- Potassium channel structure: Domain by domain. (2000) Biggin, P.C., Roosild, T. y Choe, S. Curr. Opin. Struct. Biol. 10, 456-461.
- Principles of Selective Ion Transport in Channels and Pumps (2005) Gouaux, E. y McKinnon, R. Science 310, 1461-1465.
- Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium (2002) Toyoshima, C. y Nomura, H. Nature 418, 605-611.
- Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. (2004) Toyoshima, C. y Mizutani, T. Nature 430, 529-535.

#### **Metodología:**

El curso combina de forma equilibrada la exposición de la materia en forma de lección magistral por parte del profesor, discusiones de los temas tratados, seminarios impartidos por los alumnos, sesiones experimentales de laboratorio y simulación de transporte iónico en un modelo de ordenador.

**Criterios de evaluación:**

Preparación de un seminario de investigación relacionado con la materia y aprovechamiento del curso teórico-práctico mediante prueba escrita calificatoria.