

# TRANSPORTE IÓNICO EN LA CÉLULA: ASPECTOS MOLECULARES Y METODOLÓGICOS

## Profesorado

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

**Créditos y distribución:** 6 créditos ECTS (150 horas)

33 horas teóricas      12 horas prácticas      105 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. Medidas de $H^+$ , $K^+$ , $Na^+$ y $Ca^{2+}$*

Indicadores fluorescentes. Métodos para visualizar  $Ca^{2+}$  intracelular. Fotoproteínas: Definición, estructura de acuorina, método para medir la concentración de proteína activa en la célula y localización de acuorina en distintos compartimentos intracelulares. Indicadores fluorescentes: detección intracelular. 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 $Ca^{2+}$ y su regulación en la célula*

Entrada de  $Ca^{2+}$  desde el medio extracelular. Canales intracelulares de  $Ca^{2+}$ . ATPasas dependientes de  $Ca^{2+}$ . Intercambiador  $Na^+-Ca^{2+}$ . Transporte de  $Ca^{2+}$  en la mitocondria. Señales elementales y globales de  $Ca^{2+}$ . Papel del  $Ca^{2+}$  como regulador intracelular.

### *VI. Temas seleccionados*

ATPasas de tipo P.  $Na^+, K^+$ -ATPasa. Intercambiador  $Na^+-H^+$  y regulación del pH. Cotransportador de  $Na^+$ -aminoácidos. Canales de  $K^+$  sensibles a voltaje en mamíferos. Canales rectificadores de  $K^+$  (Kir). Canales de  $Na^+$  sensibles a voltaje en mamíferos. Canal de  $Ca^{2+}$  asociado al receptor de glutamato en sistema nervioso central. Canal de  $Ca^{2+}$  sensible a voltaje en sinapsis neuronal. Canal aniónico mitocondrial (VDAC).

## VII. Transporte y enfermedad

Receptor de rianodina e hipertermia maligna. Canal de Cl<sup>-</sup> y fibrosis quística. Receptor nicotínico de acetilcolina y miastenia gravis. 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. Inhibición de Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa y efectos en músculo cardíaco. Canales de K<sup>+</sup> sensibles a voltaje y patologías asociadas. Canales de Na<sup>+</sup> y patologías asociadas.

## 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

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.

### X. Medidas de Ca<sup>2+</sup> citosólico en células vivas

Determinación de la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular de células MCF-7 mediante el uso del indicador fluorescente Fluo-3 y el uso de la microscopía confocal.

## 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

Redacción en el aula de "título y resumen" de trabajos de investigación seleccionados de la bibliografía (65%-70%).

Preparación y exposición de un seminario de investigación relacionado con la materia (20%-25%).

Aprovechamiento de las sesiones de prácticas (10%-15%).

*Nota:* Examen escrito de la materia caso de que las faltas de asistencia superen el 20%.