

Tesi doctoral presentada per En/Na

Yolanda CÁMARA NAVARRO

amb el títol

**"Estudio funcional de la proteína desacopladora
mitocondrial UCP3 en relación con la apoptosis y
las especies reactivas de oxígeno"**

per a l'obtenció del títol de Doctor/a en

BIOLOGIA

Barcelona, 25 de juliol de 2005.

Facultat de Biologia
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Llegué al TAM por casualidad, una de ésas tan buena que con el tiempo, nos empeñamos en llamar destino. Muchos sois los culpables de que esta experiencia de la Tesis sea algo inolvidable para mí. Gracias a todos los que con vuestros consejos, ánimo y complicidad, habeis hecho de estos últimos cinco años, un camino lleno de buenos recuerdos y del que me llevo muchísimo más que experiencia profesional.

En primer lloc, mil gràcies al Cesc per donar-me l'oportunitat de treballar al seu meravellós grup, per la confiança dipositada en mi durant aquests anys, per l'íestimable ajuda, per tenir la terapèutica habilitat de convertir cada reunió en una dosis d'ànims i bones idees, i també per ensenyar-me a no tenir por de les dificultats, al cap i a la fi "eso curte"!

A la Roser, per tots els seus consells i per donar-me la seva ajuda, sovint abans que em calgués demanar-la. A la Marta per les seves idees, i també pels ànims, que sobretot en els darrers mesos m'han ajudat moltíssim. A la Teresa, un milió de gràcies per tants consells e idees conciliades amb un bon grapat de riallades. Merci per tantes tardes d'excursió a l'estabulari, què hagués fet sense les teves mans ??? Gràcies també a l'Octavi per la seva generositat, tantes idees intel·ligents i per "estar" cada cop que cal.

Que este trabajo es una droga que se alimenta de la curiosidad y la paciencia lo sabe cualquiera que haya pasado un tiempo en un laboratorio de investigación, pero que además puede convertirse en un placer inmenso, tan sólo aquéllos que como yo, hayan tenido la suerte de tropezar con un grupo de gente maravilloso que te hace olvidar el acto reflejo de mirar el reloj.... Gracias a todos ellos, sin excepción, por enseñarme tanto, dentro y fuera del lab. En especial a los franceses que han tenido que sufrir el trabajar conmigo "codo con codo". Gracias a Brigitte, por su generosidad y paciencia en "mis pinitos", por enseñarme tanto en tan poco tiempo, y por tu ayuda que aún hoy me brindas siempre que necesito. *Merci beaucoup pour tout!* Mil gracias a Laurent por su inagotable generosidad, por enseñarme casi todo de lo que sé del lab, contagiarme el entusiasmo por lo que hago, por las conversaciones, por la complicidad, los "cajarillos", las risas y tantísimas cosas más... y sobretodo por demostrarme que no hay distancia que venza una buena amistad. *Il a été une grande chance de te trouver, ne changé pas jamais!!!* Gracias también a Carinette, por las risas, su confianza, su ayuda, enseñarme un montón de cosas, y su infinita paciencia conmigo en esta última y frenética etapa de la tesis... Confía mucho en ti misma, y recuerda que " *Cuando tú quieres una cosa, todo el universo conspira para que realices tu deseo*". *Je suis sûre*

que tu atteindras tout ce que tu veux dans la vie!!! Gracias de todo a corazón a mis tres "parejas", os debo mucho más que un montón de trabajo...

El millor de passar tant de temps a un mateix lloc és que et dona l'oportunitat de conèixer molta gent maca, i d'entre ells alguns esdevenen gent molt especial per a tu... El pitjor és que sovint suposa acomiadar-se d'ells. Afortunadament hi ha una vida "al otro lado de la verja" per continuar gaudint de la seva amistat. Mil gràcies a totes les tamereres que ocupaven el lab quan vaig arribar. Gràcies a la Belén, per la seva ajuda i per la seva confiança, "mándale un beso fuerte a quién tu ya sabes"... , a la Mamen pels "bailecillos" al lab, i tota l'ajuda que em podia caldre. A l'Àgatha per tantíssims consells, moltes converses interessants i un viatge a Konstanz inolvidable! Et prometo que algún dia m'animo amb el *Messies*, total, fa falta pluja! A la Ajo i la Sònia, que tot i que les vaig enganxar amb un peu fora i en plena fase "terminal", em van ajudar un munt! Gràcies per fer-me l'entrada tan fàcil... Merci a tots els que heu passat en algun moment pel TAM, perque de tots recordo molta ajuda i un grapat de bons moments. A l'Eli i a la Rosa per tantes riallades, molta sort en tot. Al Francesc per tenir sempre ganes de donar-me un cop de mà tot i haver-se d'enfrontar a l'electrode a diari. Sort amb la tesi! Merci també a la Verónica, a l'Albert, a l'Hèctor, al Xavi, i a tots els que ben seguro oblidó mencionar, MERCI!

I el temps va passant, i les que èrem unes "bollicaos" vam passar a ser considerades les mamis per totes les *new generations de tamereros*.. Com hem rigut plegats! Piluka, gracias por hacerme reir tanto y saber subirme la autoestima como nadie, mucha suerte en tu aventura yankie! A la Txell Granell, MIL gràcies per la seva amistat, per esperar-me fins a hores indecents, pels cafès, per ajudar-me tant... Moltíssima sort amb la tesi guapa! A la Claudini, he estat temptada de dir-te gràcies en suahili, pero he pensat que em mataries... Moltes gràcies per ser un gínjol en els bons moments i quan segurament no ho eren tant, per ser tan carinyosa i una currante sempre disposada a ajudar tothom! Gràcies també al tamero en adopció, al Dani, a part de per fer-me sucumbir al formatge de cabra, per fer-me riure en tantes ocasions.

A mi trío de masterandos favoritos! A Alberto, por ser como es, un encanto de persona. Gracias por tu apoyo y mucha suerte con todo, te la mereces. Al Ramón per demostrar-me la seva confiança un munt de vegades, i per un bon grapat de cops de mà. He trobat molt a faltar les *free-versions* dels Keane!!! A Lide por hacerme reir aún cuando no tienes un buen día, por tu sensibilidad, tus ánimos y tu espontaneidad. No cambies nunca!

Milagrosamente, hay un francés que se ha librado de mi... bueno, no del todo, porque aún ha tenido que ayudarme un montón de veces. *Merci Emmanuel pour ton aide!*, por las lecciones de francés que tendremos que recuperar urgentemente y por tantas "guerras de agua"...

Txell m'ha encantat descobrir que tenim molt en comú. Gràcies per ajudar-me sempre que has pogut, pels cafès, les tertúlies, les confidències, l'intercanvi musical i escoltar-me sempre que em calia desfogar-me... Tot anirà bé, ja ho veuràs. Gràcies al Jordi Pere pel seu bon humor, la confiança i per obligar-me a "salir de la madriguera"! Ànims amb el que queda... Segur que anirà bé! Al pobre Jordi A. li queda en herència una proteïna una xic desagraïda. Ànims! Moltes gràcies per estar sempre disposat a ajudar-me, per l'amistat, els ànims i per recordar-me de tant en tant que he de confiar més en mi mateixa. Trobaré a faltar les converses filosòfiques... Seguríssim que anirà bé!!!

A las *mamis* del grupo, que lo son de unos niños encantadores, y por deformación "profesional", de todos un poco... A mi mexicana favorita. Ofe, fue padrísimo conocerte!!! Eres un encanto, ha sido un placer tenerte al lado en "nuestro lab". Gracias por tu ayuda, tus ánimos y tu cariño. Gemmita, moltes gràcies per la teva ajuda, els consells, la teva sinceritat, els ànims, l'amistat... Què faré sense la teva *Sacher*??? Uf Pili, no sé encontrar las palabras... mil gracias por cuidar tanto de mí, por tu amistad incondicional, tu generosidad extrema, tu sabiduría que me ha salvado el cuello en tantas ocasiones, y por ser un trozo de pan con patas pero con un coraje que para sí quisieran muchos.

Y este viaje no lo empecé sola. Gracias Maris por tu amistad, por compartir conmigo tantas risas y algunas lágrimas, por tu cariño, y por
Gràcies a tots, no ho haguèss aconseguit sense vosaltres!

Ela

Maris

Neus

Pili

Moni

Charo

Luchi

Gracias a todos los insulinos por brindar vuestra ayuda cada vez (y fueron muchas) que piqué a vuestra puerta. En especial, a Joan, por enseñarme a manejarme con los virusillos "en la casa del reloj", y a Lorena por arrancarme una sonrisa entre pasillo y pasillo... a ver si nos tomamos ése café! Ánimo!!! Y qué decir de los vecinos de al lado? Moltes gràcies als de RST per no fallar-me mai que ha calgut. En especial a Jose por tantos cafés y discusiones dónde arreglábamos el Mundo!

Pero también a los del piso de abajo, porque han sido un montón las veces en que he bajado las escaleras corriendo en busca de ayuda, y siempre la encontré. Gracias en especial a Jordi, Olga, Víctor, Ruth, Julia, etc.

Mil gràcies també a la que fa possible que això rutlli. Gràcies *Rachel*, per salvar-me mil vegades!!!

Cèlia

Raquel, Toni y secres

Jaume citòmetre, estabulari, genòmica,confocal

Genètica luminòmetre

Josep Julve

H Clínic-arrays

Montse Armero IH gang

Rebeca, etc Facultat

Àngela

David

Pep

Noe

Rosa

Montse

Màrius

Sílvia Bosch

Mar Varela

Laura

Marta

Alicantinos

Isa,

abuelos

Miriam Fran alex etc...

Tete y Paqui

Laurilla

Papás

ÍNDICE

PRESENTACIÓN	1
INTRODUCCIÓN	3
I. MITOCONDRIA	3
I.1 MITOCONDRIA Y PRODUCCIÓN DE ENERGÍA.....	3
I.2 MITOCONDRIA Y PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)	12
I.3 APOPTOSIS UN FENÓMENO REGULADO POR LA MITOCONDRIA	19
II. EL MÚSCULO ESQUELÉTICO	33
II.1 LOS ROS EN LA FISIOLÓGÍA DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO	33
II.2 EL PROCESO DE APOPTOSIS EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO	37
III. LA PROTEÍNA DESACOPLADORA MITOCONDRIAL UCP-3	44
III.1 LA PROTEÍNA DESACOPLADORA UCP-1, UN FACTOR ESENCIAL EN LA TERMOGÉNESIS ADAPTATIVA	44
III.2 LA PROTEÍNA DESACOPLADORA UCP-3.....	47
III.3 ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA DESACOPLADORA MITOCONDRIAL UCP3	55
III.4 PAPEL FISIOLÓGICO DE LA PROTEÍNA UCP3	58
OBJETIVOS.....	69
MATERIAL Y MÉTODOS	71
I. CULTIVOS CELULARES	71
I.1 CUIDADO Y CONSERVACIÓN DE LAS CÉLULAS	71
I.2 SOLUCIONES Y MEDIOS UTILIZADOS.....	72
I.3 LÍNEAS CELULARES.....	72
II. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS MEDIANTE FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR.....	75
II.1 FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR A PARTIR DE CÉLULAS EN CULTIVO.....	75
II.2 OBTENCIÓN DE FRACCIÓN MITOCONDRIAL DE MÚSCULO.....	77
III. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	77
IV. ANÁLISIS POR WESTERN BLOT.....	78
IV.1 ANTICUERPOS PRIMARIOS UTILIZADOS	79

IV.2 ANTICUERPOS SECUNDARIOS UTILIZADOS	80
IV.3 REUTILIZACIÓN DE LAS MEMBRANAS	80
V. ENSAYOS DE CONSUMO DE OXÍGENO.....	81
V.1 EL ELECTRODO DE OXÍGENO	82
V.2 DETERMINACIÓN DE LA RESPIRACIÓN EN CÉLULAS ENTERAS	86
V.3 DETERMINACIÓN DE LA RESPIRACIÓN EN CÉLULAS PERMEABILIZADAS.....	87
V.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOCROMO C OXIDASA.....	89
VI. DETERMINACIÓN DE LA VARIACIÓN DE POTENCIAL MITOCONDRIAL	89
VII. TÉCNICAS DE DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS.....	90
VII.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CELULARES PARA LA VALORACIÓN ACTIVIDAD CASPASA.....	90
VII.2 ENSAYO DE LIBERACIÓN DE CITOCROMO C	92
VIII. CUANTIFICACIÓN DE NADH EN HOMOGENADOS DE CÉLULAS	93
IX. CUANTIFICACIÓN ATP EN CÉLULAS	95
X. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE CÉLULAS Y TEJIDOS	95
X.1 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE CÉLULAS Y TEJIDOS DE ORIGEN NO MUSCULAR	95
X.2 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE CÉLULAS Y TEJIDOS DE ORIGEN MUSCULAR.....	96
X.3 VALORACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y PUREZA DEL RNA	97
XI. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....	98
XI.1 ANÁLISIS POR TRANSFERENCIA <i>NORTHERN</i>	98
XI.2 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL	99
XII. ENSAYO DE RETARDO EN GEL DE POLIACRILAMIDA O EMSA	103
XII.1 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS NUCLEARES	104
XII.2 OLIGONUCLEÓTIDO UTILIZADO	105
XII.3 MARCAJE RADIACTIVO DEL OLIGONUCLEÓTIDO	106
XII.4 ENSAYO DE RETARDO EN GEL	106
XIII. CUANTIFICACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN CÉLULAS L6.....	116
XIV. CUANTIFICACIÓN DE GLUTATIÓN REDUCIDO EN CÉLULAS L6	108
XV. UTILIZACIÓN VECTORES ADENOVÍRICOS	110
XV.1 AMPLIFICACIÓN DE LOS VECTORES ADENOVÍRICOS RECOMBINANTES	112
XV.2 PURIFICACIÓN DE LOS VECTORES ADENOVÍRICOS RECOMBINANTES	114
XV.3 TITULACIÓN DE LOS VECTORES ADENOVÍRICOS RECOMBINANTES.....	116

XVI.	INFECCIÓN DE CÉLULAS MUSCULARES CON VECTORES ADENOVÍRICOS	118
XVII.	TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS CON ÁCIDOS GRASOS	119
XVIII.	UTILIZACIÓN DE VECTORES ADENOVÍRICOS <i>IN VIVO</i>	119
	XVIII.1 CONDICIONES DE ESTABILIZACIÓN DE LOS ANIMALES	120
	XVIII.2 INYECCIÓN DE VECTORES ADENOVÍRICOS EN LA VENA LATERAL DE LA COLA DE RATONES	120
XIX.	OBTENCIÓN DE MITOCONDRIAS FUNCIONALES DE HÍGADO	121
	XIX.1 DESIONIZACIÓN DE LA SACAROSA	121
	XIX.2 OBTENCIÓN DE MITOCONDRIAS DE HÍGADO	123
XX.	ENSAYOS DE CONSUMO DE OXÍGENO A PARTIR DE MITOCONDRIAS DE HÍGADO	124
XXI.	DETERMINACIÓN DEL <i>SWELLING</i> MITOCONDRIAL	125
XXII.	VALORACIÓN DE PARÁMETROS CIRCULANTES.....	126
XXIII.	ESTADÍSTICA.....	126
XXIV.	OTROS REACTIVOS	126
	RESULTADOS	CARPETA
I.	UCP-3 SENSITIZES CELLS TO MITOCHONDRIAL-DEPENDENT STIMULUS OF APOPTOSIS	I
II.	RELATIONSHIP BETWEEN THE REGULATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES PRODUCTION AND MITOCHONDRIAL-DRIVEN APOPTOSIS IN SKELETAL MUSCLE CELLS. EFFECTS OF THE MITOCHONDRIAL UNCOUPLING PROTEIN-3	II
III.	REACTIVE OXYGEN SPECIES PRODUCTION IN RESPONSE TO FATTY ACIDS IN SKELETAL MUSCLE CELLS. EFFECTS OF THE MITOCHONDRIAL UNCOUPLING PROTEIN-3.....	III
IV.	LA EXPRESIÓN ECTÓPICA DE UCP3 EN MITOCONDRIAS DE HÍGADO SENSIBILIZA A LA APERTURA DEL PORO DE TRANSICIÓN EN LA PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL	IV

DISCUSIÓN GLOBAL	129
CONCLUSIONES	144
BIBLIOGRAFÍA.....	146
ANEXO	CARPETA
THE CROSS-TALK AMONG MITOCHONDRIAL ACTIVITY, REACTIVE OXYGEN SPECIES PRODUCTION AND APOPTOSIS IN SKELETAL MUSCLE. A ROLE FOR UNCOUPLING PROTEIN-3?	A
GENE EXPRESSION OF LEPTIN AND UNCOUPLING PROTEINS: MOLECULAR END- POINTS OF FETAL DEVELOPMENT.....	B

ABREVIATURAS

ADP	<i>Adenosine diphosphate</i>
AIF	<i>Apoptosis inducing factor</i>
ALS	Esclerosis lateral amiotrófica
ANT	Adenina nucleótido translocasa
AP-1	<i>Activating protein-1</i>
APIP	<i>Apaf-1-interacting protein</i>
ARC	<i>Apoptosis repressor with caspase recruitment domain</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
BMCP1	<i>Brain mitochondrial carrier protein</i>
BMI	Índice de masa corporal o <i>body mass index</i>
BSA	Albúmina sérica bovina
BSO	<i>Buthionine sulfoximide</i>
CPT-I	Carnitina palmitoil transferasa I
CCCP	Carbonilcianida-3-clorofenilhidrazona
cdk	ciclinas dependientes de kinasa
CoA	Coenzima A
CO I	Subunidad I de la Citocromo Oxidasa
CsA	Ciclosporina A
Cyp-D	Ciclofilina D
DISC	<i>Death-inducing signalling complex</i>
Dox	Doxiciclina
DNP	Dinitrofenol
FADH₂	<i>Flavin adenine dinucleotide</i>
FADD	<i>Fas Associated Death Domain</i>
FasL	Ligando de Fas
FCCP	Carbonilcianida-4-trifluorometoxifenilhidrazona
FLIP	<i>Fas-associated death domain-like IL-1-converting enzyme-inhibitory protein</i>
GH	<i>Growth hormone</i>
Gpx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
H⁺	Protón
hILP	<i>Human IAP-like protein</i>
HKII	Hexoquinasa
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
hsp70	<i>Heat shock protein 70 kDa</i>
IAPs	<i>Inhibitors of apoptosis proteins</i>
IGF	<i>Insuline growth factor</i>
IP	Yoduro de propidio
JO₂	Tasa de consumo de oxígeno
KCN	Cianuro potásico
LDH	Lactato deshidrogenasa
LPL	Lipopolisacárido
MDMA	3,4-metilenedioximetamfetamina o éxtasis
MEF	<i>Myocyte enhancer factor</i>
MHC	<i>Myosin heavy chain</i>
MPTP	<i>Mitochondrial permeability transition pore</i>
MRF	<i>Muscle regulatory factors</i>

mtCK	Creatina kinasa
NAD(P)H	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate)</i>
NEFA	<i>Nonesterified fatty acids</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
O₂^{•-}	Anión superóxido
OH[•]	Radical hidroxilo
PBR	Receptor periférico de las benzodiazepinas
P_i	Fosfato inorgánico
PI3K	Fosfatidilinositol-3-kinasa
PLA₂	Fosfolipasa A ₂
PPAR	<i>Peroxisome proliferator activated receptor</i>
pRb	Proteína de retinoblastoma
Q	Quinona
QH[•]	Ubisemiquinona
RA	<i>Retinoic acid</i>
RAR	<i>Retinoic acid receptor</i>
RNS	Especies reactivas del nitrógeno
RO[•]	radical alkoxil
ROO[•]	radical peroxil
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> , especies reactivas del oxígeno
RXR	<i>Retinoid X receptor</i>
SOD	Superóxido dismutasa
STP	Staurosporina
STZ	<i>Streptozotocin</i>
TAM	Tejido adiposo marrón
T₃	3,5,3'-L-triyodotironina
tBid	<i>Truncated Bid</i>
TH	<i>Thyroid hormones</i>
TNFα	Factor de necrosis tumoral α
UCP	<i>Uncoupling protein</i>
VDAC	<i>Voltage dependent anion channel</i> o Porina
$\Delta\mu\text{H}^+$	Fuerza protomotriz
ΔpH	Diferencia de pH
$\Delta\Psi$	Potencial de membrana

PRESENTACIÓN

La Tesis Doctoral que aquí se presenta, ha sido realizada en el grupo de investigación *Genética y Biología Molecular de Proteínas Mitocondriales y Patologías Asociadas* del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona, bajo la dirección del Dr. Francesc Villarroya.

El trabajo consta de los siguientes apartados: *Introducción, Objetivos, Material y Métodos, Resultados, Discusión Global, Conclusiones, Bibliografía y Anexo*. La **Introducción** se ha dividido en tres bloques. El primero se centra en el papel de la mitocondria en la regulación de la apoptosis y la producción de especies reactivas de oxígeno, aspectos que se detallan a nivel del músculo esquelético en un segundo apartado. En el último apartado, se revisa lo descrito hasta el momento sobre la proteína UCP3, centrándonos principalmente en la diversas hipótesis que tratan de explicar la función fisiológica de dicha proteína. El apartado **Resultados** consta de los artículos publicados o pendientes de revisión para su publicación y un trabajo al que se le ha dado formato de artículo para mantener la coherencia de presentación. Los trabajos pendientes de publicación, muestran las leyendas de las figuras debajo o en el lateral de la figura correspondiente para facilitar la lectura de los mismos. En la **Discusión Global** se comentan los resultados obtenidos desde una óptica integradora. En el apartado **Bibliografía**, se detallan las referencias bibliográficas citadas en los apartados de *Introducción, Material y Métodos, y Discusión Global*, mientras que cada artículo contiene sus propias referencias bibliográficas. Finalmente, como anexos, se incluyen un artículo de revisión que integra la revisión bibliográfica realizada en la Introducción y datos procedentes de la presente Tesis, más un trabajo de regulación de la expresión del gen UCP3 realizado en colaboración durante el desarrollo de la Tesis.