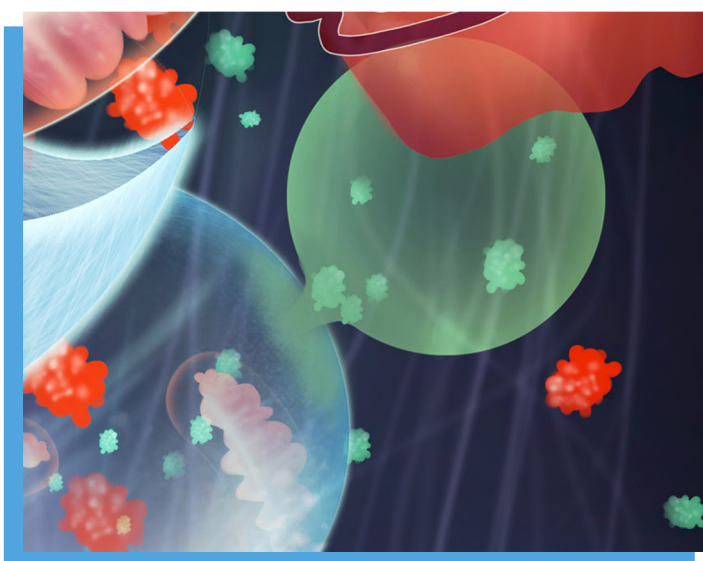
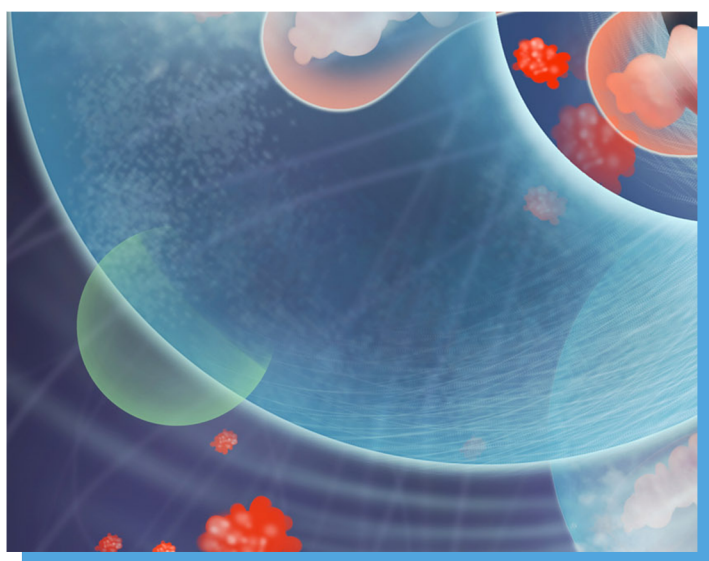
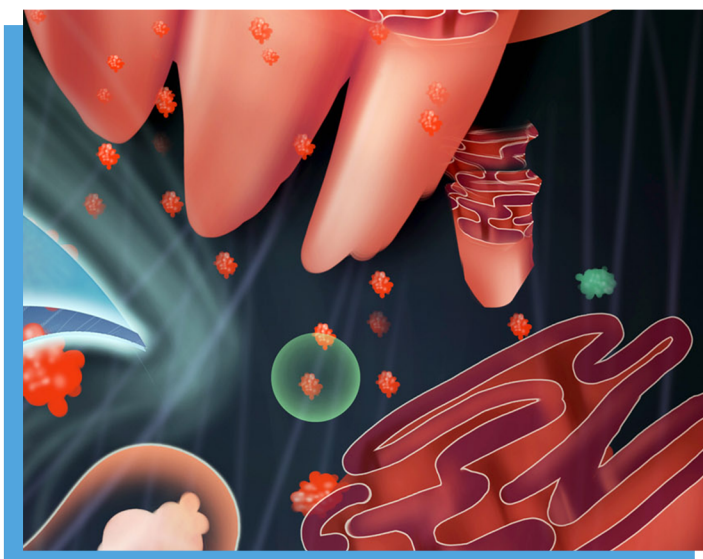
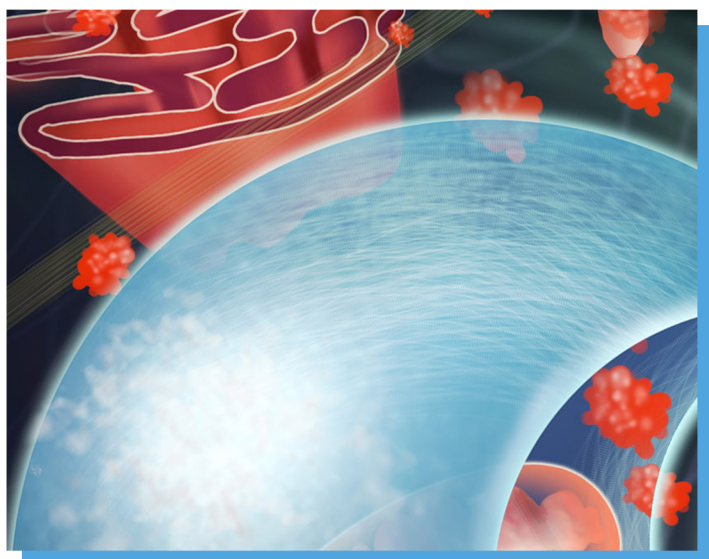


Papel de la nueva familia de receptores endolisosomales de NAADP (TPCs) en la función cardiovascular y la fisiopatología del síndrome metabólico

Vanessa García Rúa



TESIS DOCTORAL
2015



Universidade de Santiago de Compostela
Facultade de Medicina e Odontoloxía
Departamento de Medicina
Instituto de Investigacións Sanitarias de Santiago
Área de Inflamación
Laboratorio de Investigación en Cardiología Celular y Molecular

PAPEL DE LA NUEVA FAMILIA DE RECEPTORES ENDOLISOSOMALES DE
NAADP (TPCS) EN LA FUNCIÓN CARDIOVASCULAR Y LA FISIOPATOLOGÍA
DEL SÍNDROME METABÓLICO.

Tesis Doctoral

Vanessa García Rúa
2015



Doña María Francisca Lago Paz, Investigadora del SERGAS en el Instituto de Investigaciones Sanitarias de Santiago, y Don José Ramón González Juanatey, Catedrático de Medicina en la Universidad de Santiago de Compostela y Jefe de Servicio de Cardiología de la Xerencia de Xestión Integrada de Santiago de Compostela,

CERTIFICAN QUE:

La presente Tesis Doctoral titulada “Papel de la nueva familia de receptores endolisomales de NAADP (TPCs) en la función cardiovascular y la fisiopatología del síndrome metabólico”, ha sido realizada bajo su dirección en el Laboratorio de Investigación en Cardiología Celular y Molecular del Instituto de Investigaciones Sanitarias de Santiago (Departamento de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela), estimado que se encuentra concluida y en condiciones de ser presentada para optar al grado de Doctor en Biología.

Y para que conste, se firma la presente autorización en Santiago de Compostela, Septiembre 2015.

Fdo: María Francisca Lago Paz

Fdo: José Ramón González Juanatey



En primer lugar me gustaría agradecer a mis directores de tesis la Dra. Francisca Lago Paz y el Dr. José Ramón González Juanatey por haberme dado la oportunidad de realizar la tesis doctoral en su laboratorio y formarme como investigadora. A Fran, por intentar hacerme sacar siempre lo mejor de mí misma, por haber estado siempre presente y por sus consejos, a José Ramón por su cercanía y motivación constante.

A las personas y pacientes que forman parte del Servicio de Cardiología y Servicio de Cirugía Cardíaca de la Xerencia de Xestión Integrada de Santiago de Compostela, especialmente al Dr. José Rubio, al Dr. Dario Durán, al Dr. Alfonso Varela, a Ana y a María por su colaboración en la obtención de muestras y asesoramiento en el trabajo realizado con los pacientes.

A la Unidad de Cardiocirculatorio del Instituto de Investigaciones Sanitarias del Hospital Universitario La Fe de Valencia, especialmente al Dr. Miguel Rivera, a la Dra. Esther Roselló y al Dr. Manuel Portolés por la donación de tejido ventricular cardíaco humano obtenido de corazones transplantados y por su buena acogida cuando fui de visita.

Al Departamento de Farmacología de la Universidad de Oxford, por la donación de corazones de ratones *wild type* y *knockout* para TPC1 y TPC1/2.

A las Dra. Luisa Maria Seoane por sus donaciones de corazones de rata, a la Dra. María Pardo por la cesión del programa ProgenesisSamespots y a los Drs. Oreste Gualillo, Carmen Conde, Antonio González y por su ayuda y consejo.

Al Dr. Andrés Beiras y al Dr. Tomás García Caballero del Servicio de Anatomía Patológica por su trabajo en microscopía electrónica y por poner a nuestra disposición el Servicio para la realización de análisis inmunohistoquímicos, respectivamente.

A la Dra. Carmen Cadarso de la Unidad de Bioestadística de la Universidad de Santiago de Compostela.

A la Dra. Susana Bravo de la Unidad de Proteómica por su ayuda y fuerza.

Al Dr. Joseph A. Hill y a la Dra. Beverly Rothermel, por haberme dado la oportunidad de ir a su laboratorio y por haber hecho que mi estancia supusiera un crecimiento tanto personal como profesional, y también me gustaría agradecerle a una amiga y profe que pronto será IP, a Valentina (tú y Carlos, sois geniales).

A todas aquellas personas que han pasado por estos laboratorios, cada una de ellas han aportado algo especial a este tiempo vivido. En primer lugar, quería dar las gracias

a mis compis y amigos del laboratorio ¡qué decir de ellos, o más bien qué no decir! Han sido los mejores compañeros que he podido tener, sin lugar a dudas y, aunque aquí solo ponga alguna cosa, vosotros sabéis lo importantes que habéis sido a lo largo de este periodo. A Sandra, por su capacidad de enseñar, paciencia, serenidad y por sus ánimos. A Ana, que consiguió lo que poca gente, meterse en mi cabeza y descubrir mi orden (dentro de mi caos) y tener siempre una dosis de positividad y de orden. A Diego, porque me has enseñado cosas que nunca pensé descubrir y, por supuesto, por tus locuritas. Agradecer también a aquellas personas que de una forma u otra han estado muy cercanas, a unos pocos pasos, tanto a aquellas que se han ido, como a las que todavía están: a Aida...¡vaya conversaciones que hemos tenido!, gracias por tu capacidad reflexiva y serenidad; a Nerea, llegaste como un torbellino cargado de energía y siempre luchadora; a Laura por tu sinceridad; a Manuel, por ayudarme en mis inicios y por tu don de gentes, a Manoli y sus matemáticas y al resto de compañeros de los laboratorios. También a aquellas personas que están a pesar de la lejanía: a Jana que se llenó de paciencia y me inició en la proteómica, por esos días eternos en los que los geles tardaban, por esos viajes y por seguir manteniendo el contacto a pesar del tiempo transcurrido; a Bea, siempre sonriente, trabajadora incansable, otra de mis maestras y con la que tengo pasado grandes momentos.

A mis padres y hermana, a quienes va dedicada esta tesis, esto es lo mínimo que se merecen. A mis padres, por haberme apoyado siempre tantísimo, sobre todo desde que llegué a Santiago con 18 añitos, sin duda sin vosotros no hubiera hecho nada, gracias por mostrarme siempre el vaso medio lleno o casi lleno, pero nunca vacío, por enseñarme a aprender de mis errores y por haberme enseñado a luchar y a mirar hacia adelante. A mi hermanita pequeña, aunque ahora ya no lo eres tanto, por cuidarme (aunque parezca mentira); qué bien lo pasamos juntas! a pesar de nuestra diferencia de edad...¡Nosotras si que sabemos!. Finalmente gracias a ti, Pablo, gracias por tu paciencia, comprensión, orden y positividad, ¡has sido un gran apoyo!.



A MIS PADRES Y HERMANA





ÍNDICE



INTRODUCCIÓN	1
1. Estructura proteica de los TPCs.	4
2. Distribución tisular y localización de los TPCs.	6
3. TPCs y sistema endolisosomal.	7
3.1. Endosomas.	7
Reguladores del tráfico endosomal.	12
Pequeñas GTPasas.	12
Fosfoinositoles.	13
Calcio.	14
3.2. Lisosomas.	15
Regulación lisosomal.	16
Enfermedades lisosomales.	17
4. Sistema endolisosomal y autofagia.	18
4.1. Mecanismo de autofagia.	21
4.1.1. El complejo Atg/ULK.	21
4.1.2. Beclin1/Clase III PI3K.	22
4.1.3. Atg9 y VMP1.	23
4.1.4. Conjugación de proteínas.	23
4.1.5. Proteínas que median la fusión entre los autofagosomas y los lisosomas.	24
4.2. Marcadores de autofagia.	26
Papel de LC3 en la autofagia eucariota.	26
Papel de p62 en la autofagia eucariota.	27
4.3. Autofagia en el corazón.	28
Autofagia basal en el corazón.	28
Inducción de la autofagia cardíaca mediante privación.	29
Rutas implicadas en la autofagia cardiomiocitaria.	30
4.4. Enfermedades cardiovasculares y autofagia.	31
Autofagia y aterosclerosis.	31

Autofagia en isquemia/reperfusión.	31
Autofagia en cardiomiopatías.	32
Autofagia en insuficiencia cardíaca.	33
5. Activación de los TPCs.	34
6. Funciones biológicas de los TPCs.	36
6.1. Funciones biológicas de los TPCs NAADP dependientes.	36
Diferenciación.	36
Angiogénesis.	37
Contracción del músculo liso.	38
Metabolismo.	38
Autofagia.	39
Controlar la entrada de virus al interior del huésped.	40
6.2. Funciones biológicas de los TPCs PI(3,5)P ₂ dependientes.	41
Homeostasis iónica.	41
Metabolismo y/o autofagia.	41
7. TPCs y sistema cardiovascular.	43
OBJETIVOS	45
MÉTODOS	49
1. Ética.	51
2. Tejidos humanos.	51
3. Animales.	53
3.1. Tejidos de ratón.	53
3.2. Tejidos de rata.	54
4. Cultivos Celulares.	55
4.1. Cultivo de cardiomiocitos adultos humanos.	55
4.2. Cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata.	56

4.3. Cardiomiocitos auriculares adultos de ratón: línea celular HL-1.	57
5. Silenciamiento de TPC1 y TPC2 en cardiomiocitos en cultivo.	57
6. Infección por adenovirus de cultivos de cardiomiocitos neonatales de rata.	58
7. Proteómica.	59
7.1. Isoelectroenfoque y electroforesis en gel de 2 dimensiones (2-DE).	59
7.2. Adquisición y análisis de las imágenes obtenidas de los geles 2-DE.	61
7.3. Análisis proteómico por LC-MALDI-MS.	61
7.4. Digestión de proteínas.	62
7.5. Identificación de proteínas mediante MALDI-TOF/TOF.	63
7.6. Identificación de proteínas por LC-MALDI-MS.	64
8. Extracción de proteínas.	65
9. Cuantificación de proteínas: Método de Bradford.	65
10. Western blot.	66
11. Extracción de ARN.	67
12. RT-PCR.	68
13. Ensayo de captación de ácidos grasos: BODIPY®.	70
14. Ensayo de actividad mitocondrial: MTT.	71
15. Microscopía electrónica.	72
16. Microscopía confocal.	72
17. Ensayo de captación de glucosa.	74
18. Análisis estadístico.	75
RESULTADOS	77
1. Estudio proteómico en corazón de ratones deficientes en TPCs.	79

1.1. Análisis proteómico en ventrículo de ratones KO vs. wt para TPC1 mediante la técnica 2-DE MALDI TOF/TOF.	79
1.2. Estudio del ventrículo izquierdo de ratones KO vs. wt para TPC1 y TPC1/2 mediante LC-MALDI-MS.	84
1.3. Validación de los cambios en enolasa, fosfoglicerato kinasa 1 y FABP3 mediante western blot en el ventrículo izquierdo de los ratones wt y KO para TPC1.	89
Enolasa.	90
Fosfoglicerato kinasa 1.	92
FABP3.	93
1.4. Efecto del silenciamiento de los TPCs mediante siRNA sobre la captación de glucosa por parte de cardiomiocitos en cultivo.	95
1.5. Efecto del silenciamiento de TPC1 mediante siRNA sobre la movilización de GLUT-4 en cardiomiocitos en cultivo.	97
1.6. Efecto del silenciamiento de TPCs mediante siRNA sobre la captación de ácidos grasos en cardiomiocitos en cultivo.	98
2. Estudio del papel de los TPCs en la regulación de la autofagia cardiomiocitaria.	99
2.1. Efecto de la deprivación energética sobre los niveles de los TPCs en cardiomiocitos en cultivo.	99
2.2. Efecto del silenciamiento de TPC1 y TPC2 sobre la viabilidad cardiomiocitaria.	105
2.3. Efecto del silenciamiento de TPC1 y TPC2 en el progreso de la autofagia en cardiomiocitos en cultivo.	106
2.3.1. Determinación de LC3 en cardiomiocitos en cultivo.	106
Inmucitofluorescencia en células transfectadas con GFP-LC3.	106
Western blot de LC3.	109
Western blot de LC3 en presencia y ausencia de bafilomicina A1.	110
Inmucitofluorescencia en células transfectadas con GFP-LC3 en presencia y ausencia de bafilomicina A1.	111
2.3.2. Determinación de p62 en cardiomiocitos en cultivo.	113

2.3.3. Microscopía electrónica en ventrículo izquierdo de ratones KO vs. wt para TPC1/2.	116
4. Regulación de los niveles de expresión cardíaca de TPC1 y TPC2 en ratas por el ayuno y la dieta.	117
4.1. Ayuno.	117
4.2. Dieta.	119
5. Estudio de los niveles de expresión génica y proteica de TPC1 y TPC2 en tejido cardíaco humano.	120
5.1. Estudio de los niveles de expresión de TPC1 y TPC2 en aurícula cardíaca de pacientes sometidos a cirugía cardíaca.	120
Regulación de los niveles de expresión cardíaca de TPC1 y TPC2 en ratas por el género.	121
Niveles cardíacos de marcadores de autofagia en función del género.	122
Efecto de las hormonas sexuales sobre los niveles cardíacos de los TPCs.	123
5.2. Estudio de los niveles de expresión de TPC1 y TPC2 en ventrículos de pacientes sometidos a trasplante cardíaco.	124
DISCUSIÓN	127
1. Estudio comparativo del proteoma cardíaco en ratones wild type (wt) y knockout (KO) para TPC1 y TPC1/2.	130
1.1. Alteraciones en el metabolismo cardíaco y/o cardiomiocitario.	133
1.1.1. Alteraciones en proteínas implicadas en el metabolismo de la glucosa.	133
1.1.2. Alteraciones en proteínas implicadas en el metabolismo de los ácidos grasos.	137
1.1.3. Alteraciones en proteínas relacionadas con el ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones.	139
1.2. Alteraciones en proteínas que regulan la contracción muscular y la organización de los componentes celulares.	140

2. Estudio del papel de los TPCs en la regulación de la autofagia cardiomiocitaria.	142
3. Regulación de los niveles de expresión cardíaca de TPC1 y TPC2 <i>in vivo</i> por el ayuno, la dieta y el género.	147
3.1. Ayuno.	147
3.2. Dieta.	148
3.3. Género.	149
4. Estudio de los niveles de expresión génica y proteica de TPC1 y TPC2 en tejido cardíaco humano procedente de pacientes con enfermedades cardiovasculares.	150
CONCLUSIONES	153
APÉNDICE	157
BIBLIOGRAFÍA	187





ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS



2-DE: electroforesis en dos dimensiones.	BSA-FFA: seroalbúmina bovina libre de ácidos grasos.
ACL: acilcarnitina de cadena larga.	cADPR: ADP-ribosa cíclico.
ACN: acetonitrilo.	CHAPS:3-((3- <i>cholamidopropyl</i>) <i>dimethylammonio</i>) <i>propanesulfonate</i>).
ADN: ácido desoxirribonucleico.	CI: intervalo de confianza.
ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario.	CICR: el calcio induce la liberación de más calcio.
ADO: antidiabéticos orales.	Cob: cobertura
ADP: adenosina difosfato.	CPT1: carnitina palmitoiltransferasa tipo 1.
ADPR: adenosina difosfato ribosa.	CPT2: carnitina palmitoiltransferasa tipo 2.
AGCL: ácidos grasos de cadena larga.	CryAB: cadena B de alfa-cristalina.
AHA: <i>American Heart Association</i> .	Da: Dalton.
AKT: proteína quinasa B.	Deptor: <i>DEP domain-containing mTOR-interacting protein</i> .
Ambra 1: <i>autophagy/beclin-1 regulator 1</i> .	DFCP1: proteína 1 con doble dominio FYVE.
AMP: adenosina monofosfato.	DIL: cardiomiopatía dilatada.
AMPK: proteína quinasa activada por AMP.	DM: diabetes mellitus.
ANP: péptido natriurético atrial.	DMEN: <i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i> .
APS: persulfato amónico.	DTT: ditioneitol.
AraC: arabinósido de citosina.	EDTA: ácido etildiaminotetraacético.
ARAI: antagonistas del receptor de angiotensina II.	EE: endosoma temprano.
ARN: ácido ribonucleico.	EGF: factor de crecimiento epitelial.
ARNm: ácido ribonucleico mensajero.	EMMA: <i>European Mouse Mutagenesis Archive</i> .
Atg: gen relacionado con la autofagia.	ERK1/2: kinasa regulada por señales extracelulares 1/2.
ATP: adenosín trifosfato.	
Bcl-2: <i>B-cell lymphoma 2</i> .	
Bcl-X: <i>B-cell lymphoma-extra large</i> .	
Bif1: factor 1 de interacción con BAX.	
BNP: péptido natriurético cerebral.	
BSA: seroalbúmina bovina.	

ET: endosoma tardío.

FABP3: *fatty acid binding protein 3*.

FADH₂: flavina adenina dinucleótido.

FBS: suero fetal bovino.

FE: fenilefrina.

FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo.

FIP200: *FAK-family interacting protein of 200 kDa*.

FRET: transferencia de energía de resonancia de Förster.

GADPH: gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa.

GDP: guanosina difosfato.

GEF: factores intercambiadores de nucleótido guanidina.

GFP: *green fluorescent protein*.

Glut4: receptor de glucose.

GTP: guanosina trifosfato.

GTPasa: guanosina trifosfatasa.

Hax-1: proteína X1 asociada al sustrato HS-1.

HBS: tampón salino de HEPES.

HEK293: *human embryonic kidney 293*.

HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-peperazinetanosulfónico.

HOPS: *homotypic fusion and protein sorting*.

HPLC: *high performance liquid chromatography*.

Hsc70: chaperona de choque térmico de 70 KDa.

HTA: hipertensión arterial.

IECAs: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina.

IEF: isoelectroenfoque.

IMC: índice de masa corporal.

InsP₃R: receptores inositol 3-fosfato.

IP₃: inositol 1,4,5-trifosfato.

IPG: *immobilized pH gradients*.

ISQ: cardiomiopatía isquémica.

JNK: *c-Jun N-terminal kinase*.

KO: *knockout*.

L: lisosoma.

LAMP1: proteína asociada a la membrana de los lisosomas tipo 1.

LAMP2: proteína asociada a la membrana de los lisosomas tipo 2.

LAMP3: proteína asociada a la membrana de los lisosomas tipo 3.

LC3: *microtubule-associated protein 1 light chain*.

LC-MALDI: cromatografía líquida acoplada a MALDI.

LDL: lipoproteína de baja densidad.

LSDs: *lysosomal storage disease*.

lysoNa_{ATP}: canal endolisosomal de sodio sensible al ATP.

M6PR: receptores manosa 6-fosfato.

MALDI: desorción/ionización láser asistida por matriz.

Mit: mitocondrial.

mLST8/GβL: subunidad LST8 del complejo diana de rapamicina.

MS: espectros de masas.	PI(3,4,5)P ₃ : fosfoinositol 3,4,5-trifosfato.
mTOR: <i>mammalian target of rapamycin</i> .	PI(3,5)P ₂ : fosfoinositol 3,5-difosfato.
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.	PI(4)P: fosfoinositol 4-fosfato.
MVI: masa ventricular izquierda.	PI(4,5)P ₂ : fosfoinositol 4,5-difosfato.
NAADP: ácido nicotínico adenina dinucleótido fosfato.	PI(5)P: fosfoinositol 5-fosfato.
NAD: nicotinamida adenina dinucleótidos.	PI: fosfoinositol.
NADH: nicotinamida adenina dinucleótido.	pI: punto isoelectrico.
NCBI: <i>National Center for Biotechnology Information</i> .	PI3K: fosfatidilinositol 3-kinasa.
NCS: suero de ternero recién nacido.	PIKfyve: <i>FYVE finger-containing phosphoinositide kinase</i> .
NDSB-256: <i>non detergent sulfobetaines</i> .	PM: peso molecular.
NFAT: factor nuclear de células T activadas.	ppm: partes por millón.
NF-κB : <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> .	PRAS40: <i>proline rich Akt substrate 40</i> .
NMDA: N-metil-D-aspartato.	PVDF: polifluoruro de venilideno.
NYHA: <i>New York Heart Association</i> .	Raptor: proteína asociada reguladora de mTOR.
Panther: <i>protein analysis through evolutionary relationships</i> .	RFP: <i>red fluorescence protein</i> .
PBS: tampón fosfato salino.	RHEB: homólogo de Ras enriquecido en el cerebro.
PE: fosfatidiletanolamina.	ROS: especies reactivas de oxígeno.
PGK1: fofoglicerato kinasa 1.	RyR: receptor de rianodina.
pI: punto isoelectrico.	SDS: dodecilsulfato sódico.
PI(3)P: fosfoinositol 3-fosfato.	siRNA: ARN de interferencia.
PI(3,4)P ₂ : fosfoinositol 3,4-difosfato.	DKBR3: línea celular derivada de líquido pleural de adenocarcinoma de mama (que sobreexpresa HER2).
	SNARE: <i>soluble NSF attachment protein receptor</i> .
	SNX-BAR: nexinas de clasificación.
	TCA: ácido tricloroacético.
	TEMED: tetrametiletildiamina.

TFE3: factor de transcripción E3.
TFEB: factor de transcripción EB.
TOF: *Time-Of-Flight*.
TPC1: *two pore channel 1*.
TPC2: *two pore channel 2*.
TPC3: *two pore channel 3*.
TPCs o TPCNs: *two pore channels*.
TPRs: *transient receptor potential channels*.
TRPC: receptor de potencial transitorio canónico.
TRPM2: receptor de potencial transitorio de cationes, subfamilia M, miembro 2.
TRPML1: receptor mucolipin 1.
UK: *United Kingdom*.
ULK: *unc-51-like kinase*.
USA: Estados Unidos.
USC: Universidad de Santiago de Compostela.
UVRAG: gen asociado a la resistencia a la irradiación por ultravioletas
V: voltios.
V-ATPasa: bomba de protones tipo V.
VC: vesícula de carga.
VEGF: factores de crecimiento vasculares del endotelio.
VEGFR2: receptor 2 del factor de crecimiento vascular del endotelio.
VFDVI: volumen fin de diástole del ventrículo izquierdo.
VFSVI: volumen fin de sístole del ventrículo izquierdo.
VGCCs: canales de calcio voltaje dependientes de 4 dominios alfa.
VMP-1: proteína de membrana vacuolar 1.
Vps15: *serine/threonine-protein kinase VPS15*.
Vps34: fosfatidilinositol 3-kinasa VPS34.
VR: vesícula de reciclaje.
VTE: vesícula transportadora endosomal.
WIPI: proteína 1 con dominio WD.
wt: *wild type*.
ZKSCAN3: anillo de zinc con dominios KRAB y SCAN.



RESUMEN/ABSTRACT



Rationale: Autophagy participates in both physiological and pathological remodeling of the heart. The endolysosomal two-pore channels TPC1 and TPC2 have been implicated in the regulation of metabolism and autophagy. *Objective:* To study the role of TPC1 and TPC2 in cardiac metabolism and in basal and induced cardiac autophagic activity. *Methods and Results:* The cardiac tissue of TPC1 knockout mice showed significant alterations in key proteins related with cardiac metabolism as well as with cardiac contraction and/or structure maintenance. siRNA depletion of TPC1 induced an increase in glucose uptake and on GLUT-4 translocation in cultured cardiomyocytes. In addition, starvation induced a significant increase in TPC1 and TPC2 transcripts and protein levels that paralleled the increase in autophagic flux (identified by increased LC3-II and decreased p62 levels) in cultured cardiomyocytes. SiRNA depletion of TPC2 alone or together with TPC1 increased both LC3-II and p62 levels under basal conditions and in response to starvation, suggesting a change in the autophagic process. Electron micrographs of cardiac tissue from TPC1/2 double knockout mice showed that cardiomyocytes contained large numbers of immature lysosomes with diameters significantly smaller than those of wild-type mice. In cardiac tissues from both humans and rats, TPC1 and TPC2 transcripts and protein levels were higher in females than in males and increased in heart failure patients compared to healthy controls. *Conclusions:* These data are the first evidence showing that the TPCs and the endolysosomal system could be involved in cardiac metabolism, cardiac autophagy, and thus, in the physiopathology of cardiovascular diseases.





INTRODUCCIÓN



Los *Two Pore Channels* (TPCs o TPCNs por el nombre del gen) son un grupo de canales iónicos voltaje dependientes clonados por primera vez en el año 2000 por Ishibashi y col.¹ en hígado de rata y por Furuichi y col.² en *Arabidopsis*; sin embargo, no fue hasta el año 2009 cuando Calcraft y col.³ postularon su papel como receptores de calcio activados por el ácido nicotínico adenina dinucleótido fosfato (NAADP) en células HEK293.

Se describieron tres diferentes subtipos: TPC1, TPC2 y TPC3.³ TPC1 y TPC3 se encuentran predominantemente en las membranas endosomales, mientras que TPC2 se encuentra generalmente en los lisosomas, por lo que colectivamente se conocen por su distribución endolisosomal.³

Los TPCs son una familia de genes altamente conservados a lo largo del tiempo en las diferentes especies (Figura 1).⁴ Sin embargo, es importante aclarar que a través del filo animal los genes que codifican TPC1, TPC2 y TPC3 no siempre se expresan; ya que mientras que el gen que codifica para TPC3 está ausente en ratones, rata y primates, sí que está presente en la mayoría de los demás mamíferos.³ En humanos y chimpancés las secuencias codificadoras para el tercer NH₂ terminal de TPC3, pueden encontrarse por completo en su genoma y además también se han visto transcritos correspondientes a la primera mitad de la proteína, sin embargo, estas secuencias contienen codones de parada que generarían una proteína truncada, lo que por consiguiente convierte a TPC3 en un pseudogen en estas especies.⁵ Por ello, nuestro estudio se centra en TPC1 y TPC2 ya que ambos subtipos están presentes en humanos, rata y ratón.

ellos con 6 segmentos (S1-S6) (Figura 2).¹

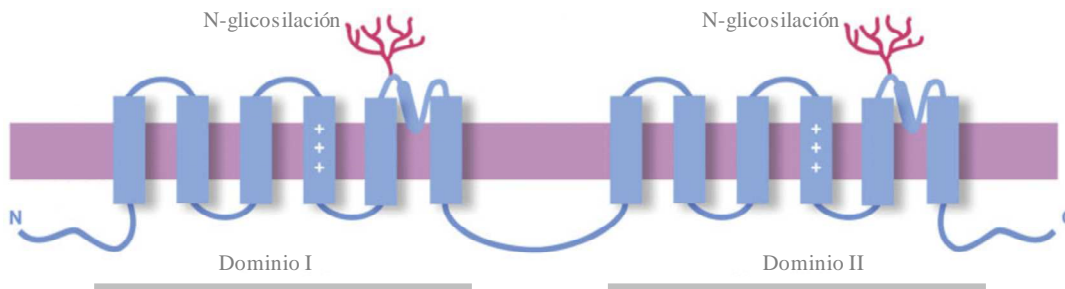


Figura 2. Estructura proteica de los TPCs. Se muestran las posibles glicosilaciones y representados como “+++” los potenciales sensores de voltaje (hélice transmembrana S4).¹⁰

Se consideran canales intermedios entre los canales de cationes de un solo dominio, como los “*transient receptor potential channels* (TRPs)” y los canales de calcio voltaje dependientes de 4 dominios alfa (VGCCs).^{11,12} Por analogía con la organización de estos canales VGCCs, se ha estudiado su posible dimerización y se ha observado, mediante estudios de coimmunoprecipitación y análisis de espectrometría de masas del inmunocomplejo, la presencia de complejos homo- y heterodiméricos entre TPC1 y TPC2 en células humanas HEK293.¹³ Esta heterodimerización fue comprobada por otras técnicas, como la transferencia de energía de resonancia de Föster (FRET) mostrando que ambas proteínas interactúan de forma rotacional simétrica (N- con C-terminal).¹³

En los TPCs se han descrito distintas N-glicosilaciones, en los residuos 599, 611 y 616 (Figura 3).¹⁴ La N-glicosilación consiste en la adición de una cadena de oligosacáridos de complejidad variable a un residuo asparagina de una proteína.¹⁵ Se ha visto que estas modificaciones pueden afectar al plegamiento, estabilidad y función de las proteínas¹⁶ y, por extensión, una mutación en cualquiera de estos residuos puede afectar a la activación de estos canales por NAADP.¹⁴

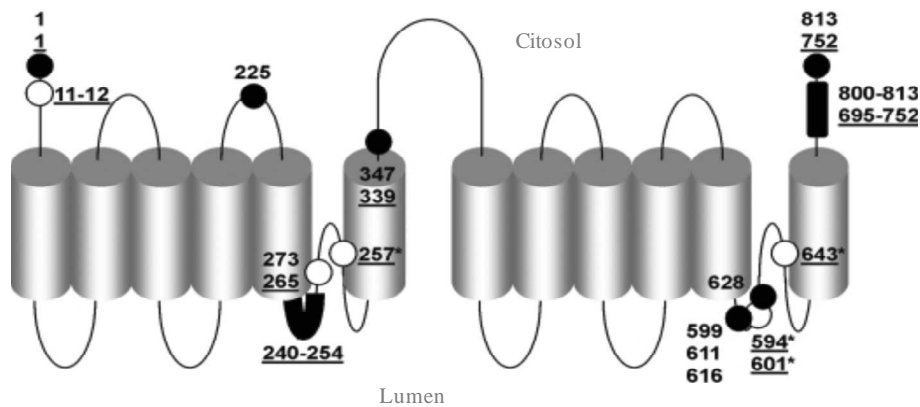


Figura 3. Modelo topológico para los TPCs. Los círculos blancos representan las posiciones de glicosilación identificadas en los distintos estudios (de izquierda a derecha): TPC2 Leu 11-12¹⁷, TPC1 Leu-273¹⁸, TPC2 Leu-265¹⁷, TPC2 Asn-257¹⁹, TPC2 Asn-594, 601²⁰, Glu-643¹⁹. Los números hacen referencia a la posición de los aminoácidos.¹⁴

2. Distribución tisular y localización de los TPCs.

TPC1 y TPC2 se localizan de forma ubicua en la mayoría de los tejidos, ya que se ha observado su presencia en todos los tejidos estudiados.^{1,3,21} Mediante la técnica de *northern blot* se ha descrito que en humano TPC2 se expresa en hígado, riñón, páncreas, timo, colon, músculo esquelético, corazón, cerebro, leucocitos, pulmón, placenta e intestino delgado,³ en rata TPC1 se expresa en hígado, riñón, páncreas, pulmón, corazón, cerebro, músculo esquelético y testículos;¹ y en ratón TPC1 y TPC2 se expresan en hígado, riñón, páncreas, pulmón, corazón, cerebro, timo, testículos y ovarios.²¹

El trabajo de Calcraft y col.³ fue el primero en describir la localización intracelular de los TPCs en células HEK293, usando un anticuerpo anti-TPC2 que mostró una tinción puntiforme en el citoplasma (bloqueada por sus antígenos peptídicos) que se solapaba con la proteína asociada a la membrana de los lisosomas 2 (LAMP2) pero no con marcadores de retículo endoplásmico, aparato de Golgi o mitocondria. Por el contrario, TPC1 mostró una colocalización escasa con TPC2 o LAMP2, encontrándose predominantemente en endosomas.³ En trabajos posteriores también se observó esta colocalización: Brailoiu y col.¹⁸ expresaron la *red fluoresce protein* (RFP) unida a TPC1 y TPC2 (RFP-TPC1 y RFP-TPC2) en oocitos de *Xenopus laevis* y observaron que tanto TPC1 como TPC2 se comportaban como proteínas intracelulares, sin

observarse fluorescencia en la membrana plasmática. Paralelamente observaron colocalización de TPC1 con marcadores de lisosomas (LAMP1), endosomas tardíos (LAMP1) y endosomas (endo-GFP) pero no con marcadores de retículo endoplásmico (DsRed2-KDEL); sin embargo, solo observaron colocalización de TPC2 con LAMP1.¹⁸ Ruas y col.²² también observaron en células HEK293 realizando un marcaje de TPC1 y TPC2 con el *tag mCherry* una colocalización de ambos con *LysoTracker Green* (marcador de organelas ácidas), más concretamente TPC2 colocalizaba con LAMP2 y parcialmente con el marcador de los endosomas de reciclaje (receptor de transferrina); y TPC1 también colocalizaba parcialmente con LAMP2.

En resumen, los TPCs se localizan en las distintas organelas del sistema endolisosomal, estando TPC1 presente en endosomas, endosomas de reciclaje y lisosomas (como se demuestra por su colocalización con marcadores endosomales y lisosomales) mientras que TPC2 se localiza en endosomas tardíos/lisosomas (ya que solo colocaliza con las proteínas de membrana del lisosoma: LAMP1 y LAMP2).^{3,18,21,22} De forma colectiva se conocen como receptores endolisomales, término que agrupa a los endosomas tempranos, tardíos y de reciclaje y, a los lisosomas.³

3. TPCs y sistema endolisosomal.

Los TPCs se han postulado como reguladores de las funciones endosomales y lisosomales debido a su localización endolisosomal, de hecho, Ruas y col.²² observaron que alteraciones en los niveles de expresión de los TPCs inducían bloqueo en el transporte endocítico y que incluso su sobreexpresión daba lugar al alargamiento de lisosomas, procesos característicos de las enfermedades endolisomales.

3.1. Endosomas.

Los endosomas son unos compartimentos membranosos de forma irregular, que tienen un papel clave en la endocitosis, al funcionar como una estación de llegada, clasificación y reparto de moléculas que se comunica con otros compartimentos.²³

El transporte endocítico se ha considerado como un subsistema celular que se encarga de la regulación de la homeostasis, supervivencia, proliferación, diferenciación

y comunicación intracelular.²⁴ Estas funciones las realiza a través de dos procesos claves:

- Suministrando a la célula factores estructurales y nutritivos como azúcares, aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas y otros sustratos.²⁴
- Regulando la comunicación entre el transporte endocítico y las distintas rutas intracelulares: por ejemplo, en la enfermedad de Alzheimer, una endocitosis adecuada permite la formación y eliminación adecuada del factor β -amiloide,²⁵ mientras que, por el contrario, un bloqueo en el transporte endocítico se ha relacionado con la transformación oncogénica,²⁶ con la enfermedad de Huntington y con otras enfermedades neurodegenerativas.²⁷ Otros factores como el estrés oxidativo, los procesos infecciosos o la entrada de liposomas como agentes terapéuticos también están modulados por el transporte endosomal.²⁸⁻³⁰

Las moléculas internalizadas a través de las distintas rutas endocíticas pueden ser recicladas, degradadas vía endosomas y lisosomas tardíos o devueltas a la membrana plasmática: todos estos procesos convergen en el denominado endosoma temprano,³¹ que se puede definir como el primer compartimento en aceptar las sustancias para la endocitosis, siendo una estructura altamente dinámica y pleomórfica que se compone de regiones tubulares (de aproximadamente 60 nm de diámetro) y grandes vesículas (de aproximadamente 400 nm de diámetro) con invaginaciones membranosas que dan lugar a su característica apariencia multivesicular.³² Estas dos estructuras dentro del endosoma temprano son funcionalmente importantes ya que las proteínas para el reciclaje pueden agruparse principalmente dentro de las regiones tubulares, mientras que los elementos multivesiculares están a menudo involucrados en la degradación (Figura 4).³³ Las vesículas generadas a partir de estas dos regiones de membrana, presentan diferencias en cuanto a sus propiedades de acidificación: el pH disminuye de 6.2 a 5.5 en el lumen de los cuerpos multivesiculares, mientras que aumenta en los endosomas de reciclaje tubulares a 6.5.³¹

Aunque la mayoría de los ligandos internalizados se degradan, sus receptores a menudo se reciclan de nuevo a la superficie celular, en ciclos sucesivos de unión a ligando e internalización.³⁴ El pH moderadamente ácido del lumen de los endosomas tempranos permite la disociación entre el ligando y su receptor y esto, unido a la mayor

superficie de la membrana del dominio tubular, hace que los receptores (y otras proteínas de membrana) se acumulen en esta región, permitiendo además que la mayoría de los lípidos y proteínas de membrana vuelvan a la superficie celular.³⁴ Distintos estudios han confirmado la existencia de tres rutas de reciclado hacia la membrana plasmática: una directa desde el endosoma temprano (vía de reciclaje rápido), una indirecta a través del retículo endoplásmico en la que están implicados los endosomas de reciclaje (vía reciclaje lento) y una tercera denominada vía retrógrada, mediante la cual el material que va a ser reciclado pasa previamente por el aparato de Golgi.³⁵ Para alcanzar el aparato de Golgi, las moléculas internalizadas procedentes de la membrana plasmática deben pasar por distintas combinaciones de endosoma temprano, endosoma tardío y/o retículo endoplásmico, dependiendo de las señales del material internalizado (Figura 4).³⁶

Los endosomas que transportan los materiales que van a ser degradados vía lisosoma, maduran y se acidifican para dar lugar a los endosomas tardíos, cuyo material será transferido y degradado a través del lisosoma.³⁷



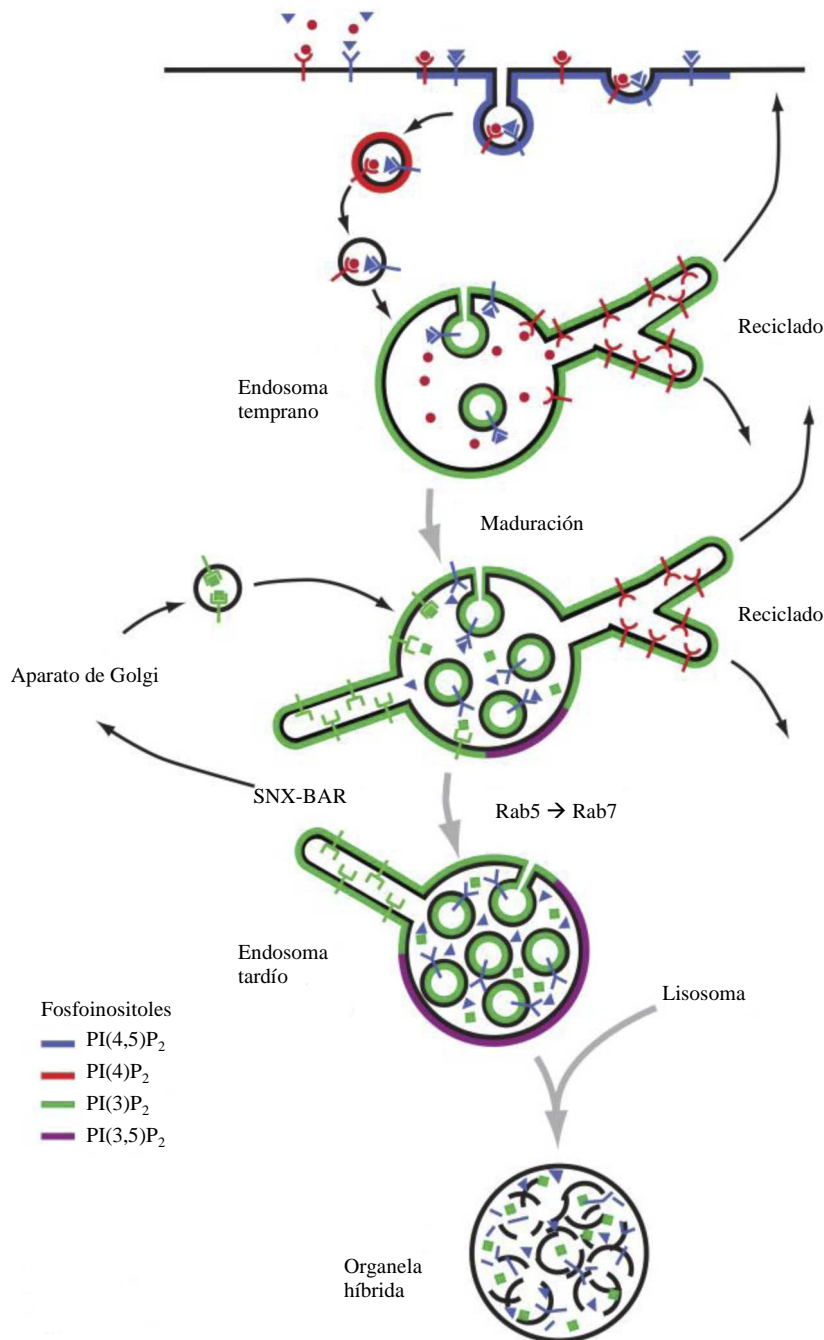


Figura 4. Clasificación endosomal de los ligandos internalizados. El material internalizado destinado para degradación es transportado a las vesículas intraluminares pasando posteriormente al endosoma tardío, hasta que finalmente se degrada. Por otro lado, se puede producir el reciclaje de receptores a través de la vía lenta o rápida y a través del aparato de Golgi. Esta última ruta se suele denominar transporte retrógrado y comprende distintas rutas en las que participan moléculas como Rab9 y SNX-BAR (nexinas de clasificación). En esta representación también se muestran los diferentes fosfoinosítoles implicados en el proceso. PI(4,5)P₂, fosfoinosítoles 4,5-difosfato; PI(4)P₂, fosfoinosítoles 4-fosfato; PI(3)P₂, fosfoinosítoles 3-fosfato; PI(3,5)P₂, fosfoinosítoles 3,5-difosfato.³⁸

Se han propuesto numerosas hipótesis que tratan de explicar los mecanismos de transferencia del material endocitado de los endosomas a los lisosomas:

- Modelo de maduración: postula que el endosoma madura para dar lugar al lisosoma.³⁹
- Modelo de transporte a través de las vesículas: postula que los endosomas tempranos, los endosomas tardíos y los lisosomas son compartimentos estables, en los que el transporte de materiales desde el endosoma primario hasta el endosoma tardío (que puede madurar hasta convertirse en un lisosoma) o hasta el lisosoma, se realiza a través de una vesícula transportadora endosomal con características de cuerpo multivesicular.³⁹
- Modelo “kiss and run”: este modelo propone que los endosomas y lisosomas sufren ciclos repetidos de fusión y fisión, lo que permite la transferencia de materiales y el mantenimiento de los lisosomas.⁴⁰
- Modelo “kiss and run” modificado: este modelo postula la existencia de una fusión entre el endosoma tardío y el lisosoma, que conduce a la formación de una organela híbrida que, finalmente da lugar a la reformación del lisosoma.⁴¹

Estos modelos no son exclusivos entre sí y es posible que las células empleen más de uno de estos procesos para la transferencia de material entre los endosomas y los lisosomas (Figura 5).

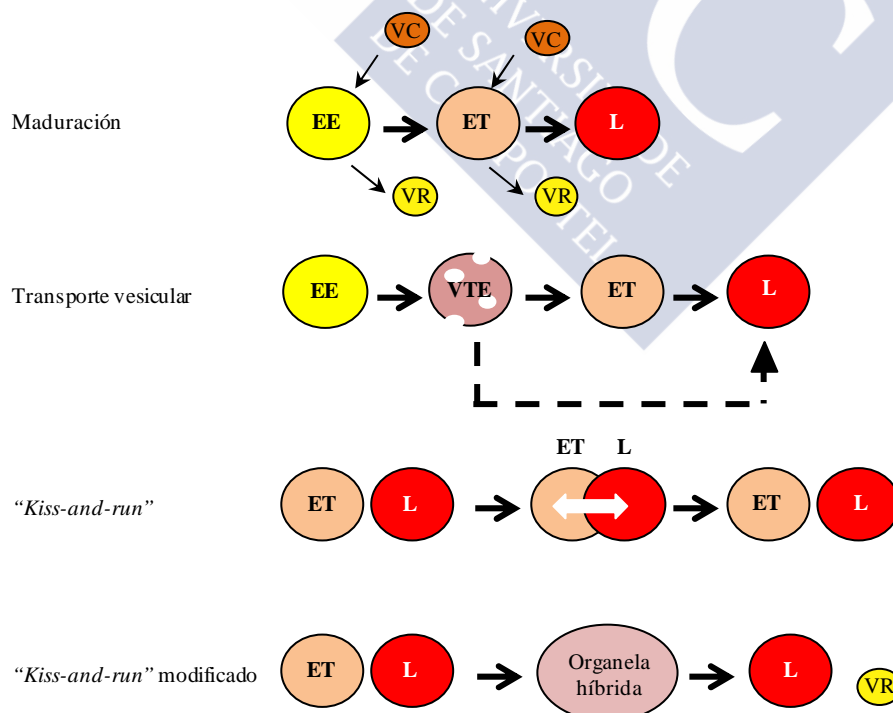


Figura 5. Modelos de transferencia de material entre los endosomas y los lisosomas. EE, endosoma temprano; ET, endosoma tardío; L, lisosoma; VTE, vesicular transportadora endosomal; VC, vesícula de carga; VR, vesícula de reciclaje.⁴²

Reguladores del tráfico endosomal.

Los mecanismos concretos encargados de regular la endocitosis son múltiples y complejos y todavía no se conocen con exactitud, pero podemos centrarnos en tres reguladores principales: pequeñas GTPasas, fosfoinositoles y calcio.

Pequeñas GTPasas.

Las GTPasas son unas enzimas de tipo hidrolasa que tienen dos estados funcionales: uno activo, con GTP unido, y uno inactivo, con GDP unido, siendo los factores intercambiadores de nucleótido guanidina (*GEF*, del inglés *guanine nucleotide exchange factor*) los que catalizan el intercambio de GDP por GTP (iniciador de la actividad).⁴³ En el estado activo reclutan otros efectores, que a su vez van a ayudar al tráfico vesicular.⁴³ Dentro de las GTPasas se incluyen diversas subfamilias que se encargan principalmente de la regulación del tráfico de membrana; entre ellas, está la superfamilia de Ras unidas a pequeñas GTPasas, siendo Rab, Arf/Sar, Ral y Rho las más estudiadas.⁴⁴

Las proteínas Rab son las más numerosas (se conocen más de 60 tipos distintos en humanos)⁴⁵ y regulan eventos secuenciales en la maduración del endosoma, incluyendo el transporte de vesículas a través del citoesqueleto y la fusión entre las mismas.⁴⁴ Por ejemplo, el cambio de Rab5 a Rab7 es un proceso clave en la iniciación de la maduración del endosoma.⁴⁶ Los Rabs también reclutan factores de anclaje que se acoplan a las vesículas antes de su fusión (Figura 6A) para acelerar e incrementar la eficiencia de la misma, regulando así a SNARE (acrónimo del inglés de *SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) Receptor*).⁴⁷ De esta forma, las proteínas Rab GTPasas y los fosfoinositoles ayudan al mantenimiento de la identidad de las vesículas intracelulares, necesaria para el reclutamiento de otros efectores específicos.²³

Las proteínas Arf son la subfamilia más divergente de Ras GTPasas y suelen controlar el inicio de la formación de las vesículas.⁴⁴ Las Ral GTPasas se encuentran solo en células animales y juegan un papel tanto en la endocitosis como en la exocitosis.⁴⁸ Finalmente se conocen más de 20 Rho GTPasas en humanos, que actúan en el tráfico de vesículas, la polaridad celular, la migración celular, apoptosis y en el

transporte de virus.⁴⁹

Fosfoinositoles.

Los fosfoinositoles son lípidos de membrana poco abundantes que se localizan en compartimentos específicos de la ruta endocítica.⁵⁰ Existen 7 tipos diferentes según la combinación de fosforilaciones en las posiciones 3, 4 y 5 de los inositoles. PI(3)P se encuentra en el lado citoplasmático de los endosomas tempranos y tardíos y en los recién formados fagosomas y autofagosomas (que se explicarán más adelante).⁵¹ PI(4)P se localiza en la cara citoplasmática del aparato de Golgi.⁵² La localización de PI(5)P es la menos estudiada, sin embargo, se ha visto que tiene un papel clave en la señalización nuclear y en el dinamismo de la membrana.⁵³ PI(3,4)P₂ y PI(3,4,5)P₃ se generan transitoriamente tras la activación de receptores de membrana, mientras que PI(4,5)P₂ es relativamente abundante en la membrana plasmática y participa en diversas funciones específicas de la misma.⁵⁴ Finalmente, PI(3,5)P₂ se genera en los endosomas tardíos y en los lisosomas, usando como sustrato el PI(3)P.⁵⁵

Los fosfoinositoles son capaces de regular el tráfico vesicular a través de al menos dos mecanismos distintos: en primer lugar, son capaces de reclutar proteínas citoplasmáticas efectoras que funcionan en compartimentos específicos y que son capaces de iniciar y terminar procesos de tráfico vesicular de forma secuencial;⁵⁴ y, en segundo lugar, los fosfoinositoles pueden regular directamente la actividad de proteínas de membrana, entre las que se incluyen los canales iónicos y los transportadores.⁵⁶ De esta forma se ha postulado que el PI(3,5)P₂ podría regular la actividad de la familia de los canales de cationes de potencial de receptor transitorio, de la subfamilia mucolipinas (TRPML) y de los TPCs.^{57,58} Asimismo, un incremento en los niveles de PI(3,5)P₂ podría inducir la liberación de calcio, lo cual podría dar lugar a la fusión de membranas (Figura 6).³⁷

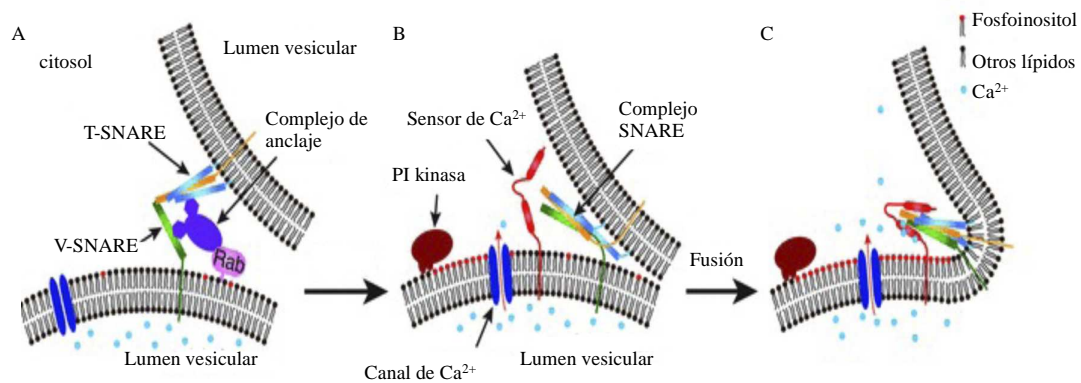


Figura 6. Mecanismo propuesto para la fusión entre membranas llevada a cabo por los fosfoinosítoles y el calcio. **A.** La iniciación de la fusión vesicular está mediada por la cooperación entre las proteínas Rab y los factores de anclaje, que coordinan el ensamblaje del complejo SNARE (*Soluble NSF Attachment Protein Receptor*). **B.** Una vez que se produce el ensamblaje del complejo SNARE, las vesículas están listas para fusionarse. **C.** Un incremento en la concentración de PI(3,5)P₂ activa el flujo de calcio hacia el citosol, lo que podría desencadenar la fusión de vesículas. PI Kinasa, fosfoinositol kinasa; PI(3,5)P₂, fosfoinositol 3,5-difosfato.³⁷

Calcio.

El ion calcio es quizás el mensajero intracelular más versátil en eucariotas, ya que regula numerosos procesos como son el ciclo celular, el transporte, la motilidad, la expresión de distintos genes y el metabolismo.⁵⁹ Las células responden a diversos estímulos mediante cambios en la concentración de calcio libre, siendo importante también la velocidad, magnitud, frecuencia y los patrones espacio-temporales de la señal.⁶⁰ Otro aspecto a tener muy presente es el papel que pueden tener como reservorios y movilizadores de calcio las diferentes organelas intracelulares como el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, los endosomas, los lisosomas, los peroxisomas, los gránulos secretores y la mitocondria.⁶⁰

El retículo endoplásmico además media otros procesos intracelulares como la autofagia y el tráfico de membrana,⁶¹ y es capaz de comunicarse con otros reservorios de calcio como los lisosomas.⁶² Sin embargo, poco se conoce sobre como se regula el calcio lisosomal, aunque se ha visto que después de la endocitosis, los endosomas tempranos pierden rápidamente el calcio, acidificándose para dar lugar a endosomas maduros.⁶³ Por el contrario, el incremento del pH lisosomal conduce a un aumento del calcio lisosomal, lo que pone de manifiesto que el balance iónico es importante para el mantenimiento de los depósitos lisosomales de calcio.⁶⁴

Además, la concentración de otros iones como el sodio y en zinc en los endosomas y lisosomas podría ser importante para el tráfico vesicular, ya que podría influir sobre el potencial de membrana y por lo tanto sobre el pH.^{58,65}

3.2. Lisosomas.

Los lisosomas, descritos por primera vez por Christian de Duve⁶⁶ en los años 50, se han considerado como organelas citoplasmáticas de alta capacidad degradativa (Figura 7).⁶⁷ La degradación es llevada a cabo por más de 60 hidrolasas ácidas (proteasas, lipasas, glicosidasas, peptidasas, nucleasas y sulfatasas) cuya acción conjunta permite la degradación de todo tipo de macromoléculas.⁶⁷ Las hidrolasas mejor caracterizadas son las catepsinas, que se dividen en 3 grandes grupos atendiendo al aminoácido que se encuentre en su sitio activo: serina (A y G), cisteína (B, C, F, H, K, L, O, S, V, W y X) y aspartato (D y E). La catepsinas D, B, C, H y L se expresan de forma ubicua y son las proteasas más abundantes.⁶⁸

En la bicapa lipídica que compone la membrana lisosomal se encuentran diversas proteínas de gran importancia para la conservación y funcionamiento del lisosoma:

- Una serie de proteínas altamente glicosiladas conocidas como LAMPs (*lysosomal-associated membrane proteins*; LAMP1, LAMP2 y CD36/LAMP3), que parecen tener un papel muy importante en la protección de la membrana contra las enzimas hidrolíticas; sin embargo, siguen siendo objeto de estudio.⁶⁹
- Proteínas que median el transporte de iones, amino ácidos y otros solutos a través de la membrana para mantener el pH luminal entre 4.6-5.0.⁷⁰

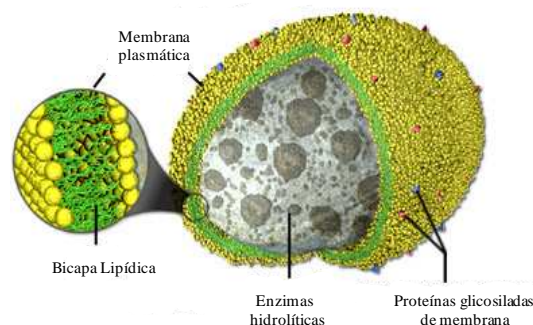


Figura 7. Representación esquemática de la anatomía de un lisosoma. <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/lysosomes/lysosomes.html>

Los lisosomas son orgánulos morfológicamente heterogéneos, que comparten la mayoría de sus propiedades con un grupo de organelas (“*lysosome-related organelles*”) específicas de cada tipo celular como son los melanosomas, gránulos líticos, compartimentos del complejo mayor de histocompatibilidad clase II, gránulos densos de las plaquetas, gránulos de los basófilos y gránulos azurófilos de los neutrófilos (Figura 8).⁷¹

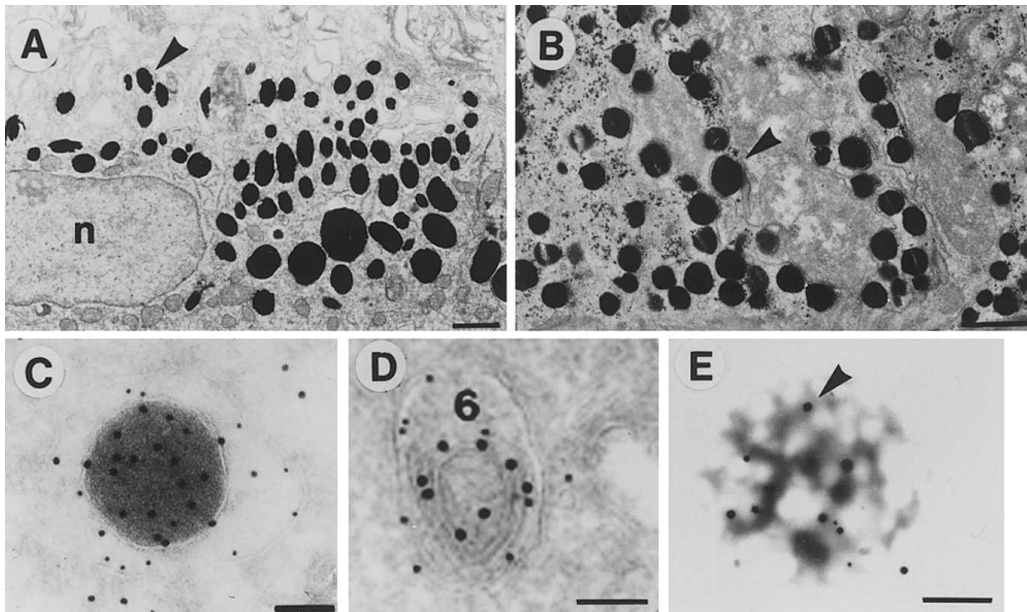


Figura 8. Morfología de las organelas relacionadas con los lisosomas. **A.** Imagen de microscopía electrónica de melanosomas del epitelio pigmentario retinal en ratón. La flecha señala un melanosoma individual. n: núcleo. Escala: 1 μ m. **B.** Imagen de microscopía electrónica de los gránulos pigmentarios visuales en una sección longitudinal del ojo de *Drosophila*. La flecha señala un gránulo pigmentario individual. Escala: 1 μ m. **C.** Imagen de criomicroscopía electrónica con oro de un gránulo lítico de una célula T citotóxica doblemente marcada con LAMP1 (con pequeñas partículas de oro) y con granzyme B (con grandes partículas de oro). Escala: 100 nm. **D.** Imagen de criomicroscopía de oro de un complejo multilamelar (tipo 6) del complejo mayor de histocompatibilidad clase II en un linfoblasto B humano. Escala: 100 nm. **E.** Imagen de microscopía electrónica (*whole-mount*) de una plaqueta en donde se observan los gránulos densos individuales. Escala: 2 μ m.⁷¹

Regulación lisosomal.

La biogénesis de los lisosomas requiere un reemplazo constante de nuevas hidrolasas y proteínas de la membrana lisosomal a través de la ruta del retículo endoplásmico, aparato de Golgi, membrana plasmática y endosomas.⁷² Recientemente se han definido un grupo de genes específicos que reciben el nombre de coordinadores de la expresión y regulación del lisosoma (CLEAR), que se caracterizan por tener la

secuencia “GTCACGTGAC”.⁷³ De esta forma, el factor de transcripción EB (TFEB) puede entrar en el núcleo y unirse a dichas secuencias e inducir la transcripción de estos genes.⁷³ Existen aproximadamente 500 genes que son diana de TFEB entre los que se incluyen genes relacionados con la autofagia y la biogénesis lisosomal, por ello se considera a TFEB un regulador clave en la función lisosomal.⁷⁴

Los lisosomas se diferencian de los endosomas en el grado de acidificación, poseen un mayor número de proteínas lisosomales de membrana (LAMP1, LAMP2) y contienen receptores de membrana manosa 6-fosfato (M6PR).⁷⁵ La mayoría de las hidrolasas ácidas lisosomales requieren una modificación previa con residuos manosa 6-fosfato (M6P), que le permite el reconocimiento por parte de los receptores específicos de M6P presentes en la red de trans Golgi y en los lisosomas, lo que asegura su transporte al sistema lisosomal.⁷⁶ Además, numerosas evidencias sugieren la existencia concomitante de otros receptores alternativos como sortilin o la proteína lisosomal integral de membrana LIMP2, que también podrían mediar el transporte de proteínas hacia el lisosoma.⁷⁶

Enfermedades lisosomales.

A pesar de la estrecha regulación a la que están sometidos los lisosomas, cualquier perturbación en su homeostasis debida a mutaciones genéticas da lugar a una familia de enfermedades conocidas con el nombre de enfermedades de depósito lisosomal (del inglés *lysosomal storage disease*, LSDs).⁷⁵ Existen aproximadamente 50 enfermedades lisosomales reconocidas con una prevalencia de 1:8000 nacimientos.⁷⁷ En ellas, se pueden producir tanto deficiencias en enzimas lisosomales como en proteínas no enzimáticas, conduciendo al acúmulo de sustratos macromoleculares.⁷⁵ Cuando existe un acúmulo elevado de macromoléculas/monómeros en los endo/autolisosomas, se produce una inhibición de las enzimas catabólicas y permeasas (aunque no exista una deficiencia genética de las mismas) lo que resulta en la acumulación secundaria de sustratos.⁷⁸

A nivel cardíaco se conocen la enfermedad de Fabry, la gangliosidosis, la enfermedad de Krabbe, las mucopolisacaridosis, mucopolidosis tipo II y IIA y la enfermedad de Danon.⁷⁹

Como hemos mencionado anteriormente, el material exógeno llega a los lisosomas a través de la ruta endocítica; sin embargo, los componentes intracelulares llegan al lisosoma a través de la autofagia.⁸⁰ De hecho, ya en 1992 se postuló que la endocitosis podría estar acoplada a la autofagia:⁸¹ ambas se encargan de la nutrición celular, convergen en el lisosoma y comparten numerosas moléculas reguladoras, sin embargo, la interconexión definitiva entre ambos procesos fue confirmada por la demostración de la fusión entre los autofagosomas y los endosomas tanto tempranos como tardíos.⁸²

4. Sistema endolisosomal y autofagia.

A nivel celular existen dos rutas principales que se encargan de la regulación del catabolismo proteico en eucariotas: el sistema ubiquitina-proteasoma y el sistema autofagia-lisosoma. El sistema ubiquitina-proteasoma sirve como principal ruta de degradación de proteínas de vida media corta, reguladoras o dañadas,⁸³ mientras que la autofagia es responsable de la degradación de proteínas de vida media larga, manteniendo la homeostasis durante situaciones de estrés como la privación energética.⁸⁴ A pesar de que se han considerado rutas independientes durante mucho tiempo, estudios recientes han postulado su interconexión ya que ambos procesos utilizan marcadores de degradación comunes como la ubiquitina.⁸⁵⁻⁸⁷

El término autofagia, que etimológicamente deriva de las palabras griegas auto- (uno mismo) y -fagia (comer) (literalmente “comerse a sí mismo”) se puede definir como un proceso degradativo mediado por lisosomas que evolutivamente se ha conservado y que se encarga de la regulación de la homeostasis celular.⁸⁸ De esta forma, en condiciones basales se encarga de la degradación de proteínas de vida media larga y organelas disfuncionales, pero en condiciones de estrés, genera sustratos energéticos (al degradar los constituyentes celulares) y elimina las organelas dañadas, lo que finalmente promueve la supervivencia celular.⁸⁹ Sin embargo, la excesiva activación de la autofagia puede conducir a la depleción de moléculas y organelas esenciales, lo que finalmente podría dar lugar a la muerte celular.⁹⁰

En todas las células eucariotas la autofagia ocurre como un proceso constitutivo que controla el reemplazo normal de los componentes intracelulares y el mantenimiento de un adecuado balance energético celular,⁹¹ e incluso tiene un papel clave en el

desarrollo de la respuesta inmune innata y adaptativa.⁹² Existen tres grandes tipos de autofagia, que se diferencian en la forma en la que los distintos materiales llegan al lisosoma:

- Autofagia mediada por chaperonas. Se produce por la translocación directa de proteínas citosólicas que contienen la secuencia pentapéptida KFERQ a través de la membrana lisosomal (Figura 9).⁹³
- Microautofagia. La membrana lisosomal experimenta una deformación/reordenamiento local para capturar directamente porciones de citoplasma con sus constituyentes.⁹⁴ El mecanismo molecular por el cual se produce este proceso se desconoce, aunque se ha visto que puede estar implicado en el reciclaje de peroxisomas en condiciones muy específicas en hongos.⁹⁴ Asimismo una microautofagia “especial” dependiente de endosoma parece tener un papel importante en la incorporación de proteínas citosólicas solubles al endosoma tardío (Figura 9).⁹⁵
- Macroautofagia selectiva o no selectiva, generalmente conocida como autofagia (Figura 9). La autofagia no selectiva se encarga de degradar porciones de citoplasma, mientras que, la autofagia selectiva, se encarga de degradar orgánulos citoplasmáticos que contiene receptores de reconocimiento.⁹⁶ Este tipo de autofagia selectiva se puede clasificar en distintos subgrupos atendiendo al tipo de material citosólico que va a ser degradado: retículo endoplásmico (reticulofagia), peroxisomas (peroxifagia), mitocondria (mitofagia), lípidos (lipofagia), gránulos secretores (zimofagia), partes del núcleo (nucleofagia), patógenos (xenofagia), ribosomas (ribofagia) y agregados de proteínas (agrefagia).⁹⁷

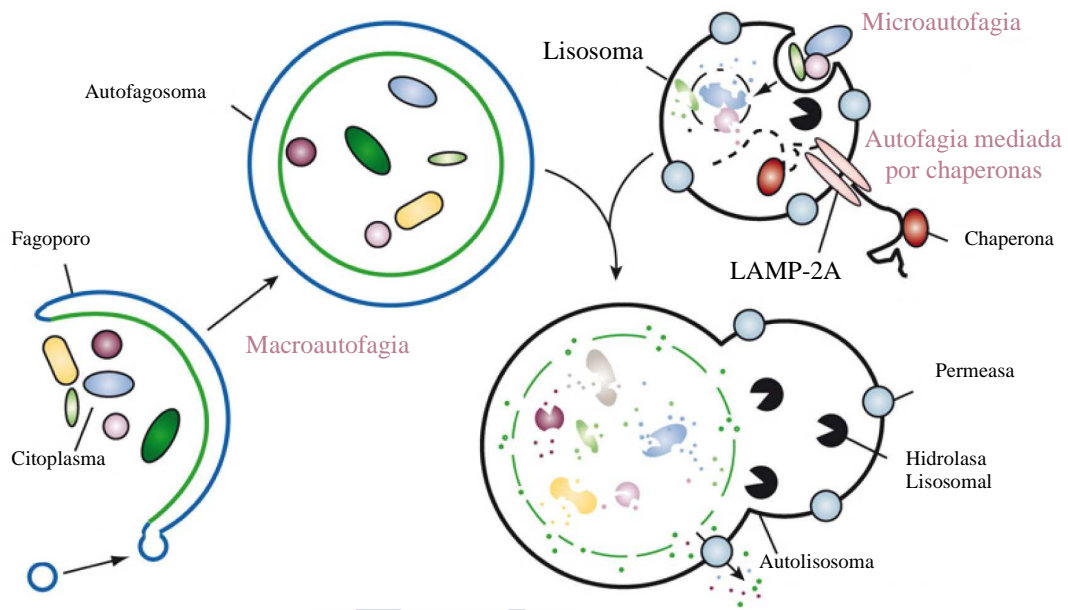


Figura 9. Representación de los distintos tipos de autofagia. La autofagia mediada por chaperonas requiere la acción tanto de la chaperona hsc70 (chaperona de choque térmico de 70 kDa) como del receptor lisosomal integral de membrana LAMP2A (proteína de membrana lisosomal tipo 2A).⁸⁹

La autofagia comienza con la formación del fagoporo (estructura con doble membrana osmófila), que deriva de una región específica del retículo endoplásmico llamada omegasoma.⁹⁸ Aunque pueden existir otras fuentes de membranas como el aparato de Golgi,⁹⁸ la mitocondria⁹⁹ o la membrana plasmática,¹⁰⁰ es el retículo endoplásmico el que cuenta con la maquinaria necesaria para la formación del fagoporo (Figura 10). Una vez que se ha producido la expansión y separación del fagoporo, este secuestra material citoplasmático y organelas, produciéndose la fusión de los bordes y formando el denominado autofagosoma.¹⁰¹ Posteriormente, el autofagosoma se fusiona con compartimentos de la ruta endocítica y con el lisosoma para dar lugar al autofagolisosoma o autolisosoma (Figura 10).¹⁰¹

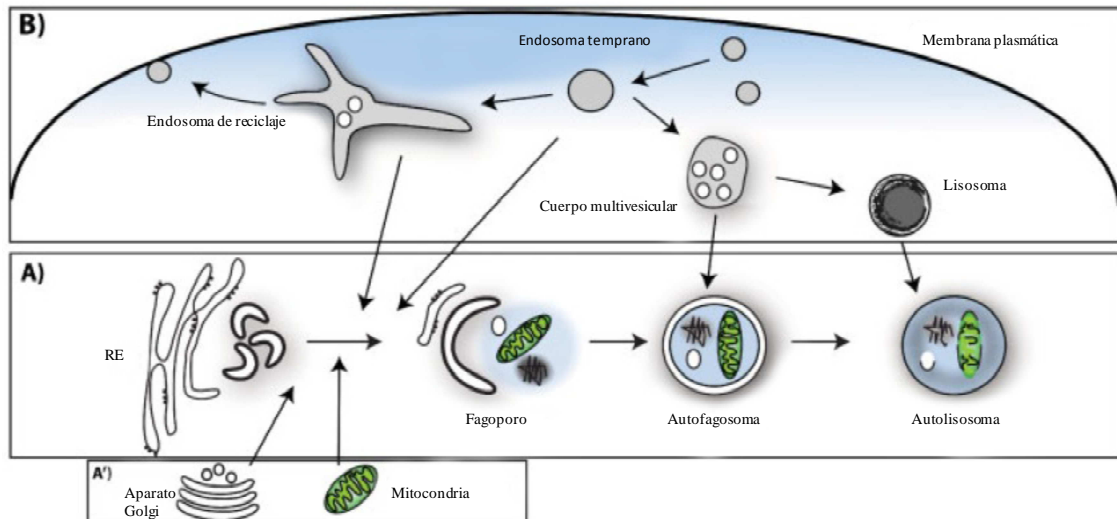


Figura 10. Representación esquemática de la relación entre la endocitosis y la autofagia. **A.** Los fagoporos se forman a partir del retículo endoplásmico, y en menor medida a partir del aparato de Golgi y de la mitocondria (A'). Los endosomas de reciclaje y los endosomas tempranos también contribuyen a la formación del fagoporo que da lugar al autofagosoma, que a su vez; también puede fusionarse con compartimentos endocíticos (**B**), como el endosoma temprano, el endosoma tardío y los lisosomas para dar lugar al autolisosoma.¹⁰¹

4.1. Mecanismo de autofagia.

El mecanismo de autofagia involucra la acción coordinada de al menos 18 genes relacionados con la autofagia o también denominados Atgs, agrupados con sus respectivos complejos:

1. El complejo Atg/ULK (del inglés *Unc-51-like kinase*).
2. Beclin 1/clase III de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K).
3. Dos proteínas transmembrana: Atg9 y la proteína de membrana vacuolar 1 (VMP1).
4. Dos sistemas de conjugación de proteínas (Atg12 y Atg8/LC3).
5. Proteínas que median la fusión entre los autofagosomas y los lisosomas.

4.1.1. El complejo Atg/ULK.

El complejo 1 de mTOR (mTORC1) (formado por mTOR (diana de rapamicina en células de mamífero, del inglés *mammalian target of rapamycin*), Raptor (*regulatory-associated protein of mTOR*), mLST8/GβL (*target of rapamycin complex subunit*

LST8), Deptor (*DEP domain-containing mTOR-interacting protein*) y PRAS40 (*proline rich Akt substrate 40*) juega un papel clave en la autofagia, al actuar sobre el complejo inductor ULK1/2.¹⁰² De esta forma, en condiciones nutricionales adecuadas, mTORC1 tiene actividad kinasa e interactúa con un complejo formado por ULK1/2, Atg13, FIP200 (*FAK-family interacting protein of 200 kDa*) y Atg101 (Figura 11A), sin embargo, cuando existe privación energética, mTORC1 se inhibe y se disocia del complejo ULK1/2, lo que conduce a la defosforilación de sitios específicos de ULK1/2 y a su activación. Esta activación catalítica de ULK1/2 media la fosforilación de otros residuos de Atg13 y FIP200 (Figura 11A).¹⁰³ Una posibilidad, es que el complejo ULK1/2 también pueda ser directamente regulado por la proteína quinasa activada por AMP (AMPK).¹⁰⁴ Aunque todavía no se conocen con exactitud los procesos mediante los cuales ULK1/2 activa a otros efectores, lo que sí se sabe es que fosforila a Ambra1 (*autophagy/beclin-1 regulator 1*), que forma parte del complejo Beclin1/Clase III PI3K (Figura 11A).¹⁰⁵

4.1.2. Beclin1/Clase III PI3K.

El “corazón” del complejo de Beclin1/clase III PI3K contiene a Beclin1, Vps15 (*serine/threonine-protein kinase VPS15*), Vps34 (fosfatidilinositol 3-kinasa VPS34) y probablemente a Ambra1.¹⁰⁵ Este complejo se forma por la activación alostérica de la clase III de PI3K, Vps34 (que genera PI3P), que a su vez recluta como efectores a la proteína 1 con doble dominio FYVE (DFCP1) y a la proteína 1 con dominio WD (WIPI) que interacciona con los fosfoinosítoles para ayudar a la formación incipiente del autofagosoma (Figura 11B).^{106,107}

Simultáneamente, existen numerosas proteínas que interaccionan con Beclin1 y que, por lo tanto, actúan activando o inhibiendo la autofagia. Como activadores está Atg14 que es esencial para el funcionamiento de PI3K, y por lo tanto, para la inducción de la autofagia,¹⁰⁸ el gen asociado a la resistencia a la irradiación por ultravioletas (UVRAG)¹⁰⁹ y el factor 1 de interacción con BAX (Bif-1) que actúan como reguladores positivos del complejo PI3K.¹¹⁰ Como reguladores negativos están la proteína con un dominio RUN (Rubicon)¹¹¹ y diversos miembros de la familia antiapoptótica (Figura 11B).¹¹²

4.1.3. *Atg9 y VMP1.*

Atg9 es capaz de proveer de lípidos procedentes de distintos compartimentos subcelulares a la membrana del fagoporo.¹¹³ El mecanismo exacto por el que realiza su función no se conoce con exactitud pero se postula que puede necesitar al complejo Atg/ULK1 y la actividad kinasa de Vps34 o al complejo Beclin1.¹¹³

Por otro lado, VMP1 puede funcionar como una proteína transmembrana reclutando a Beclin1 y otros componentes de su complejo hacia el fagoporo.¹¹⁴

4.1.4. *Conjugación de proteínas.*

La conjugación de proteínas forma parte del proceso de elongación de la vesícula, para el cual se necesitan dos vías de conjugación. La primera vía consiste en la conjugación covalente de Atg12 y Atg5, mediante la acción de Atg7 y Atg10, las cuales actúan como enzimas activadoras y conjugadoras, respectivamente (Figura 11C).¹¹⁵ Una vez conjugadas reclutan a Atg16 de forma no covalente, para dar lugar al complejo Atg12-Atg5-Atg16, que funciona como la ligasa de LC3 (Figura 11C).¹¹⁶ Asimismo, la cisteína proteasa (calpaína) cuyos niveles son calcio dependientes, es la encargada de inactivar a Atg5.¹¹⁷


La segunda vía conlleva la conjugación de fosfatidiletanolamina (PE) a un residuo glicina de LC3 mediante una acción secuencial de Atg4, Atg7 y Atg3, lo que conduce a la conversión de la forma soluble de LC3 (llamada LC3I) en la forma asociada a las vesículas autofágicas LC3II (Figura 11C).¹¹⁵ Esta forma lipidada de LC3 es estable cuando está asociada con el autofagosoma, de ahí que su detección bioquímica y microscópica sea ampliamente usada para medir autofagia celular.¹¹⁸

Las partículas u orgánulos que van a ser degradados vía autofagia selectiva necesitan estar correctamente colocados en la superficie interior del fagoporo en crecimiento, para lo cual necesitan a la proteína adaptadora p62 o *Sequestosome-1* (p62/SQTM-1, en adelante p62) que es capaz de interactuar tanto con LC3II como con las proteínas poliubiquitiniladas destinadas a ser degradadas mediante autofagia;¹¹⁹ lo que conduce al secuestro de los agregados proteicos dentro de las vesículas autofágicas y posteriormente se degrada vía lisosomal (Figura 11D).¹²⁰ Como p62 es

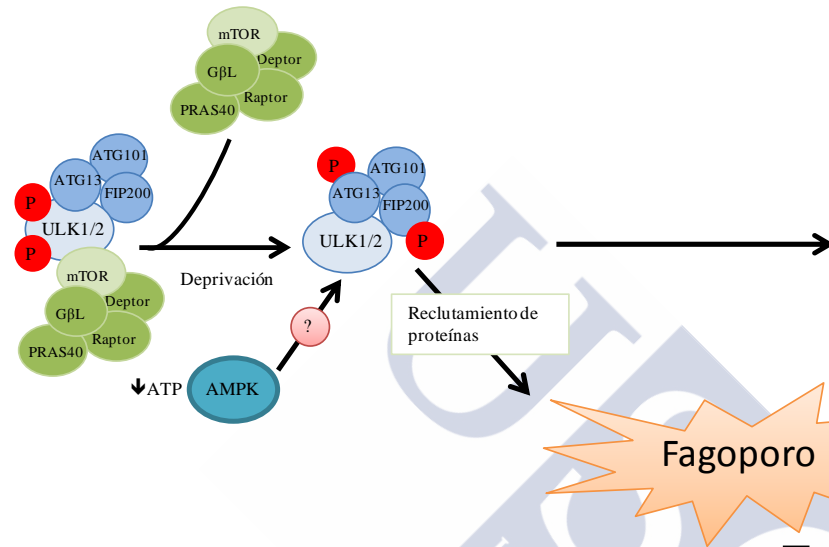
eliminado del citoplasma principalmente vía autofagia, se considera que correlaciona negativamente con los niveles de autofagia.¹²¹ Por lo tanto, la acumulación de inclusiones de p62 por inmunocitoquímica o niveles elevados de p62 detectados por western blot se usan generalmente como marcadores de una deficiencia en la autofagia.¹²²

4.1.5. Proteínas que median la fusión entre los autofagosomas y los lisosomas.

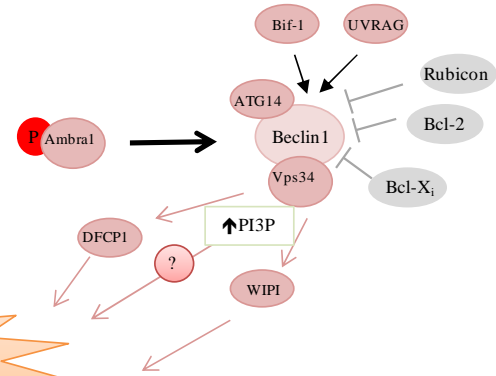
La syntaxina 17 es un tipo de proteína SNARE (factores de anclaje) necesaria para la maduración de los autofagosomas mediante su interacción con el complejo HOPS (*homotypic fusion and protein sorting*) encargado de la fusión de membranas.¹²³ Una vez que los autofagosomas están maduros, LAMP2 y la GTPasa Rab7 inducen la fusión del autofagosoma con el lisosoma, el cual aporta las hidrolasas necesarias para realizar el proceso de degradación de los componentes contenidos en el autofagosoma.¹²⁴ Finalmente, los productos de la degradación salen al citosol a través de las permeasas para ser reutilizados por la célula.¹²⁴



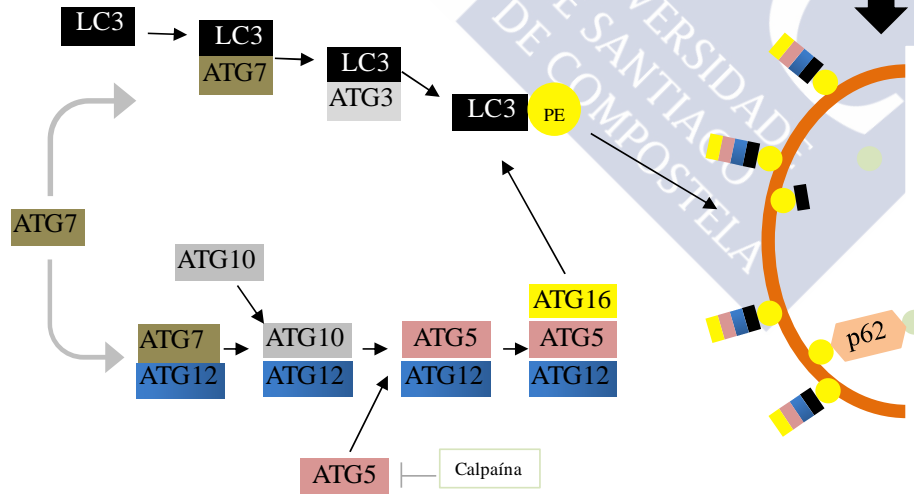
A



B



C



D

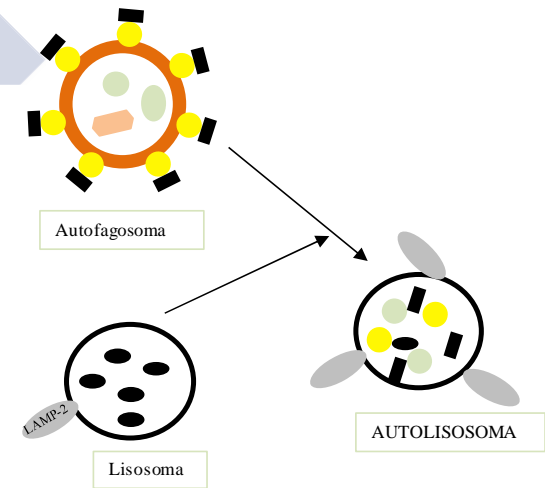


Figura 11. Componentes de la autofagia en mamíferos. La inducción de la autofagia producida por la privación energética, modula la interacción inhibitoria de TORC1 con el complejo ULK1/2. A través de la fosforilación de Ambra1 y posiblemente a través de otras interacciones con el complejo ULK1/2 (A) se regula la actividad de Beclin1/PI3K clase III. B. Beclin1 interacciona con distintos factores activadores (rosa) o represores (gris) que modulan su unión a Vps34 (la unidad catalítica de PI3K). Además de estos complejos, la formación del autofagosoma requiere de dos sistemas de conjugación (Atg12 y Atg8/LC3) y dos proteínas transmembrana (Atg9 y VMP1). C. Mientras que el papel de Atg9 y VMP1 no se conoce con exactitud, los dos sistemas de conjugación son imprescindibles para la biogénesis del fagoporo. Además el sistema Atg8/LC3 es necesario para el transporte y maduración del autofagosoma, así como para la selección del material autofágico. D. Los autofagosomas maduros pueden fusionarse con endosomas tardíos (para dar lugar a anfisomas) y/o con los lisosomas que son los que tienen actividad hidrolítica lo que les permite degradar los distintos materiales.¹⁰³

4.2. Marcadores de autofagia.

Papel de LC3 en la autofagia eucariota.

La *microtubule-associated protein 1 light chain 3* (LC3) se sintetiza en un primer momento como forma no procesada proLC3, posteriormente se modifica proteolíticamente mediante la eliminación de aminoácidos del extremo C-terminal dando lugar a LC3I, que durante la inducción de la autofagia sufre un proceso de lipidación covalente mediado por Atg7, por el cual se le añade un resto fosfatidiletanolamina (PE), dando lugar a la forma conjugada LC3II que se asocia con el autofagosoma (y con el fagoporo).¹²⁵ Este proceso de lipidación puede detectarse mediante western blot, ya que la forma lipidada migra más rápidamente y por lo tanto puede observarse a un peso molecular inferior, lo que permite determinar tanto la forma libre como la lipidada de LC3.¹²¹ La asociación de LC3II con los autofagosomas también puede determinarse cuantificando el incremento en LC3-*puncta* usando anticuerpos específicos o midiendo la fluorescencia en células transfectadas con GFP-LC3.¹²¹ Los principales trabajos que determinan autofagia en tejidos utilizan ratones transgénicos que expresan el *reporter* GFP-LC3 a través de un promotor constitutivo, de esta forma Mizushima y col.¹²⁶ demostraron la presencia de autofagia *in vivo* y demostraron que la privación de nutrientes en estos animales inducía autofagia en tejidos como el hígado, corazón, páncreas, músculo y riñones.

La limitación de LC3II como marcador reside en que, a pesar de que proporciona una lectura aproximada del número de autofagosomas, no proporciona información sobre el flujo autofágico.¹²⁷ El flujo autofágico es el proceso dinámico de síntesis de

autofagosomas, de llegada de sustratos autofágicos al lisosoma y la posterior degradación de los mismos dentro del lisosoma, y su medida constituye un marcador más fiable de la actividad autofágica que simplemente constatar el número de autofagosomas.¹²⁸ El flujo autofágico puede determinarse midiendo mediante western blot los niveles de LC3II en presencia y ausencia de inhibidores de la actividad lisosomal,¹²⁹ que pueden clasificarse en: inhibidores de proteasas (pepstatin A y E-64d¹³⁰), compuestos como la bafilomicina A1, la cloroquina¹³¹ o el NH₄Cl¹³² que neutralizan el pH lisosomal y/o agentes que bloquean la fusión del lisosoma con el autofosoma (la bafilomicina A1 en última instancia también causa un bloqueo en la autofagia al neutralizar el pH lisosomal¹³³). De esta forma, se dice que existe flujo autofágico cuando existe un incremento en los niveles de LC3II con un tratamiento en particular en presencia de un inhibidor, respecto al tratamiento solo. Por el contrario, cuando no se produce este incremento en presencia de un inhibidor se dice que hay un bloqueo autofágico.¹²¹

Otra medida, pero en este caso indirecta, del flujo autofágico consiste en la cuantificación de p62.

Papel de p62 en la autofagia eucariota.

p62 es una proteína adaptadora que funciona modulando la actividad de diversas enzimas gracias a la diferente actividad de sus dominios: un dominio C-terminal de unión a ubiquitina,¹³⁴ un dominio de interacción con LC3,¹¹⁹ y un dominio PB1 que promueve su autoagregación y la asociación con otros adaptadores.⁸⁵ Se ha propuesto que la interacción de su dominio PB1 con la proteína quinasa C podría mediar la señalización vía NF-κB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) y actuar en la reorganización del citoesqueleto.¹³⁵ Además, se ha visto que los ratones knockout (KO) para p62 desarrollan obesidad e intolerancia a la glucosa, efecto mediado por el bloqueo de la señalización vía ERK1 (kinasa regulada por señales extracelulares 1).¹³⁶ También se ha visto su implicación en el metabolismo óseo, la formación de cuerpos de inclusión y la tumorigénesis.^{120,135,137,138}

Por otro lado, tanto el dominio C-terminal como el dominio de interacción con LC3, permite que p62 actúe como adaptador incorporando sustratos ubiquitinizados al

proceso autofágico, por lo que, p62 sería capaz de trasladar los distintos sustratos hacia el fagoporo y por lo tanto, hacia el sitio de formación del autofagosoma.¹³⁹ De esta forma, p62 se incorpora selectivamente al autofagosoma y posteriormente se degrada vía autofagia.^{119,140}

Los niveles de expresión de p62 están estrictamente regulados mediante su degradación a través de la autofagia basal, sin embargo, un deterioro en la misma conduce a la acumulación masiva de p62, y posteriormente a la formación de agregados que contienen tanto p62 como ubiquitina.¹⁴¹ Esta acumulación es citotóxica y puede causar muerte celular, neurodegeneración, inflamación y estrés oxidativo.^{142,143} Por el contrario, cuando la autofagia está activada ante situaciones como la deprivación energética, p62 se degrada rápidamente y su nivel se reduce drásticamente.^{118,144} Por ello, se ha postulado que los niveles citoplasmáticos de p62 podrían ser indicadores de autofagia, correlacionándose negativamente con esta.¹²¹ De esta forma, la acumulación de inclusiones de p62 mediante inmunocitoquímica o los niveles elevados de p62 mediante western blot se corresponden con un flujo autofágico deficiente.¹²¹

Se ha visto que p62 también podría regular la formación del autofagosoma, de esta forma, los agregados formados por p62 y las proteínas ubiquitinizadas podrían formar una especie de "núcleo" capaz de unir distintos genes Atg.¹⁴⁵ Su papel a otros niveles del proceso autofágico es controvertido: por un lado, se ha visto que p62 promueve la activación de mTORC1 a través de su translocación al lisosoma y consiguiente inhibición de la autofagia,¹⁴⁶ pero por otro, se ha sugerido que en células HEK293 y HeLa p62 libera a Beclin1 de su asociación con Bcl2 induciendo la autofagia.¹⁴⁷

4.3. Autofagia en el corazón.

Autofagia basal en el corazón.

La autofagia basal constituye un proceso clave en la función cardiomiocitaria, ya que la renovación/reciclaje de materiales citoplasmáticos, organelas y agregados proteicos, cuyo acúmulo puede ser tóxico para las células, es de particular importancia en las células quiescentes y diferenciadas como son los cardiomiocitos, en los cuales los componentes dañados no se diluyen gracias a la replicación celular, sino que se

acumulan afectando a la función celular y disminuyendo su adaptabilidad.¹⁴⁸ Los productos de degradación derivados de la autofagia tienen una doble función: proveer de sustratos para la biosíntesis de nuevas moléculas/organelas y generar energía, siendo un proceso de vital importancia para asegurar el abastecimiento energético en situaciones de estrés.¹⁴⁹ De hecho, en un modelo de deficiencia de Atg5 que conduce a un déficit en la autofagia basal, se produce una disminución abrupta en la función cardíaca y una desorganización estructural de las fibras cardíacas lo que conduce a hipertrofia, dilatación del ventrículo izquierdo y una disminución del gasto cardíaco,¹⁵⁰ por lo tanto, la autofagia basal controla el tamaño y la función cardiomiocitaria y constituye un mecanismo protector durante el estrés hemodinámico.¹⁵⁰ Se ha visto que un déficit de Atg5 sostenido a lo largo del tiempo produce una cardiomiopatía hipertrófica que se caracteriza por el acúmulo de proteínas y organelas dañadas;¹⁵¹ además, se ha demostrado que una mutación en la proteína LAMP2 (presente en la membrana de los lisosomas) conduce a una cardiomiopatía severa y progresiva debida a un fallo en la fusión del lisosoma con el autofagosoma.¹⁵² Todos estos resultados demuestran que el flujo autofágico basal es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis y el funcionamiento adecuado de los cardiomiocitos.

Inducción de la autofagia cardíaca mediante privación.

La privación de nutrientes constituye el estímulo fisiológico más importante de inducción de autofagia, que va a dar lugar así a la generación de ATP y va a promover la supervivencia celular.¹⁵³ El corazón consume de forma continuada grandes cantidades de energía, necesaria para la actividad de bombeo permanente, lo que provoca que la privación energética induzca un rápido incremento en los niveles autofágicos.¹⁵³ En la etapa perinatal se detiene el aporte de nutrientes a través de la circulación materno-fetal y el feto sufre una activación dramática de la autofagia; de manera que se ha visto que el bloqueo de esta en ratones KO para Atg5 produce agotamiento de sustratos respiratorios y las anomalías cardíacas son evidentes poco después del parto.¹⁵⁴ En el corazón adulto, la autofagia también constituye un proceso importante para el mantenimiento de la función cardíaca tras la privación energética, de hecho el bloqueo autofágico durante la privación energética mediante bafilomicina A1 (un inhibidor de la bomba

ATPasa lisosomal que inhibe la fusión del lisosoma con el autofagosoma) causa disfunción cardíaca en ratones.¹⁵⁵ Asimismo, la privación de aminoácidos, suero y glucosa en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata también induce autofagia, generando aminoácidos y ácidos grasos imprescindibles para mantener la función cardíaca y/o eliminando organelas dañadas.¹⁵⁶⁻¹⁵⁸

Rutas implicadas en la autofagia cardiomiocitaria.

- mTOR. El complejo mTORC1 se encarga, entre otras funciones, de mantener una autofagia basal controlada al unirse y fosforilar al complejo ULK1/2; sin embargo, cuando mTORC1 es inactivado, se disocia del complejo ULK1/2 e induce la autofagia.¹⁵⁹ De esta forma, la delección de mTORC1 conduce al desarrollo de una cardiomiopatía dilatada letal.¹⁶⁰
- AMPK. Por un lado, AMPK es capaz de regular a mTORC1 a través de RHEB (homólogo de Ras enriquecido en el cerebro)¹⁶¹ o a través de Raptor¹⁶² y, por otro, podría fosforilar directamente a ULK1/2, lo que permitiría su disociación de mTORC1.¹⁰⁴ AMPK constituye un regulador esencial de la privación de glucosa en cardiomiocitos neonatales al inducir una autofagia protectora.¹⁶³
- Inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y su receptor. En cardiomiocitos, la depleción de IP₃ (mediante la sobreexpresión de una fosfatasa selectiva) o el tratamiento con un antagonista de su receptor promueve la autofagia.¹⁶⁴
- Factor de transcripción TP53. TP53 controla la autofagia a través de la inhibición de AMPK y la activación de mTOR, de esta forma, recientes evidencias indican que TP53 atenúa la mitofagia (autofagia selectiva de mitocondrias) e incrementa el daño cardíaco después de la isquemia.¹⁶⁵
- Otros reguladores son por ejemplo, las histonas acetiltransferasas e histonas deacetilasas, el dinucleótido de nicotinamida y adenina, la glicógeno sintasa quinasa 3 y determinados microRNAs.¹⁶⁶⁻¹⁶⁹

4.4. Enfermedades cardiovasculares y autofagia.

La autofagia fisiológica o basal es un mecanismo de protección para mantener la función cardiovascular normal, y un daño en los mecanismos de autofagia contribuye al desarrollo de distintas enfermedades cardiovasculares.¹⁷⁰

Autofagia y aterosclerosis.

Factores como la inflamación, la hipoxia, la oxidación de lipoproteínas, el estrés del retículo endoplásmico y las especies reactivas de oxígeno (ROS) presentes en las placas ateroscleróticas pueden inducir autofagia.¹⁷¹ Esta autofagia promueve la supervivencia celular al degradar los componentes intracelulares dañados y, por lo tanto, protegiendo contra el estrés oxidativo;¹⁷² además, la inducción de la mitofagia (autofagia selectiva de mitocondrias) limita la liberación del citocromo C al citosol y consecuentemente protege frente a la apoptosis.¹⁷³

Razani y col¹⁷⁴ observaron que, a pesar de que la mayoría de las células presentes en la placa aterosclerótica tenían marcadores de autofagia, los macrófagos eran los más activos en este proceso, pero su capacidad autofágica se veía disminuida durante la progresión de la placa, lo que conducía a la hiperreactivación del inflammasoma y un incremento en la producción de interleucina 1 β que finalmente podría conducir a la formación de cristales de colesterol. Estos datos fueron confirmados por un estudio posterior,¹⁷⁵ lo que sugiere que la autofagia podría ejercer un papel protector en este tipo celular al actuar degradando la propia placa aterosclerótica.

Autofagia en isquemia/reperfusión.

Durante la isquemia, la llegada tanto de nutrientes como de oxígeno al corazón es limitada, lo que desencadena un incremento en la formación de autofagosomas concomitantemente a la fragmentación de la mitocondria, sugiriendo una interacción entre la autofagia y la mitocondria durante la isquemia cardíaca.¹⁶³ Se cree que esta inducción de la autofagia ocurre vía AMPK y es protectora, ya que induce la

eliminación de organelas disfuncionales, evitando de esta forma la liberación de mediadores proapoptóticos y de ROS.¹⁶³

Ma y col.¹⁷⁶ describieron que en el proceso de isquemia/reperfusión existe un incremento en el número de los autofagosomas provocado por un aumento de la formación de los mismos y una disminución de la degradación vía lisosomal, así se produce una disminución de LAMP2 (que actúa en la fusión del autofosoma y el lisosoma) y un aumento de Beclin1, lo que induce un daño en el procesado de los autofagosomas y consiguientemente un incremento de la generación de ROS y de la permeabilización de la membrana mitocondrial, dando lugar a la muerte de los cardiomiocitos.¹⁷⁶ Por el contrario, otros estudios sugieren que este aumento de Beclin1, a pesar de aumentar el flujo de autofagia, protege a los cardiomiocitos frente a la apoptosis inducida por el daño de isquemia/reperfusión.¹⁷⁷ Estos datos sugieren que la autofagia puede tener un papel distinto en la isquemia y en la isquemia/reperfusión, pudiendo ser protector durante la isquemia y maladaptativo durante la isquemia/reperfusión.¹⁶³

Autofagia en cardiomiopatías.

La mutación en el gen de la laminina A/C (que forma a las lamininas que funcionan como componentes estructurales de la lámina nuclear) da lugar a cardiomiopatía dilatada caracterizada por un aumento del ventrículo izquierdo y una disminución de la función sistólica que se acompaña con arritmias y otras enfermedades sistémicas.¹⁷⁸

Una de las características principales de esta cardiomiopatía es el daño en la autofagia causado por el incremento de la ruta AKT-mTOR en el corazón.¹⁷⁹ Paralelamente se ha visto que se produce un daño en la fosforilación de Beclin1 en los estados finales de la cardiomiopatía dilatada de otros orígenes, lo que da lugar a una disminución de la autofagia y a una acumulación de agregados proteicos.¹⁸⁰

Asimismo, la acumulación de proteínas mal plegadas debido a una mutación con cambio de sentido erróneo en el gen que codifica la cadena B de alfa-cristalina (CryAB) puede dar lugar también a cardiomiopatías.¹⁸¹ En este caso se produce un incremento de la autofagia como mecanismo adaptativo a la acumulación de proteínas mal plegadas, sin embargo, deficiencias en la misma (como la que ocurre en ratones deficientes en

Beclin1) dan lugar a un aceleramiento de la insuficiencia cardíaca y a una mortalidad temprana, sugiriendo que el correcto funcionamiento de la autofagia es muy importante para prevenir la progresión de esta patología.¹⁸¹ De hecho, la sobreexpresión de Atg7 disminuye la hipertrofia y prolonga la supervivencia en los corazones con mutaciones en CryAB, sugiriendo una posible diana terapéutica viable.¹⁸²

Las histonas deacetilasas regulan la plasticidad cardíaca, y su actividad está relacionada con otra cardiomiopatía: la hipertrofia cardíaca.¹⁸³ Sus inhibidores se caracterizan por sus efectos antihipertróficos al disminuir los flujos autofágicos incrementados característicos de la hipertrofia.¹⁸³

La cardiomiopatía diabética, por su parte, se define como una disfunción ventricular que ocurre independientemente de las enfermedades en las arterias coronarias y la hipertensión.¹⁸⁴ La diabetes induce la apoptosis y suprime la autofagia en cardiomiocitos, indicando que la relación entre ambos procesos es importante en la patogénesis de la cardiomiopatía diabética;¹⁸⁵ sin embargo, la activación de AMPK a través del antidiabético metformina restaura la autofagia cardíaca posiblemente a través de la alteración del complejo Beclin1-Bcl2, lo que protegería frente a la apoptosis cardíaca.¹⁸⁵ Por otro lado, el estudio de Russo y col.¹⁸⁶ muestra que la hipertrofia cardíaca y la disfunción en la diabetes tipo 2 depende de la síntesis de ácidos grasos saturados y esfingolípidos, en particular de la ceramida sintasa 5, que está involucrada en la inducción de la autofagia y la cardiomiopatía lipotóxica.

Autofagia en insuficiencia cardíaca.

La insuficiencia cardíaca constituye una de las principales causas de muerte en los Estados Unidos, en donde se estima que 5 millones de americanos tienen esta enfermedad con una mortalidad del 50% a 5 años.¹⁸⁷ La insuficiencia cardíaca es una enfermedad progresiva que se caracteriza por un remodelado ventricular que da lugar a cambios en el balance entre la síntesis y degradación de las proteínas.¹⁸⁸ El papel que puede jugar la autofagia en el desarrollo de esta enfermedad es controvertido, ya que, a pesar de que puede antagonizar los procesos hipertróficos al incrementar la degradación de proteínas, también puede constituir una respuesta maladaptativa, pues un exceso de autofagia conduce a la muerte celular, lo que conllevaría un empeoramiento de la

insuficiencia cardíaca.¹⁸⁹ De hecho, en un modelo de sobrecarga cardíaca, la actividad autofágica se correlaciona con la magnitud del crecimiento hipertrófico y con la tasa de transición a insuficiencia cardíaca.¹⁹⁰ De acuerdo con esto, los ratones con sobreexpresión de Beclin1 tendrían una mayor respuesta al remodelado patológico, por el contrario, la haploinsuficiencia de Beclin1 reduciría a la mitad la respuesta autofágica inducida por estrés, y rescataría parcialmente el fenotipo de insuficiencia cardíaca, sugiriendo que la autofagia podría ser maladaptativa bajo condiciones de sobrecarga cardíaca.¹⁹⁰

El análisis de biopsias de ventrículo izquierdo de 9 pacientes con cardiomiopatía dilatada idiopática realizado en el momento de la implantación de un dispositivo de asistencia ventricular, mostró que la sobrecarga mecánica durante la insuficiencia cardíaca estaba asociada con una disminución de los marcadores de autofagia,¹⁸⁹ poniendo de manifiesto otra vez la relevancia de la autofagia en la fisiopatología de la insuficiencia cardíaca.

5. Activación de los TPCs.

Los distintos análisis electrofisiológicos han descrito a los TPCs como canales de calcio activados por NAADP; bien mediante la técnica de *patch clamp* en lisosomas aislados¹⁹ y en membranas lipídicas artificiales (a las que se les incorporó TPCs inmunopurificados¹⁹¹ o vesículas de células que sobreexpresan estos canales¹⁹²) en células HEK293 o bien mediante el redireccionamiento los TPCs a la membrana plasmática en células HEK293 y SKBR3.¹⁷ Paralelamente, se ha puesto de manifiesto que mutaciones en regiones aminoacídicas del poro de los TPCs disminuyen la selectividad al calcio¹⁹ y eliminan las corrientes dependientes de NAADP.^{17-19,192} De esta forma, se ha propuesto que el NAADP podría activar a los TPCs dando lugar a la liberación de calcio de las organelas ácidas, lo que a su vez activaría la liberación de calcio del retículo endoplásmico a través de los grandes movilizadores de calcio a nivel intracelular, como son los receptores de inositol 3 fosfato (InsP₃R) y de rianodina (RyR), mediante un ciclo conocido con el nombre de CICR: “el calcio induce la liberación de más calcio” (Figura 12).³

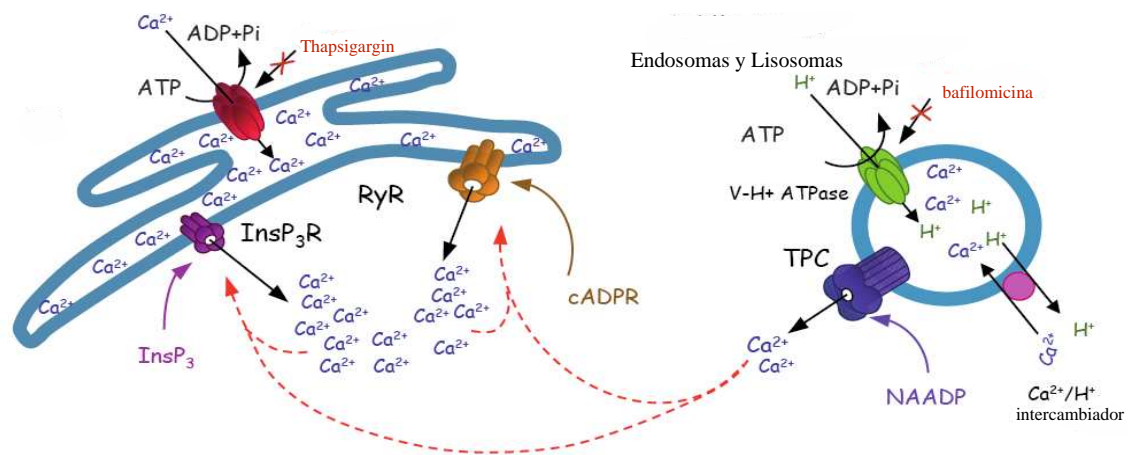


Figura 12. Papel de los TPCs en la liberación de calcio mediada por NAADP. El retículo endoplásmico (izquierda) y las organelas ácidas (endosomas y lisosomas, derecha) son reservorios de calcio a nivel intracelular. InsP₃R y RyR median la liberación de calcio a través del retículo endoplásmico en respuesta a inositol 3 fosfato (InsP₃) y ADP-ribosa cíclico (cADPR), respectivamente. Además, estos receptores también pueden ser activados por calcio a través del ciclo conocido con el nombre de CICR “el calcio induce la liberación de más calcio” (líneas rojas). El almacén de calcio del retículo endoplásmico es mantenido por las Ca²⁺-ATPasas (sensibles a la thapsigargin). El NAADP induce la liberación de Ca²⁺ de las organelas ácidas a través de los TPCs. La bomba de protones sensible a la bafilomicina (V-H⁺ ATPasa) es la encargada de acidificar el lumen de los endo-lisosomas y la liberación de H⁺ de estos compartimentos se produce a través del intercambiador Ca²⁺/H⁺. El NAADP puede inducir la liberación de calcio de los lisosomas a través de los TPCs, lo que podría desencadenar una liberación de Ca²⁺ del retículo endoplásmico vía InsP₃R y RyR (líneas rojas). InsP₃R, receptor de inositol 3 fosfato; RyR, receptor de rianodina.³

Sin embargo, Wang y col.⁵⁸ en el año 2012 y Cang y col.¹⁹³ en el año 2013 revolucionaron la concepción que había hasta la fecha sobre el posible papel de los TPCs como receptores de calcio activados por NAADP, al demostrar que los TPCs eran canales de sodio activados por fosfoinositol 3,5 difosfato (PI(3,5)P₂).

A pesar de estas discrepancias, se ha postulado que ambas hipótesis pueden ser compatibles:¹⁰ por ejemplo, se sabe que los canales de calcio por excelencia como IP₃R y RyR también son permeables a otros cationes como el potasio,^{194,195} mientras que los receptores de glutamato NMDA (N-metil-D-aspartato) conducen calcio y sodio.¹⁹⁶ Asimismo, se ha sugerido que los TPCs podrían funcionar de manera análoga, dando lugar a una corriente mayor (vía sodio) y una menor (vía calcio) de despolarización.¹⁹⁶ Refuerza esta hipótesis la demostración de que los equivalentes a los TPCs en plantas, que fueron los primeros en ser caracterizados electrofisiológicamente, se comportan como canales de sodio o calcio en función del sustrato energético que la planta recibe.¹⁹⁷

Además también se ha sugerido que la activación de los TPCs es a través de PI(3,5)P₂ y no por NAADP.^{58,193} Sin embargo, una posible explicación a estas discrepancias sugeridas por Wang y col. (2012)⁵⁸ y Cang y col. (2013)¹⁹³ es que la activación de los TPCs mediada por NAADP no sea directa, sino que existan proteínas auxiliares que medien dicha unión.¹⁹⁸ Otros autores postulan que esta activación por NAADP es a su vez regulada por magnesio, PI(3,5)P₂ y las quinasas p38/JNK.¹⁹⁹

Estas incertidumbres surgen tanto de trabajar con organelas muy pequeñas (0.5-2.0 nm de diámetro) como de la complejidad y plasticidad del sistema endolisosomal.¹⁰ Los canales endolisomales están en un ambiente electroquímicamente complejo interaccionando funcional y/o físicamente unos con otros, con lo que el cambio de expresión de una proteína puede cambiar la respuesta de otros elementos.¹⁰

6. Funciones biológicas de los TPCs.

6.1. Funciones biológicas de los TPCs NAADP dependientes.

Los nicotinamida adenina dinucleótidos (NAD) se caracterizan porque, además de participar como cofactores de las oxidoreductasas, también pueden actuar como precursores de moléculas señalizadoras, sustratos de modificaciones postranscripcionales de proteínas y como aceptores de grupos acilos durante las reacciones de de-acetilación.²⁰⁰ Los derivados de NAD son el NAADP, el ADP (adenosín difosfato) ribosa cíclica (cADPR) y el adenosín difosforibosa (ADPR).²⁰¹ El NAADP puede formarse por la acción de CD38 (que es una ADP ribosil ciclasa) o mediante otros procesos de óxido-reducción.²⁰¹

Diferenciación.

Se ha visto que los TPCs tienen un papel importante durante la diferenciación neuronal, de hecho, la entrada de NAADP a través de liposomas en células PC12 (un modelo de diferenciación neuronal) da lugar a una liberación de calcio y consecuentemente a la diferenciación neuronal,²⁰² además Zhang y col. (2013)²⁰³ han observado que la expresión de TPC2 está disminuida durante la diferenciación de

células embrionarias de ratón ES en progenitores neuronales, incrementándose gradualmente durante la misma, y que el *knockdown* de TPC2 acelera la diferenciación a progenitores neuronales pero inhibe la formación de neuronas, mientras que la sobreexpresión de TPC2 inhibe la entrada de las células ES en el estadio temprano de la diferenciación.²⁰³

Además, el NAADP-acetoximetil ester (NAADP-AM, análogo al NAADP pero con capacidad de atravesar la membrana plasmática) promueve la diferenciación miogénica en las células precursoras primarias del músculo esquelético y en la línea celular C2C12 (modelo de miogénesis), mientras que la inhibición del NAADP mediante su antagonista Ned-19, la bafilomicina o concentraciones desensibilizadoras de NAADP, inhiben la diferenciación.²⁰⁴ Durante la miogénesis los niveles de ARNm de TPC1 se mantuvieron constantes pero los niveles de ARNm de TPC2 fueron mayores durante los primeros días para ir descendiendo posteriormente, por lo que el silenciamiento de TPC1 apenas modificó el proceso de diferenciación, mientras que el silenciamiento de TPC2 dio lugar a una inhibición de la miogénesis.²⁰⁴

También se ha observado la implicación de TPC2 en la diferenciación de los osteoclastos.²⁰⁵ Se ha visto que tras inducir la osteoclastogénesis los niveles de ARNm de TPC2 estaban incrementados en cultivos primarios de células de estroma de médula ósea (tras 5 días de diferenciación) y en la línea celular de precursores de osteoclastos (tras 3 días de diferenciación), mientras que el silenciamiento de TPC2 afectaba a la señalización vía calcio e inhibía la diferenciación.²⁰⁵ Se ha sugerido que estos efectos podrían estar mediados por el factor nuclear de células T activadas (NFAT), ya que el silenciamiento de TPC2 inhibía la translocación de este factor de transcripción.²⁰⁵

Angiogénesis.

Se ha demostrado que en el endotelio existen receptores de calcio activados por NAADP y que este NAADP es capaz de regular la contractibilidad del músculo vascular liso y la presión sanguínea.²⁰⁶ Además, la estimulación de las células endoteliales con un agonista del receptor de histamina H1 conduce a un incremento en los niveles intracelulares de NAADP, que a su vez induce la liberación de calcio y la secreción del factor de Von Willebrand, sin embargo, el silenciamiento de TPC1 y

TPC2 en estas células bloquea esta secreción, lo que sugiere la participación de los TPCs en esta señalización.²⁰⁷

Los factores de crecimiento vasculares del endotelio (VEGF), y en particular el miembro VEGF-A, son los mayores reguladores de la angiogénesis al estimular la activación del receptor 2 de VEGF (VEGFR2), que es un receptor tirosina kinasa que induce la proliferación y migración celular, y participa en los procesos iniciales de la angiogénesis.²⁰⁸ Un estudio reciente en células en cultivo HUVEC y en ratones KO para TPC1 y TPC2 ha demostrado que la activación de VEGFR2 conduce a la liberación de calcio dependiente de NAADP y TPC2; de hecho, tanto el uso de Ned-19 como el silenciamiento de TPC2 *in vitro*, así como los estudios *in vivo* en ratones KO para TPC2, mostraron una inhibición de la angiogénesis inducida por la activación de VEGFR2.²⁰⁹

Contracción del músculo liso.

En el músculo detrusor, la activación de los receptores muscarínicos (el principal mecanismo fisiológico para el vaciado de la vejiga urinaria) mediante carbacol da lugar a una respuesta contráctil a través de la liberación de calcio dependiente de las organelas acídicas.²¹⁰ Se ha visto que esta respuesta está mediada por el NAADP ya que desaparece en preparaciones de músculo detrusor en ratones KO para TPC2.²¹⁰ Paralelamente, en preparaciones de músculo liso de fundus gástrico de rata, se ha demostrado que el carbacol también induce la liberación de calcio dependiente de NAADP y de TPCs.²¹¹

Metabolismo.

Las organelas endolisosomales juegan un papel clave en el tráfico y reciclaje de diferentes macromoléculas como las lipoproteínas de baja densidad (LDL)-colesterol, el factor de crecimiento epitelial (EGF) o la transferrina.^{212,213} De hecho, un estudio reciente realizado en cultivos primarios de fibroblastos y hepatocitos procedentes de ratones KO para TPC2 mostró que en ausencia de este canal existe un daño en el tráfico de colesterol y el receptor EGF.²¹⁴ Este defecto fue atribuido a una disfunción en la

degradación endolisosomal por la ausencia de fusión entre el lisosoma y el endosoma.²¹⁴ Paralelamente también se observó que los ratones deficientes en TPC2 presentan un daño hepático, compatible con una esteohepatitis no alcohólica.²¹⁴

Recientemente se ha visto que los ratones TPC1/2 KO tienen un cociente respiratorio superior a los wt y desarrollan obesidad entre los 6 y 9 meses de edad.²¹⁵ Los niveles de expresión de la hormona lipasa sensible, la densidad lipídica y la expresión de los receptores β -adrenérgicos son inferiores en el tejido adiposo pardo en los ratones TPC1/2 KO, sugiriendo que el desarrollo de obesidad en estos ratones se debe a una reducción de la disponibilidad y utilización de los lípidos, así como a un defecto en la señalización del receptor β -adrenérgico, dando lugar a alteraciones de la actividad termogénica en el tejido adiposo pardo.²¹⁵

Autofagia.

El hecho de que la autofagia conduzca a la fusión entre el autofagosoma y el lisosoma eleva la posibilidad de que la señalización por NAADP y los TPCs estén involucrados en este proceso. El primer estudio que relacionó la autofagia con la señalización vía TPCs fue el de Pereira y col.²¹⁶ en el año 2011, cuando demostraron en cultivo de astrocitos de rata que el NAADP inducía una liberación de calcio de las organelas acídicas incrementando los marcadores de autofagia LC3II y Beclin1; sin embargo, al introducir un dominante negativo para TPC2, estos marcadores autofágicos se veían reducidos, sugiriendo un potencial papel de TPC2 en la regulación de la autofagia en astrocitos. Un año más tarde, Kayala y col. (2012)²¹⁷ asociaron la ausencia de presinilinas (que son importantes para la adecuada proteólisis durante la autofagia) con anomalías en el calcio lisosomal y con cambios en los niveles de expresión y dimerización de los TPCs, lo que hipotetizaron que podría llevar a la perturbación de la autofagia en estas células.

En 2013 Lu y col.²¹⁸ demostraron que la sobreexpresión de TPC2 (mediante un lentivirus) en células HeLa para hacerlas competentes al NAADP, conducía a un incremento de LC3II, p62 y autofagosomas, lo que sugería una inhibición de la fusión entre el autofagosoma y el lisosoma. De hecho, este grupo ha postulado que esta sobreexpresión de TPC2, a través de la vía NAADP y calcio, alcaliniza el pH lisosomal,

evita el reclutamiento de Rab7 y por consiguiente, inhibe la fusión entre el lisosoma y el autofagosoma; sin embargo, el silenciamiento de TPC2 o el tratamiento de las células con Ned-19 (antagonista de NAADP) revierte este proceso y es capaz de disminuir este acúmulo de autofagosomas.²¹⁸

En un estudio reciente llevado a cabo por Lin y col. (2014)²¹⁹ se ha demostrado que TPC2 contribuía a la autofagia regulando la homeostasis proteica en el músculo esquelético, de esta forma, los músculos de ratones TPC2 KO mostraban atrofia respecto a los wt, con un incremento dañino en el acúmulo de autofagosomas durante la autofagia inducida por deprivación energética y cloroquina, lo que sugería que estos efectos podrían estar mediados por un cambio en el pH lisosomal y una reducción de la actividad de las proteasas lisosomales. Paralelamente, también se ha observado una asociación entre mTOR y TPC2 en el músculo esquelético: la ausencia de TPC2 evita la reactivación de mTOR durante una deprivación prolongada, lo que sugiere tanto que existe una relación entre ambos, como que no se produce una adecuada terminación de la autofagia.²¹⁹

Finalmente mediante *screening* de interacción proteína-proteína se ha determinado y comprobado la interacción directa de TPC2 con la proteína X1 asociada al sustrato HS-1 (Hax-1), que es un regulador negativo de la autofagia y la apoptosis.²²⁰

Controlar la entrada de virus al interior del huésped.

Los virus del Ébola (EBOVs) junto con los Marburgvirus forman la familia *Filoviridae*. Las infecciones por los virus del Ébola se caracterizan por la supresión del sistema inmune y una respuesta inflamatoria sistémica que causa daños vasculares, en la coagulación y en el sistema inmune, lo que conduce a un fallo multiorgánico y shock.²²¹ Como la mayoría de los virus, el EBOV depende de su huésped para completar su ciclo, por lo tanto, conocer el mismo es muy importante para poder desarrollar una cura.²²² Previamente se había visto que el EBOV se unía a glicoproteínas de la superficie celular,²²³ lo que conducía a su internalización a través de la ruta endocítica.²²⁴ En 2015, Sakurai y col.²²⁵ demostraron que TPC2 es necesario para la liberación del genoma viral del EBOV dentro de la célula huésped. Para ello, en primer lugar observaron que los fibroblastos embrionarios de ratón procedentes de ratones KO para TPC1 y TPC2

resistían la infección por el EBOV.²²⁵ Sin embargo, la sobreexpresión de los TPCs en células mutantes humanas recuperaban esta capacidad infectiva.²²⁵ Lo mismo ocurría cuando silenciaban los TPCs a través de ARNs de interferencia células HeLa, en donde las infecciones por el EBOV eran incompletas.²²⁵ Además la sobreexpresión de una forma dominante negativa de TPC2 (que bloquea el NAADP y por lo tanto, bloquea el ciclo mediante el cual el calcio induce la liberación de más calcio) también inhibía la infección por el EBOV.²²⁵ Finalmente este grupo también demostró que el tetrandrine (un tipo de alcaloide) era capaz de bloquear la actividad de TPC2 y por lo tanto podría bloquear la infección por EBOV.²²⁵

6.2. Funciones biológicas de los TPCs PI(3,5)P₂ dependientes.

Homeostasis iónica.

El PI(3,5)P₂ es un fosfoinositol específico del sistema endolisosomal que se forma gracias al complejo PIKfyve (PIKfyve es la PI(3)P 5-kinasa que fosforila a PI(3)P para dar lugar a PI(3,5)P₂).⁵⁵ Las células que presentan déficit de PI(3,5)P₂ se caracterizan por tener grandes vacuolas y endolisomas, lo que podría sugerir que existe un daño en la homeostasis iónica o un defecto en el tráfico a través de la membrana.²²⁶ Inicialmente se postuló al PI(3,5)P₂ como mediador de la liberación de calcio a través del receptor mucolipin 1 (TRPML1) de los endolisomas;²²⁷ sin embargo, la deficiencia de PI(3,5)P₂ da lugar a un fenotipo mucho más severo que las mutaciones producidas en el receptor TRPML1, sugiriendo que el PI(3,5)P₂ podría tener efectores adicionales.²²⁶ De esta forma, en el año 2012, basándose en estudios de *patch-clamp* tanto en endolisomas de células COS-1, como en animales KO para TPC1 y TPC2, se planteó la hipótesis de que los TPCs eran canales de sodio activados por PI(3,5)P₂.⁵⁸

Metabolismo y/o autofagia.

Aunque se conoce que tanto los lisosomas como los endosomas juegan un papel clave en el metabolismo celular al participar en procesos claves como la autofagia o la endocitosis, el conglomerado de señales que reciben estas organelas para su correcto

funcionamiento no se conoce con exactitud.²²⁸ Se ha visto que mTOR en el complejo mTORC1 responde a las variaciones en los niveles de aminoácidos durante su localización en el lisosoma, lo cual induce la fosforilación de los factores de transcripción TFEB, claves en la función lisosomal.²²⁹ En el año 2013 un estudio realizado por Cang y col.¹⁹³ en células HEK293T y en ratones KO para TPC1/2 mostró que mTOR es capaz de asociarse y controlar la activación de un canal endolisosomal de sodio sensible al adenosín trifosfato (ATP) (lysoNa_{ATP}), formado por los TPCs y otras proteínas adyacentes. De esta forma, cuando las células tienen suficientes sustratos energéticos, es decir, tienen una elevada concentración de ATP, mTOR fosforila a los TPCs y/o a sus proteínas asociadas para mantener al canal en un estado cerrado¹⁹³ y, por el contrario, cuando se produce una caída en los niveles de ATP (durante la privación energética, por ejemplo), mTOR se deslocaliza de los TPCs, dando lugar a una apertura del canal que permite que el sodio y otros iones salgan del lisosoma (Figura 13).¹⁹³ De esta forma, los TPCs podrían ser el nexo de unión entre el lisosoma y la señalización de mTOR que monitoriza la respuesta a la privación de nutrientes, la hipoxia y el crecimiento celular.²³⁰

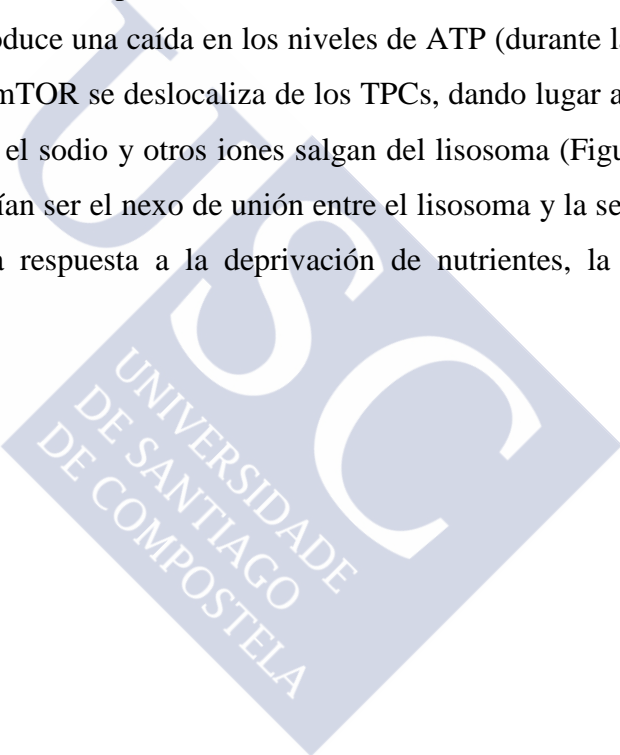




Figura 13. mTORC1 regula la función lisosomal en condiciones basales y durante la privación energética. En condiciones de disponibilidad de nutrientes (panel izquierdo), mTORC1 promueve la retención de TFEB y TFE3 al igual que la inhibición del complejo ULK1/2 y lysoNaATP. Además los lisosomas se mueven hacia la periferia de la célula. Por el contrario, en condiciones de privación energética (panel derecho), la inactivación de mTORC1 conduce a la translocación de TFEB y TFE3 al núcleo (1), la inducción de la biogénesis de lisosomas (2), la activación de la autofagia (3) y cambios en el potencial de membrana lisosomal (5). La inactivación de mTORC1 también puede ser necesaria para la fusión entre el autofagosoma y el lisosoma (4). Tras un largo periodo de privación energética, la reactivación de mTORC1 es crítica para inducir la autofagia de nuevo (6). RHEB, homólogo de Ras enriquecido en el cerebro; TFE3, factor de transcripción E3; TFEB, factor de transcripción EB; ULK, *Unc-51-like kinase*; V-ATPasa, ATPasa vacuolar; ZKSCAN3, anillo de zinc con los dominios KRAB y SCAN.²³¹

7. TPCs y sistema cardiovascular.

A pesar de que desde el descubrimiento de los TPCs en el año 2000 se ha trabajado ampliamente en intentar comprender su biología, no existe ningún estudio sobre su posible papel en el sistema cardiovascular. Los trabajos de Ishibrashi y col. (2000)¹, Calcraft. y col. (2009)³ y Zong y col. (2009)²¹, describen la expresión de los TPCs mediante northern blot en tejido cardíaco, sin embargo no estudian sus funciones a nivel cardiomiocitario.

Estudios previos han puesto de manifiesto la presencia de enzimas ADP-ribosil ciclasas (capaces de sintetizar NAADP) en preparaciones de membranas cardíacas^{232,233} y, además, se ha visto que estas enzimas pueden incrementar su actividad a través de la estimulación de los receptores β -adrenérgicos, lo que a su vez daría lugar a un incremento de NAADP.²³³ Este NAADP es capaz de aumentar la amplitud y frecuencia de las corrientes de calcio en los cardiomiocitos.²³⁴ Otro estudio llevado a cabo por Touchberry y col. (2010)²³⁵ ha puesto en evidencia que también el PI(3,5)P₂ es un potente regulador de la concentración intracelular de calcio en los cardiomiocitos al ser capaz de activar al receptor de rianodina, que puede dar lugar a la liberación adicional de calcio durante el CICR y, consecuentemente, aumentar la fuerza de contracción en el músculo cardíaco; de esta forma, la actividad eléctrica cardíaca depende de la propagación de los estímulos excitatorios de forma coordinada y, como consecuencia, de la generación de potenciales de acción en los cardiomiocitos individuales, que resulta de la apertura y cierre de canales iónicos.²³⁶ Es por lo tanto evidente que las concentraciones inadecuadas de iones se consideran indicadores de patologías musculares, de hecho una excesiva elevación de calcio y sodio intracelular han demostrado ser perjudiciales para las células cardíacas, lo que podría conducir a arritmias en el corazón.^{237,238}

A nivel cardiovascular, el descubrimiento de los TPCs como receptores endolisosomales abre un campo de investigación nuevo, muy relevante y de enorme interés, por las probables implicaciones del sistema NAADP/TPCs en el propio control de las funciones básicas (muerte, proliferación, respuesta hormonal, metabolismo...) de las células del sistema cardiovascular, que se caracterizan por ser tipos celulares muy especializados y diferenciados.



OBJETIVOS



El objetivo de esta tesis es estudiar el papel de los TPCs en la fisiología cardiomiocitaria tanto en condiciones normales como patológicas.

Los objetivos concretos son los siguientes:

1. Realizar un estudio comparativo del proteoma cardíaco en ratones wild type (wt) y knockout (KO) para TPC1 y TPC1/2.
2. Estudiar el papel de TPC1 y TPC2 en el metabolismo y la autofagia cardiomiocitaria.
3. Estudiar la regulación de los niveles cardíacos de TPCs en animales de experimentación en distintas condiciones metabólicas.
4. Estudiar los niveles de expresión génica y proteica de TPC1 y TPC2 en tejido cardíaco humano procedente de pacientes con enfermedades cardiovasculares.





A large, light blue watermark of the USC logo is centered on the page. The logo consists of the letters 'USC' in a large, bold, sans-serif font, with the full name 'UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA' written in a smaller font below it, all contained within a diamond-shaped border.

MATERIAL Y MÉTODOS



Todos los reactivos utilizados son de Sigma-Aldrich (USA) salvo que se indique lo contrario.

1. Ética.

Todas las recogidas de tejidos humanos se realizaron previo consentimiento informado escrito de los pacientes, de acuerdo con la Declaración de Helsinki 2008 y la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal y, en caso necesario, con la Convención Europea de los Derechos Humanos y Biomedicina (ETS 164) y la Ley de Tejidos Humanos de 2004 (Reino Unido), tras la aprobación por parte del Comité Ético de Investigación Clínica de la Xunta de Galicia.

Para los experimentos *in vivo* con ratas, se utilizaron las instalaciones del animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela (USC), siguiendo los principios de Helsinki, las regulaciones del Comité Bioético de la USC y las directrices de la directiva 2010/63 de la Unión Europea. Los experimentos se realizaron según la normativa legal vigente de experimentación animal y según la Ley 32/2007 del 7 de noviembre para el cuidado de animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio, modificada por la Ley 6/2013 de 11 de junio y el Real Decreto 53/2013 del 1 de febrero por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y fines científicos.

2. Tejidos humanos.

Las muestras de aurícula cardíaca humana se obtuvieron de pacientes procedentes del Servicio de Cardiología-Cirugía Cardíaca de la Xerencia de Xestión Integrada de Santiago de Compostela sometidos a cirugía cardíaca con *bypass* cardiopulmonar. En dicha cirugía, y para introducir el catéter necesario, se escinde un trozo de apéndice auricular derecho que normalmente se desecha y que nosotros recogemos para experimentación. Los análisis bioquímicos de las muestras de pacientes se realizaron como parte del protocolo médico en el laboratorio de Bioquímica del Hospital Clínico Universitario de la Xerencia de Xestión Integrada de Santiago de Compostela. Todas las pruebas funcionales y seguimiento de los pacientes tuvieron lugar en el Servicio de

Cardiología de la Xerencia de Xestión Integrada de Santiago de Compostela. Las características de los pacientes se muestran en la Tabla 1.

	Hombres (n=199)	Mujeres (n=100)
Características demográficas		
Edad (media) (años)	69,9	70,7
IMC (media)(Kg/m ²)	28,8	29,6
HTA, n(%)	142 (71,4%)	76 (76%)
Diabetes tipo II, n (%)	58 (29,1%)	21 (21%)
Hiperlipidemia, n (%)	105 (52,8%)	52 (52%)
Laboratorio		
Triglicéridos, media, mg/dl	112,4	124,7
Colesterol, media, mg/dl	164,9	187,3
Glucosa, media, mg/dl	115,5	117,3
Tratamiento		
Antiagregantes, n (%)	84(40,2%)	31 (31%)
Anticoagulantes, n (%)	39 (19,2%)	22 (22%)
IECAs, n (%)	55 (27,6%)	20 (20%)
ARA II, n (%)	46 (23,1%)	25 (25%)
β-bloqueantes, n (%)	71 (35,7%)	35 (35%)
Calcioantagonistas, n (%)	43 (21,6%)	12 (12%)
Diuréticos, n (%)	65 (32,7%)	46 (46%)
Antidiabéticos orales, n (%)	31 (15,6%)	17 (17%)
Insulina, n (%)	16 (8%)	7 (7%)

Tabla 1. Características de los pacientes de cirugía cardíaca. IMC: índice de masa corporal, HTA: hipertensión arterial, IECAs: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, ARA II: antagonistas del receptor de angiotensina II.

Las muestras de ventrículo izquierdo cardíaco humano fueron una donación del Dr. Miguel Rivera, Jefe de la Unidad de Cardiocirculatorio del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia. Se obtuvieron a partir de corazones explantados de 16 pacientes con cardiomiopatía isquémica (ISQ) y 20 pacientes con cardiomiopatía dilatada (DIL), todos no diabéticos y en la fase final de la insuficiencia cardíaca, sometidos a trasplante de corazón (Tabla 2). Como controles se utilizaron 6 donantes no enfermos en parada cardioplégica durante 2.5 horas, descartados para trasplante debido a incompatibilidad sanguínea o de tamaño (Tabla 3).

	ISQ (n=16)	DIL (n=20)
Edad (media)	53.6	46.5
Género, hombres, n (%)	16 (100)	17 (85)
Escala NYHA (1-4), media	3.61	3.44
IMC (media) (Kg/m ²)	25.5	25.1
FEVI (%) (media)	23.2	19.6
VFSVI (mm) (media)	53.4	69.8
VFDVI (mm) (media)	61.7	78.3
MVI (g) (media)	258.7	390.8
Duración de la enfermedad (meses) (media)	37.8	69.5

Tabla 2: Características de los pacientes con insuficiencia cardíaca. NYHA: *New York Heart Association*, IMC: índice de masa corporal, FEVI: fracción de eyección del ventrículo izquierdo, VFSVI: volumen fin de sístole del ventrículo izquierdo, VFDVI: volumen fin de diástole del ventrículo izquierdo, MVI: masa ventricular izquierda. Duración de la enfermedad: meses transcurridos desde el diagnóstico hasta el trasplante.

Donante	Edad	Género	Causa de la muerte	FEVI
1	16	Mujer	Accidente de tráfico	>50
2	58	Hombre	Desconocida	>50
3	56	Hombre	Accidente de tráfico	>50
4	56	Hombre	Accidente cerebrovascular	>50
5	54	Mujer	Accidente cerebrovascular	>50
6	51	Hombre	Desconocida	>50

Tabla 3. Características de los pacientes utilizados como controles en los estudios de ventrículo humano.

3. Animales.

3.1. Tejidos de ratón.

Se utilizaron corazones de ratones wt y KO para TPC1 y para TPC1/2. Ambos grupos fueron cedidos amablemente por el Dr. John Parrington y la Dra. Pamela Lear del departamento de Farmacología de la Universidad de Oxford. Los ratones transgénicos para TPC1 poseen una disrupción de los exones 4 y 5 obtenida de un fondo C57BL/6;129P2 de la *European Mouse Mutagenesis Archive* (EMMA).⁷ Los animales homocigotos para el grupo wt se obtuvieron mediante cruces de heterocigotos manteniendo las colonias separadas.⁷ Los ratones transgénicos para TPC2 fueron generados a partir de células embrionarias madre (ES) de *BayGenomics* a partir de la línea celular YHD437 (cepa 129P2) que tiene una inserción mutacional procedente del

vector pGT0Lxf entre los exones 1 y 2.³ Esta mutación crea una transcripción de fusión formada por el exón 1 unido con el marcador β -geo (un gen de fusión de β -galactosidasa y neomicina fosfotransferasa II) presente en dicho vector.³ Estas células fueron inyectadas en blastocistos C57/BL6 para generar ratones quiméricos que fueron cruzados entre sí para obtener la transmisión vía germinal del alelo mutante de TPC2.³ Los ratones TPC1/2 KO derivan de cruces dihíbridos entre los anteriormente mencionados TPC1 KO y TPC2 KO.²¹⁵

3.2. Tejidos de rata.

Para los estudios del efecto de la dieta alta en grasa sobre la expresión cardíaca de TPC1 y TPC2 se utilizaron ratas Sprague-Dawley alimentadas durante 18 semanas con dieta normal (3.85 kcal/g, 10% de grasa, 20% de proteína, 70% de hidratos de carbono) (Research Diets, Inc. USA) o dieta alta en grasa (4.73 kcal/g, 45% de grasa, 20% de proteína, 35% de hidratos de carbono) (Research Diets, Inc. USA) que fueron sacrificadas a las 21 semanas de vida por decapitación. Los corazones fueron una donación de la Dra. Luisa María Seoane Camino, del grupo de Investigación de Fisiopatología Endocrina del Instituto de Investigaciones Sanitarias de Santiago de Compostela.

Para los estudios sobre el efecto del ayuno sobre la expresión cardíaca de TPC1 y TPC2 se utilizaron ratas Sprague-Dawley alimentadas durante 18 semanas con dieta estándar del animalario (2.9 kcal/g, 3.10% de grasa, 16.1% de proteína) (Scientific Animal Food & Engineering, FR) y se mantuvieron 36 horas en ayuno antes de su sacrificio por decapitación. Los corazones fueron de nuevo una donación de la Dra. Luisa María Seoane Camino.

Para los estudios sobre el efecto del sexo sobre la expresión cardíaca de TPC1 y TPC2 se utilizaron ratas hembras y machos Sprague-Dawley alimentados con dieta estándar del animalario, que fueron sacrificadas a las 8 semanas de vida por decapitación. Los corazones fueron de nuevo una donación de la Dra. Luisa María Seoane Camino.

Para los estudios sobre el efecto de las hormonas sexuales sobre la expresión cardíaca de TPC1 y TPC2 se utilizaron ratas hembras y machos Sprague-Dawley alimentados con dieta estándar del animalario, que fueron sometidas a ovariectomía o

gonadectomía según procediese, manteniéndose durante 1 semana y a continuación a un grupo de ellas se les realizó un reemplazo con una cánula, que contenía estrógenos o testosterona respectivamente, durante 3 días. Finalmente fueron sacrificadas por decapitación. Los corazones fueron de nuevo una donación de la Dra. Luisa María Seoane Camino.

Los neonatos de rata Sprague-Dawley de hasta 72 horas de vida se sacrificaron mediante dislocación cervical. Los corazones extraídos se utilizaron para realizar cultivos primarios (ver a continuación). Salvo que se indique lo contrario, se utilizaron machos adultos para la realización de los experimentos. En todos los casos, los tejidos se extrajeron y se congelaron inmediatamente a -80°C .

4. Cultivos Celulares.

4.1. Cultivo de cardiomiocitos adultos humanos.

Se utilizaron cardiomiocitos adultos atriales humanos de pacientes sometidos a cirugía cardíaca con *bypass* cardiopulmonar. Se lavó el apéndice atrial en tampón fosfato salino (PBS) (137 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 10 mM de Na_2HPO_4 , 1.8 mM de KH_2PO_4 , 1 mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 0.5 mM de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, a pH 7.4) y se cortó en trozos muy pequeños lo más rápido posible. La digestión del apéndice atrial se realizó en solución enzimática (0.25% de tripsina, 0.15% de colagenasa tipo II y 0.02% de glucosa en PBS) durante 5 minutos y en agitación a 37°C . La primera digestión se descartó y se recogieron las cuatro siguientes. A cada una de las digestiones se le añadió un 10% de NCS (suero de ternero recién nacido) y se centrifugó a 2000 g durante 5 minutos. El total de células obtenido se resuspendió en medio de cultivo (10% de suero fetal bovino (FBS) (Life Technologies, USA), 1% de penicilina/estreptomina (Cámbrex, USA) y 89% de Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Merck Millipore, Alemania)) y se sembró en placas previamente tratadas durante 24 horas con matriz extracelular (1% de fibronectina en gelatina al 0.02% (BD, USA)). El medio de cultivo se renovó cada 24 horas.

4.2. Cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata.

Para realizar el cultivo de cardiomiocitos neonatales de rata se utilizaron neonatos de rata Sprague Dawley de hasta 72 horas de vida como máximo. Los cardiomiocitos presentan un número fijo de divisiones durante el desarrollo embrionario y fetal tras el cual entran en estado postmitótico.²³⁹ Durante las primeras 48 horas de vida de los neonatos, los cardiomiocitos todavía conservan en parte la capacidad de proliferar,²³⁹ por lo que tras la siembra se pueden dividir una o dos veces.

Los corazones extraídos se trocearon en tres o cuatro porciones y se mantuvieron en tampón ADS (6.8 g/l de NaCl, 4.76 g/l de HEPES, 0.12 g/l de NaH₂PO₄, 1.0 g/l de glucosa, 0.4 g/l de KCl, 0.1 g/l de MgSO₄ y 0.02 g/l de rojo fenol, a pH 7.4) hasta su digestión. Las digestiones se realizaron en la siguiente solución enzimática: 80 unidades/ml de colagenasa tipo Ia y 0.6 mg/ml de pancreatina. Se realizaron 5 digestiones a 37°C en agitación. La primera de 30 minutos se desechó, mientras que las cuatro siguientes se recogieron y se incubaron durante 20 minutos. El volumen utilizado de solución enzimática se ajustó según el número de neonatos, manteniendo la proporción de 6 ml/digestión por cada 14 corazones. A cada una de las digestiones se le añadió un 10% de NCS y se centrifugó a 2000 g durante 5 minutos. El total de células obtenido se resuspendió en medio de cultivo (66% de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's medium*) (Lonza, Suiza), 17% de medio M199, 10% de FBS (Life Technologies, USA), 5% de NCS (Merck Millipore, Alemania), 1% de penicilina/estreptomina (Cámbrex, USA) y 1% de L-glutamina)) y se realizó una siembra diferencial durante 2-3 horas sobre superficies de cultivo no tratadas con matriz extracelular, con el fin de aumentar la pureza del cultivo dejando sedimentar los fibroblastos para posteriormente desecharlos. Se recogió la suspensión celular de cardiomiocitos y se centrifugó a 2000 g durante 5 minutos. Las células obtenidas se sembraron con una densidad de 50000 células/cm² en placas previamente tratadas durante 24 horas con matriz extracelular de fibronectina. El medio de cultivo se suplementó con arabinósido de citosina (AraC) (farmacia hospitalaria) a una dosis de 10 µM para inhibir la proliferación de los fibroblastos. El medio se renovó cada 24 horas. Con esta técnica conseguimos un grado de pureza de cardiomiocitos del 90-99% (se comprueba utilizando la técnica de

inmunohistoquímica para la cadena pesada de la miosina), con un rendimiento de aproximadamente 10^7 células por cada 40 neonatos.

4.3. Cardiomiocitos auriculares adultos de ratón: línea celular HL-1.

La línea celular de cardiomiocitos de ratón HL-1 fue donada por el Dr. William C. Claycomb (Louisiana S.U., Medical Centre, New Orleans, USA) y deriva de la línea celular AT-1 de cardiomiocitos auriculares adultos de ratón pertenecientes a la cepa C57BL/6J.²⁴⁰ Las características de esta línea hacen que sea un buen modelo para el estudio del funcionamiento de los cardiomiocitos a nivel celular y molecular, ya que son capaces de multiplicarse conservando el fenotipo específico de las células cardíacas adultas: expresión de la cadena pesada de miosina, de alfa-actina cardíaca y de conexina 43, y mantenimiento de la actividad contráctil.²⁴⁰

El cultivo de esta línea celular se realizó sobre superficies de cultivo previamente tratadas con matriz extracelular de fibronectina durante 24 horas. Se sembraron a una densidad de 50000 células/cm². Las células se mantuvieron en medio Claycomb suplementado con 10% de FBS, 1% de penicilina/estreptomicina (Lonza, Suiza) y 1% de L-glutamina (Lonza, Suiza). El medio de cultivo se renovó cada 24 horas. Para el mantenimiento de la línea, cuando las células alcanzaron el 90% de confluencia, se incubaron con tripsina-EDTA durante 3-5 minutos a 37°C. La tripsina se inactivó con DMEM con un 10% de FBS y las células se centrifugaron a 2000 g durante 5 minutos. Las células se resuspendieron en el medio de cultivo y se realizó un pase 1:3.

5. Silenciamiento de TPC1 y TPC2 en cardiomiocitos en cultivo.

Los cardiomiocitos neonatales de rata se incubaron con los siguientes ARN de interferencia (siRNA) 24 horas después de la siembra: control negativo (SIC 001, Sigma Aldrich, USA), TPC1 (SASI_Rn01_00107855 y SASI_Rn01_00107855_AS, Sigma Aldrich, USA) y TPC2 (ON-TARGET plus TPC2, GE Healthcare, UK). Los siRNAs se reconstituyeron a una concentración de 50 μ M. En primer lugar, se prepararon dos mezclas siguiendo el protocolo de la casa comercial con pequeñas modificaciones (GE Healthcare, UK):

- siRNAs con medio Opti-MEM (Thermo Fischer Scientific, USA). 200 nM de TPC1, 100 nM de TPC2 o la mezcla de ambos se diluyeron en medio Opti-MEM.
- El reactivo de transfección DharmaFECT 1 (GE Healthcare, UK) con el medio Opti-MEM, a una concentración de 1µl DharmaFECT/100µl.

Ambas mezclas se incubaron por separado durante 5 minutos a temperatura ambiente y, posteriormente, se mezclaron y se incubaron durante otros 20 minutos. Los cardiomiocitos, previamente lavados 3 veces con medio DMEN, se incubaron con esta mezcla durante 6 horas y, a continuación, se les añadió medio de cultivo. 48 horas después, los cardiomiocitos fueron sometidos a privación de suero. La bafilomicina A1 (inhibidor de la bomba V-ATPasa y que por lo tanto modifica el pH lisosomal) se usó a una concentración de 100 nM y fue añadida al medio de cultivo 2 horas antes de la finalización del tratamiento, en los casos correspondientes.

6. Infección por adenovirus de cultivos de cardiomiocitos neonatales de rata.

Los cardiomiocitos neonatales de rata se sembraron en cubreobjetos previamente tratados con una matriz extracelular de fibronectina. 24 horas después de ser silenciados con siRNA control, siTPC1, siTPC2 o siTPC1/2, las células fueron infectadas con adenovirus que expresan GFP-LC3 (multiplicidad de infección 10) amablemente cedidos por la Dra. Beverly Rothermel y el Dr. Josep A. Hill, del departamento de Cardiología de la Universidad de Texas *Southwestern Medical Center*.¹⁹⁰ Una vez transcurridas 24 horas tras la infección, los cardiomiocitos fueron privados o no de suero y posteriormente, fijados con paraformaldehído al 4% y examinados por microscopía confocal. La bafilomicina A1 se usó a una concentración de 100 nM y fue añadido al medio de cultivo 2 horas antes de la finalización del tratamiento, en los casos correspondientes.

7. Proteómica.

7.1. Isoelectroenfoque y electroforesis en gel de 2 dimensiones (2-DE).

Para el estudio proteómico se utilizaron corazones de ratones machos wt y KO para TPC1 (TPC1 KO). Los corazones se diseccionaron en tres partes: aurícula, ventrículo derecho y ventrículo izquierdo, utilizándose en nuestro estudio solo el ventrículo izquierdo, que inmediatamente fue liofilizado. El liofilizado resultante se resuspendió en 500 μ l de tampón 2-DE (65 mM de ditiotreitól, 65 mM de CHAPS, 5 M de urea, 2 M de tiourea, 0.15 M de NDSB-256, 200 nM de tributilfosfina, 100 nM de NaF, 1 M de Na_3VO_4 , 1 M de Benzamidina) y se almacenó a -80°C hasta su uso posterior.

La electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida es una de las herramientas más empleadas para el análisis global, la separación y la identificación de los distintos componentes del proteoma. Dicha técnica permite la separación de cientos o miles de proteínas en un único gel, mostrando un patrón característico. La separación se realiza en base a dos parámetros: 1) 1ª dimensión: isoelectroenfoque (IEF), en el cual las proteínas se separan en función de su punto isoeléctrico (pI), 2) 2ª dimensión: SDS-PAGE donde las proteínas se separan por su peso molecular.

Para la primera dimensión (IEF) se utilizaron tiras IPG (*immobilized pH gradients*) de 24 cm, con un rango de pH de 4-7 (GE Healthcare, UK) usando el equipo Protean IEF Cell (BioRad, USA). Para ello se resuspendieron 500 μ g de proteína por tira, en un volumen final de 250 μ l de tampón 2-DE con anfolitos (compuestos de bajo peso molecular que poseen carga eléctrica) al 0.1% (pH 3-10) y al 0.05% (pH 2-4 y 9-11) (Serva, Alemania). Los anfolitos, además de ayudar a que las proteínas migren con mayor facilidad hacia su punto isoeléctrico, también ayudan a solubilizar la muestra en el tampón 2-DE, por eso muchas veces es conveniente colocar un pequeño porcentaje de anfolitos de un rango de pH mucho más amplio que el utilizado en la tira.

La mezcla se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos para eliminar los restos de sales. Se colocó en los carriles habilitados para tal efecto, donde se realizó una hidratación pasiva de 24 horas, recubriendo la tira con aceite mineral para evitar la evaporación del buffer, seguida de una rehidratación activa de 12 horas. El voltaje final

al que se somete cada tira es de 20000 V, siguiendo el protocolo detallado a continuación:

- 250 V lineal durante 30 minutos.
- 500 V lineal durante 1 hora.
- 1000 V lineal durante 1 hora.
- 4000 V lineal durante 2 horas.
- 8000 V lineal durante 2 horas.
- 1000 V lineal durante 1 hora.
- 1000 V lineal hasta alcanzar los 20000 V.

Una vez alcanzados los 20000 V, se retiraron las tiras y se equilibraron durante 15 minutos en 4 M de urea, 2 M de tiourea, 50 mM de Tris pH 6.8, 2% de SDS, 12 mM de ditiotretitol y 30% de glicerol, sometiéndolas a continuación a una electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% utilizando el Proteome Plus Dodeca (BioRad, USA), utilizando el correspondiente tampón de electroforesis (14.4 g/l de glicina, 3.03 g/l de Tris Base y 5 ml de SDS al 10%). Las tiras de corrieron a un amperaje constante de 15 mA por gel durante 12 horas, hasta que el frente alcanzó el borde inferior. Los geles se fijaron en metanol/acético (10/7%) y se tiñeron con Sypro-Ruby (Lonza, Suiza) durante 12 horas. A continuación, se realizó la destinción durante 1 hora en la misma solución de fijación, se lavaron en agua milliQ y se procedió a su escaneado utilizando el Typhoon (Typhoon FLA 7000, GE Healthcare, UK) (ver adquisición y análisis de imagen).

Para la realización de los western blots en dos dimensiones se siguió el mismo procedimiento que en la 2-DE, solo que, en este caso, en lugar de realizar la tinción, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (GE Healthcare, UK) y se utilizaron anticuerpos específicos para la detección de la proteína: *fatty acid binding protein 3* (FABP3, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, USA), enolasa (1:200, Santa Cruz Biotechnology, USA) y fosfoglicerato kinasa 1 (PGK1, 1:200 R&D systems, USA).

Es importante mencionar que en la primera dimensión para detectar la fosfoglicerato kinasa se utilizaron tiras IPG con un rango de pH de 3-12, debido a que el pI teórico de esta proteína es de 8.02.

7.2. Adquisición y análisis de las imágenes obtenidas de los geles 2-DE.

Los geles 2-DE se escanearon utilizando el escáner de fluorescencia Typhoon (Typhoon FLA 7000, GE Healthcare, UK). Las imágenes escaneadas fueron procesadas con el programa Progenesis SameSpots (versión 4.5) (Nonlinear Dynamics, USA). El alineamiento de los distintos geles se realizó tanto manual como automáticamente. Todos los geles se compararon entre sí, y el análisis estadístico lo realizó el propio programa, que calcula tanto el p valor como el estadístico 1-way ANOVA. Se consideró que una proteína estaba diferentemente expresada entre dos condiciones, cuando el $p < 0.05$ y $fold\ change > 1.8$. Una vez realizado el análisis de imagen, los *spots* de interés se cortaron y se guardaron en agua mili-Q hasta su digestión trípica para la correspondiente identificación de proteínas.

7.3. Análisis proteómico por LC-MALDI-MS.

La 2-DE presenta algunas limitaciones: 1) es una técnica muy laboriosa que requiere bastante tiempo y es difícil de automatizar; 2) está limitada por el número y el tipo de proteínas a resolver, ya que las proteínas muy grandes o hidrofóbicas no entran en el gel durante la primera dimensión y las proteínas muy ácidas o muy básicas no se resuelven bien; y 3) hace difícil la detección de proteínas poco abundantes, por lo que en los últimos años se han desarrollado otras metodologías que permiten superar estos inconvenientes.²⁴¹ Una de estas técnicas es el LC-MALDI, en el que, tras la digestión trípica de la muestra, la separación de los péptidos se realiza mediante cromatografía líquida en fase reversa.²⁴² La ventaja de este procedimiento es que los péptidos van a ser separados por hidrofobicidad, y van a poder ser identificados aunque estén en cantidades muy pequeñas.²⁴³ Una vez separados, los péptidos se depositaron junto a la matriz en una placa especial para MALDI TOF/TOF, y la identificación de proteínas se realizó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF.²⁴² A continuación, vamos a denominar a esta combinación de técnicas como LC-MALDI-MS.

Para el análisis mediante LC-MALDI-MS, se utilizaron 200 μg de proteína de cada condición en un gel de poliacrilamida al 10%. La electroforesis se paró una vez que el frente se introdujo unos 3 mm en el gel (este procedimiento se realiza con el fin de

concentrar toda la proteína en una fina banda para poder llevar a cabo la digestión *in gel* de la proteína).^{244,245} La banda de proteínas se visualizó mediante tinción fluorescente con Sypro-Ruby (Lonza, Suiza), se recortó y se procedió a su digestión trípica manual.

7.4. Digestión de proteínas.

En todos los casos, la digestión se hizo manualmente siguiendo el protocolo definido por Shevchenko y col. (1996),²⁴⁶ con modificaciones menores, en el servicio de proteómica del Instituto de Investigaciones Sanitarias de Santiago de Compostela.

Las bandas/*spots* obtenidas mediante los dos procesos anteriores se lavaron 3 veces en una solución 50 mM de bicarbonato de amonio y 50% de metanol (de alto grado de pureza-grado HPLC) en agitación. Tras los lavados, los *spots* se dejaron 10 minutos en acetonitrilo y se secaron al vacío durante otros 10 minutos. Una vez secos, se les añadió 50 μ l de 10 mM de ditioneitol (DTT) en 50 mM de bicarbonato amónico (esto permitió la reducción de los enlaces disulfuro de las proteínas) y se dejaron a 56°C durante 30 minutos. A continuación, se volvieron a realizar los lavados y, tras el secado, se añadió 50 μ l de 55 mM de iodoacetamida en 50 mM de bicarbonato amónico (la solución tiene que estar preparada fresca) durante 20 minutos en oscuridad, lo que permitió la alquilación de los grupos S-libres. Tras realizar nuevamente los lavados y proceder al secado al vacío, se añadió a cada *spot* 4 μ l de la solución de tripsina (20 ng/ μ l en 20 mM de bicarbonato amónico). Posteriormente, los *spots* se cubrieron con el doble de solución de 20 mM de bicarbonato amónico y se incubó toda la noche a 37°C.

La extracción de los péptidos se realizó mediante 3 incubaciones de 20 minutos con 60% de acetonitrilo (ACN) y 0.5% de ácido fórmico (HCOOH) en agitación. Tras cada incubación se recogió el sobrenadante (péptidos) y se guardó en un tubo limpio. A continuación, se secaron al vacío durante 2 horas y se guardaron a -20°C hasta su utilización. Para el análisis de MALDI-TOF/TOF, las muestras secas se disolvieron en 4 μ l de 20% de acetonitrilo (ACN) y 0.5% HCOOH. Para el LC-MALDI-MS (cromatografía líquida acoplada a MALDI) la mezcla de péptidos se disolvió en 10-20 μ l de 0.1% de ácido fórmico y 2% de ACN.

7.5. Identificación de proteínas mediante MALDI-TOF/TOF.

Para el análisis por MALDI de las proteínas seleccionadas por 2-DE, se usó un equipo 4800 MALDI-TOF/TOF analyzer (Applied Biosystems, USA). Volúmenes iguales (0.5 μ l) de péptidos y solución de matriz (3 mg de CHCA disueltos en 1 ml de ACN al 50% en ácido trifluoroacético al 0.1%) se depositaron por el método de capa fina en una placa MALDI 381 Opti-TOF (Applied Biosystems, USA). Los espectros de masas (MS) se adquirieron en modo reflector positivo con un láser de longitud de onda de 355 nm de Nd:YAG, con un promedio de 1000 disparos de láser. Al menos tres picos de autólisis de tripsina se utilizaron para la calibración interna. Todos los espectros masas/masas (MS/MS) se obtuvieron mediante la selección automática de los precursores con una resolución relativa de 300 (FWHM) y supresión metaestable.

El análisis de los espectros se realizó mediante el uso del software 4000 *Series Explorer Software V3.5* (ABSciex, USA). Los datos de los espectros de MS y MS/MS se combinaron utilizando el software *GPS Explorer v3.5* (ABSciex, USA) y, mediante el programa *Mascot v2.1* (Matrix Science, USA) se realizó la búsqueda en una base de datos no redundante (UniProt/SwissProt). Las búsquedas se limitaron a *Mus musculus*, seleccionando como modificación fija la carbamidometilación de la cisteína y como modificación variable la oxidación de la metionina. La búsqueda se realizó poniendo una tolerancia de 30 ppm para las MS y 0.35 Da para las MS/MS, y poniendo solo una alteración en un aminoácido. Todos los espectros de la base de datos fueron inspeccionados manualmente en detalle utilizando el programa anterior. Las proteínas con una puntuación superior a 56 ($score > 56$) se aceptaron como significativas, considerando positiva su identificación cuando el intervalo de confianza (CI%) estaba por encima de 98. En el caso de los espectros MS/MS, el intervalo de confianza debería de estar por encima de 95. Se define como intervalo de confianza el cálculo estadístico que se basa en la distribución de probabilidades normales que permiten comparar los resultados procedentes de varias búsquedas, de forma que si el CI% está próximo al 100% indica sin duda alguna que la proteína está identificada.

7.6. Identificación de proteínas por LC-MALDI-MS.

La separación de las mezclas de péptidos trópicos resultantes se realizó por cromatografía líquida en fase reversa LC-MALDI mediante el uso del Nano-HPCL Ultra nanoLC plus (Eksigent, ABSciex, USA). El nano-HPLC está acoplado a un *spotter* (Eksigent, ABSciex, USA) lo que permitió ir depositando una mezcla de los péptidos separados junto a la matriz en placas MALDI para su identificación.

Las mezclas peptídicas se resuspendieron en 15 μ l de 0.1% ácido fórmico 2% de ACN mediante sonicación. Las muestras se inyectaron en un *loop* (columna de Trampa ChromXP nanoLC 350 micras ID x 0.5 mm, 3 m ChromXP C18 120A, ABSciex, USA) a una velocidad de flujo de 10 μ l/min (0.1% de ácido fórmico al 2% ACN) donde permanecieron 15 minutos para resuspendirse bien en el tampón. Después, los péptidos pasaron a una precolumna donde se eliminan los posibles contaminantes que pueden dañar la columna, y finalmente se separan en una nanocolumna (columna nanoLC ChromXP 75 micras id x15 cm, 3 μ m ChromXP C18 120^a, ABSciex, USA) a una velocidad de flujo de 300 nl/min en una elución de gradiente lineal desde 95% de solución A (0.1% ácido fórmico al 2% ACN) a 60% de solución B (90% de ACN, 0.1% FA) en 80 minutos, seguidos de un aumento de hasta el 95% de B en 5 minutos. Los péptidos que se eluyeron se mezclaron con una solución matriz, que constaba de 3 mg de alfa-ciano-4-hidroxicinámico (CHCA- α) disuelto en 1 ml de 50% de ACN en ácido trifluoroacético al 0.1%, y 10 fmol/ μ l de angiotensina (utilizado como estándar interno) y se depositaron sobre un inserto Opti-TOF LC/MALDI (ABSciex, USA) con una velocidad de un *spot* por cada 12 segundos.

El análisis de espectrometría de masas se realizó utilizando el analizador de MALDI-TOF/TOF 4800 (ABSciex, USA). Los espectros de MS se adquirieron en modo reflector positivo con un láser de longitud de onda de 355 nm de Nd:YAG y con un promedio de 1000 disparos de láser por MS. Se utilizó como control para calibración interna el pico de 1296.685 de la angiotensina I. Todos los espectros MS/MS se llevaron a cabo mediante la selección de los precursores con una resolución relativa de 300 (FWHM) y supresión metaestable. La identificación de los péptidos y las proteínas se realizó utilizando el software Protein Pilot v. 4.0.80.85 (ABSciex, USA) con el algoritmo Paragon. Los datos de MS/MS se analizaron utilizando la base de datos

Uniprot/SwissProt (julio de 2014, Swiss-Prot, Suiza). Las búsquedas se limitaron a *Mus musculus*, seleccionando como modificación fija la carbamidometilación de la cisteína y como modificación variable la oxidación de la metionina. La tolerancia de los precursores se fijó en 30 ppm, mientras que la tolerancia de los MS/MS en 0.35 Da, permitiendo un aminoácido modificado en la secuencia. Solo las proteínas con un umbral >95% de confianza fueron consideradas como positivas.

8. Extracción de proteínas.

Se lavaron las células con PBS y se les añadió 6.7 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ de tampón de lisis (5% de Tris-Base a 1 M con pH 7.5, 5% de NaCl a 5 M, 30% de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7+10\text{H}_2\text{O}$, 1% de EDTA a 0.5 M, 20% de NaF a 5 M, 10% de Triton X-100 al 10%, 1% de Na_3VO_4 a 0.1 M, 1% de PMSF a 0.1 M, 1% de aprotinina, 1% de leupeptina y 25% agua miliQ). Se lisaron las células con ayuda de un raspador. Se mezcló el lisado utilizando un agitador tipo vórtex y tras 30 minutos de reposo en hielo se centrifugó a 13000 g durante 16 minutos a 4°C. Se recogió el sobrenadante y se conservó a -20 °C.

9. Cuantificación de proteínas: Método de Bradford.

Para determinar la concentración de proteínas en solución se utilizó el método de Bradford, utilizando el reactivo Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, USA). El procedimiento se basa en la formación de un complejo entre el colorante Coomassie[®] Brilliant Blue G-250 y las proteínas, de forma que el complejo proteína-colorante causa el cambio del máximo de absorción del colorante de 465 a 595 nm. El colorante Coomassie se une principalmente a aminoácidos básicos y aromáticos, especialmente a la arginina. La cantidad de absorción es proporcional a la cantidad de proteínas.

Para calcular la concentración proteica de las muestras, se utilizó una recta patrón de seroalbúmina bovina (BSA) comprendida entre 2.5 y 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en agua miliQ y un 20% de Bio-Rad Protein Assay. Para la cuantificación de las muestras, se realizó una dilución 1:200 en agua miliQ. La absorbancia se midió tras 5 minutos de incubación a una longitud de onda de 595 nm en el espectrofotómetro Ultrospec 1100 pro (GE Healthcare Life Sciences, USA). Para calcular la concentración proteica se extrapolaron

los valores obtenidos de absorbancia de las muestras en la recta patrón de BSA utilizando una recta de regresión lineal.

10. Western blot.

Utilizamos la técnica de western blot para estudiar la expresión y activación de determinadas proteínas de interés. Mediante una electroforesis en gel de acrilamida (30% Acrylamide/Bis Solution, BioRad, USA), se separan las proteínas en función de su tamaño. En general, se utilizaron geles al 5% de acrilamida para proteínas de 60-200 kDa, geles al 10% para proteínas de 16-70 kDa y geles del 15% para proteínas de 12-45 kDa, con Tris-Base a 1.5 M con pH 8.8, SDS al 10%, APS al 10% y TEMED. Se preparó un gel concentrador sobre el gel separador, que tiene un tamaño de poro más grande. Para el gel concentrador se utilizó un 4% de acrilamida, Tris-Base a 1.5 M con pH 6.8, SDS al 10%, APS al 10% y TEMED a distintas cantidades en función del volumen final de preparación.

Se diluyeron las proteínas en tampón de carga (25% de Tris-Base a 0.5M + 0.4% de SDS con pH 6.8, 20% de glicerol, 4% de SDS, 0.2% de 2-mercaptoetanol y 0.001% de azul de bromofenol) y se hirvieron durante 5 minutos antes de cargarlas en el gel. Se utilizó como marcador de peso molecular el *High Range Rainbow* (GE Healthcare, UK). La electroforesis se realizó a 80 V constantes durante 3 horas en frío en tampón de electroforesis (3 g/l de Tris-Base, 14.4 g/l de glicina y 0.96 g/l de SDS), utilizando el sistema Mini-PROTEAN[®] Precast Gels (BioRad, USA).

Una vez terminada la electroforesis, se realizó la transferencia de las proteínas del gel a una membrana de PVDF (Amersham Hybond[™], GE Healthcare Life Sciences, USA), previamente activada según las instrucciones del fabricante, durante 1 hora a un amperaje constante de 0.28 A en tampón de transferencia (5.81 g/l de Tris-Base, 2.93 g/l de glicina, 0.375 g/l de SDS y 5% de metanol), utilizando el sistema Mini Trans-Blot[®] Electrophoretic Transfer Cell (BioRad, USA). La membrana se bloqueó utilizando PBS (con 1% BSA y 0.1% *tween*) o leche desnatada en polvo al 5% durante 1 hora, y se incubó con los siguientes anticuerpos durante toda la noche (Tabla 4).

	Anticuerpo	Dilución
TPC1	Santa Cruz Biotechnology, USA	1:500
TPC2	Santa Cruz Biotechnology, USA	1:200
phospho-AMPK (Thr 172)	Cell Signaling Technology, USA	1:1000
AMPK	Cell Signaling Technology, USA	1:1000
phospho-mTOR (Ser2448)	Santa Cruz Biotechnology, USA	1:1000
mTOR	Santa Cruz Biotechnology, USA	1:1000
LC3	Cell Signaling Technology, USA	1:1000
p62	Cell Signaling Technology, USA	1:1000
GAPDH	Sigma Aldrich	1:1000
β -actina	Thermo Fisher Scientific	1:1000
FABP3	Santa Cruz Biotechnology, USA	1:1000
Enolasa	Santa Cruz Biotechnology, USA	1:200
Fosfoglicerato kinasa 1	R&D systems, USA	1:200

Tabla 4. Anticuerpos y diluciones utilizadas.

La membrana se reveló utilizando el kit Immobilion Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck Millipore, Alemania) en el sistema de revelado UVP EC3 Imaging System (UVP, USA).

Para cuantificar los niveles de proteína se densitometraron utilizando el programa libre ImageJ.²⁴⁷

11. Extracción de ARN.

Para la extracción de ARN se utilizó como tampón de lisis el reactivo comercial TRIzol[®] (Life Technologies, USA) seguido del sistema de microcentrifugaciones en columna NucleoSpin kit[®] (Macherey-Nagel, Alemania).²⁴⁸

El TRIzol[®] es una solución monofásica de fenol e isocianato de guanidina que durante la homogenización o lisis de la muestra mantiene la integridad del ARN, al mismo tiempo que disuelve los componentes celulares. La adición de cloroformo seguida de centrifugación separa la muestra en dos fases, una de ellas acuosa y la otra orgánica. El ARN permanece exclusivamente en la fase acuosa, que se recupera por precipitación con etanol. A continuación utilizamos el sistema de microcentrifugaciones de NucleoSpin[®] (Macherey-Nagel, Alemania). Este sistema representa una tecnología bien estabilizada para la purificación del ARN. Este método combina las propiedades de

unión selectivas de membranas basadas en gel de sílice con microcentrifugaciones, de forma que gracias a una solución tampón específica de alta concentración salina permite retener en la membrana hasta 100 µg de ARN de más de 200 pares de bases. El etanol proporciona las condiciones de unión adecuadas del ARN a la columna, donde el ARN total se une a la membrana y los contaminantes se eluyen de forma eficiente mediante distintos lavados.

Para ello, se lavaron con PBS las células o tejido y se añadió TRIzol[®] en función de la cantidad de tejido o tamaño del plato de cultivo (500-1000 µl). Se le añadió cloroformo en proporción TRIzol:cloroformo 5:1 y se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos. Se recogió la fase acuosa y se repitió el proceso. A continuación, se recogió la fase acuosa y se mezcló con un volumen de etanol de 70°. A partir de este paso se continuó la extracción utilizando las columnas del RNeasy[®] Mini kit siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación del ARN se realizó en el Nano-drop[®] ND-1.000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA).

12. RT-PCR.

Para determinar la expresión génica de determinados genes de interés se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) mediante los siguientes métodos:

-RT-PCR en un solo paso con SYBR[®] Green: la reacción de RT-PCR se realizó a partir de 50 ng de ARN, cebadores OligodT (Agilent Technologies, USA) y el sistema Brilliant III Ultra-Fast SYBR[®] Green QRT-PCR Master Mix (Agilent Technologies, USA) en un Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante de acuerdo al siguiente patrón térmico: 1 ciclo de 10 minutos a 50°C, 1 ciclo de 3 minutos a 95°C, 40 ciclos de 20 segundos a 95°C y 20 segundos a 60°C. Como control de ADN genómico se realiza un punto sin retrotranscriptasa, y como control negativo se realiza un punto sin ARN. Se utilizaron los siguientes cebadores de interés a una concentración de 500 nM (Costoya, España):

Cebadores	Secuencia	GenBank	Pares de bases
humano TPC1	Sentido:TGTGGAGTACTTGTCTTCCG Antisentido:CAGCACGTTGCGGTAGCG	NM_001143819.2	175
humano TPC2	Sentido:GCTGACCACTTACCGCAG Antisentido:GAAGCTCAAAGTCCGTTGGC	NM_139075.3	190
humano GAPDH	Sentido:GATCATCAGCAATGCCTCCT Antisentido:ATGGCATGGACTGTGGTCAT	NM_001256799.2	108

Tabla 5. Cebadores sintéticos utilizados para el método Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QRT-PCR Master Mix (Agilent Technologies, USA).

-RT-PCR en dos pasos con SYBR® Green: partiendo de 1 µg ARN se sintetizó ADNc utilizando cebadores OligodT (SABiosciences, USA) y el RT² First Strand Kit (SABiosciences, USA) según las instrucciones del fabricante en un Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies, USA) con un perfil térmico de 15 minutos a 42°C y 5 minutos a 95°C. La reacción de RT-PCR se realizó con el RT² Real-Time™ SYBR® Green/Rox PCR master mix (SABiosciences, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante, en un Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies, USA) con un perfil térmico de 1 ciclo de 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 40 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C. Se utilizaron los siguientes cebadores de interés a una concentración de 500 nM (SABiosciences):

Cebadores	Nº catálogo	Pares de bases	GenBank
humano TPC1	PPH08675A	86	NM_017901.4
humano TPC2	PPH13927	124	NM_139075.3
humano GADPH	PPH00150E	175	NM_002046,3

Tabla 6. Cebadores comerciales utilizados para el método RT² First Strand Kit (SABiosciences, USA) y RT² Real-Time™ SYBR Green/Rox PCR master mix (SABiosciences, USA)

-RT-PCR en dos pasos con Taqman®: partiendo de 1 µg ARN se sintetizó ADNc utilizando cebadores OligodT (Roche Diagnostics, CH), hexámeros aleatorios (Roche Diagnostics, CH) y el Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics, CH), según las instrucciones del fabricante, en un Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies, USA) con un perfil térmico de 10 minutos a 25°C y 30 minutos a 55°C. La reacción de RT-PCR se realiza con la FastStart Universal Probe Master

(Roche Diagnostics, CH), siguiendo las instrucciones del fabricante, en un Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies, USA), con un perfil térmico de 1 ciclo de 10 minutos a 95°C y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 60°C. Se utilizaron los siguientes cebadores de interés a una concentración de 500 nM (Roche Diagnostics, CH):

Cebadores	Nº ensayo	Pares bases	GenBank
rata TPC1	50591	68	NM_139332
rata TPC2	505914	71	NM_001107566
rata 18S	502300	78	XO1117
ratón TPC1	317112	70	NM_145853
ratón TPC2	317114	78	NM_146206
ratón 18S	307906	106	NR_003278

Tabla 7. Cebadores comerciales utilizados con el método Taqman (Roche Diagnostics, CH).

En los casos necesarios, se realizó un gel de agarosa al 1% teñido con SYBR Safe® (Life Technologies, USA) para ver el producto de amplificación, utilizando el UVP EC3 Imaging System (UVP, USA) como sistema de revelado.

13. Ensayo de captación de ácidos grasos: BODIPY®.

El ensayo de captación de ácidos grasos permite medir la capacidad celular para incorporar ácidos grasos de cadena larga. El BODIPY®, acrónimo de boro-dipirrometano, es un fluoróforo compuesto por el dipirrometano unido a un átomo de Boro, el cual está sustituido por una unidad BF₂. El nombre de la IUPAC (Internacional Union of Pure and Applied Chemistry) para el BODIPY® es 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene. Este fluoróforo es lipofílico, por lo que sondas que incorporen este compuesto presentan propiedades similares a los lípidos naturales, permitiendo mimetizar el transporte y metabolismo de ácidos grasos en la célula.

Este ensayo se realizó en cultivo primario cardiomiocitos neonatales de rata silenciados con siRNA control, siTPC1, siTPC2 y siTPC1/2. Tras 48 horas de silenciamiento, las células se privaron de suero durante 2.5 horas, utilizando como control positivo insulina a una concentración de 100 nM. Terminado el tratamiento, se

lavarón las células con PBS a temperatura ambiente y se añadió BODIPY[®] 500/510 C₁, C₁₂ (Life Technologies, USA) a una concentración de 10 μ M y seroalbúmina bovina libre de ácidos grasos (BSA-FFA) a una concentración de 20 μ M en PBS durante 30 segundos, tiempo tras el cual, se lavó rápidamente con BSA-FFA al 0.1% en PBS frío para eliminar el BODIPY[®] que queda fuera de las células. Se añadió tripsina-EDTA durante 3-5 minutos a 37°C para recoger las células y se inactivó con PBS frío. Se centrifugaron las células a 2000 g durante 5 minutos y se resuspendió el *pellet* en yoduro de propidio 1 μ M en PBS para marcar y descartar las células muertas de la determinación de la incorporación de BODIPY[®]. Se incubaron las células con el yoduro durante 15 minutos en oscuridad y se midió la fluorescencia de la muestra mediante citometría de flujo utilizando un FACScalibur (Becton & Dickinson, USA) y el programa CellQuest (Becton & Dickinson, USA).

14. Ensayo de actividad mitocondrial: MTT.

El 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) es un sistema simple, preciso y reproducible para medir la actividad de células vivas a través de la actividad deshidrogenasa mitocondrial. El MTT es una sal que disuelta en medios de cultivo sin rojo fenol o en soluciones tampón es de color amarillo. Las células vivas son capaces de captar este compuesto del medio y metabolizarlo en las mitocondrias. Las deshidrogenasas mitocondriales eliminan el anillo de tetrazolio, haciendo que el compuesto cambie de color amarillo a púrpura. Este cambio de color puede ser medido espectrofotométricamente a una longitud de onda de 550 nm, de forma que un aumento en el número de células vivas supone un aumento en la cantidad de MTT metabolizado por las deshidrogenasas mitocondriales.

Se utilizó esta técnica para comprobar si el silenciamiento de los TPCs afectaba a la actividad mitocondrial de los cardiomiocitos neonatales de rata en cultivo. En primer lugar, los cardiomiocitos fueron transfectados con siRNA control, siTPC1, siTPC2 o siTPC1/2. Tras 48 horas del tratamiento, se privaron de suero durante 6, 24 y 48 horas. Cuatro horas antes de finalizar el tratamiento se añadió MTT (Life Technologies, USA) a una concentración de 0.5 μ g/ μ L. Para estimar la cantidad de MTT metabolizado se lisaron las células con un volumen de agente solubilizante (0.0837% de HCl al 37%

en SDS al 10%) y se determinó la absorbancia a 550 nm tras 6-24 horas en el lector de ELISA Multiskan[®]EX (Thermo Scientific, USA).

15. Microscopía electrónica.

La microscopía electrónica se realizó en ventrículos izquierdos de corazones de ratones wt (n=3) y KO (n=3) para TPC1/2. Las muestras se fijaron y postfijaron en 2.5% de glutaraldehído y tetróxido de osmio en tampón cacodilato de sodio y 1% OsO₄. La inclusión se realizó en la resina epóxido de Spurr. Se realizaron cortes ultrafinos que se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo.

En este estudio, el tejido se define morfométricamente utilizando el analizador de imagen MOP 20 (Carl Zeiss, Oberkochen, FRG) con una ampliación constante para cada muestra. Se estableció el área celular, el área de lisosomas, y el número total de lisosomas de la célula sobre la base de 63 células examinadas.

16. Microscopía confocal.

Utilizamos la técnica de microscopía confocal para:

- Estudiar la posible movilización del transportador de glucosa GLUT-4 hacia la membrana plasmática tras el silenciamiento de TPC1 en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata.
- Determinar la acumulación de p62 en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata silenciados con siRNA control, siTPC1, siTPC2 y siTPC1/2.

Las células se sembraron en cubreobjetos redondos de 12 mm de diámetro, previamente tratados con fibronectina.

Para determinar la acumulación de la proteína adaptadora p62 y la movilización de GLUT-4 se realizaron tres lavados con PBS y se fijaron las muestras con paraformaldehído al 4% (Thermo Scientific, USA) en PBS a temperatura ambiente durante 20 minutos. Tras otros 3 lavados con PBS, se bloqueó y permeabilizó la membrana celular con un 2% de Triton X-100, 2% de Tween-20, 5% de suero de cabra y un 0.2% de BSA (PBT-T) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios se diluyeron en PBT-T: anti-p62 (Novus Biologicals, USA) a una

concentración de 1:200 y anti-GLUT-4 (Thermo Scientific, USA) a una dilución 1:200, y se incubaron según las instrucciones del fabricante. Se lavaron 3 veces las muestras con PBS durante 20 minutos y se añadió el anticuerpo secundario fluorescente en PBT-T, utilizando donkey anti-rabbit IgG (H+L) Dy-Light 550 conjugated durante 45 minutos a 37°C en oscuridad. Se repitieron los lavados de PBS y se realizó una incubación con TO-PRO 3 (Life Technologies, USA) a una concentración de 1:500 en PBT-T durante 10 minutos en oscuridad. El TO-PRO 3 es un colorante fluorescente que entra de forma pasiva en las células y se intercala entre el ADN de doble cadena marcando así los núcleos celulares. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos y se montaron sobre portaobjetos FLEX IHC Microscope Slides (Dako, Agilent Technologies, USA) utilizando Mowiol, que presenta el mismo índice de refracción que el aceite de inmersión y protege frente a la pérdida de fluorescencia de la muestra. Tras 12 horas a 4°C se analizaron las muestras utilizando el microscopio Leica DMIRE2 (Leica Microsystems, Alemania). El análisis y cuantificación de las imágenes se realizó con el programa libre ImageJ²⁴⁷ utilizando una proyección en Z y representando la fluorescencia media.

Los controles de la técnica utilizados fueron los siguientes:

- Control de autofluorescencia de las células: se procesó solo con PBT-T
- Control de inespecificidad del anticuerpo secundario: se procesó con PBT-T sin anticuerpo primario, y se le añadió solo el anticuerpo secundario y el marcador de núcleos TO-PRO3.

Para la cuantificación de la movilización del transportador de glucosa GLUT-4, se determinaron las regiones de interés de un tamaño fijo para cuantificar la fluorescencia de las regiones citoplasmáticas perinucleares y las regiones citoplasmáticas periféricas cercanas a la membrana plasmática dentro de cada célula, seleccionando las células de forma aleatoria dentro del campo visual y evitando cuantificar las células atípicamente largas o demasiado pequeñas, las células que no estén en contacto con al menos otra célula o las células con bordes citoplasmáticos atípicos o no diferenciados de las células vecinas. Las medidas de fluorescencia se representan como el cociente entre la región citoplasmática periférica y la región perinuclear.

17. Ensayo de captación de glucosa.

El ensayo de captación de glucosa se realiza comúnmente para medir el transporte y la actividad metabólica celular de la glucosa. Para ello se utiliza un análogo de la glucosa, la 2-desoxi-D-glucosa, marcada con un radioisótopo, en nuestro caso de tritio [³H]. La 2-desoxi-D-glucosa es un derivado de la glucosa que tiene el radical 2-hidroxilo sustituido por un hidrógeno, por lo que no es capaz de entrar en la ruta de la glucólisis. De este modo, una vez que entra en la célula se fosforila y no puede ser posteriormente metabolizada, por lo que permanece en el interior de las células, siendo un buen método para cuantificar la incorporación de glucosa por las mismas.

Se utilizó este ensayo para determinar si el silenciamiento mediante siRNA para TPC1, TPC2 y TPC1/2 estimula la incorporación de glucosa por parte de cardiomiocitos neonatales de rata en cultivo. 48 horas postransfección, las células se privaron de suero durante 2.5 horas, utilizando como control positivo insulina 100 nM durante 1 hora. Las células se lavaron con tampón salino HEPES (HBS: NaCl a 140 mM, KCl a 5 mM, MgSO₄ a 2.5 mM, CaCl₂ a 1 mM y HEPES a 20 mM, ajustado a pH 7.4) y se incubaron con 2-desoxi-D-glucosa 10 μM y 0.5 μCi/ml de 2-desoxi-D-³H-glucosa (Perkin Elmer, USA) en HBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron las células con NaCl al 0.9% y se lisaron con 250 μl de NaOH 0.05 N. Se recogieron 50 μl para cuantificar la proteína por el método Bradford (se utilizaron 20 μl), y el resto se transfirió a tubos específicos para contar la radiactividad en un contador de centelleo líquido, añadiendo a cada muestra 2 ml de líquido de centelleo Ecoscint H (National Diagnostics, USA). La lectura se realizó en el contador de centelleo líquido Tricarb[®] (Perkin Elmer, USA), con un tiempo de lectura por muestra de 5 minutos.

La captación no específica se determinó añadiendo a un punto sin tratamiento citocalasina B (que inhibe la incorporación de glucosa) a una concentración de 10 μM. Los valores obtenidos en este punto se restaron de todos los demás puntos de tratamiento, considerándose ruido de fondo. Los valores de glucosa captada se expresan en cpm/mg de proteína/minutos de exposición con la glucosa marcada.

18. Análisis estadístico.

-En el caso de muestras con distribución normal, se aplicó el test paramétrico t de Student.

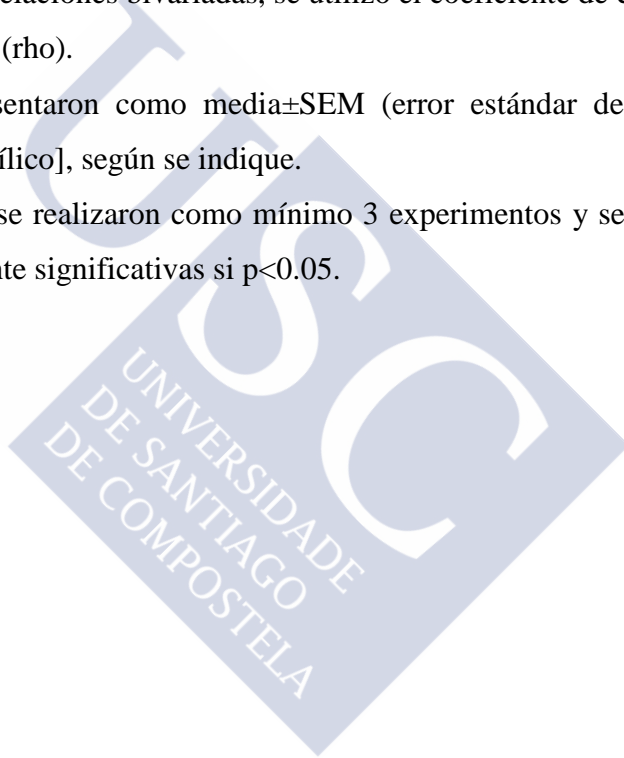
-En el estudio proteómico el programa de análisis Progenesis Samespots utilizó el estadístico 1-way Anova.

-En el caso de muestras que no siguen una distribución normal, se utilizaron los test no paramétricos U de Mann-Whitney para comparar entre grupos o el test de los rangos con signo de Wilcoxon para estudiar incrementos con respecto al control.

-En el estudio de correlaciones bivariadas, se utilizó el coeficiente de correlación no paramétrico de Spearman (ρ).

-Los datos se representaron como $\text{media} \pm \text{SEM}$ (error estándar de la media) o mediana [rango intercuartílico], según se indique.

-En todos los casos, se realizaron como mínimo 3 experimentos y se consideraron diferencias estadísticamente significativas si $p < 0.05$.







RESULTADOS



1. Estudio proteómico en corazón de ratones deficientes en TPCs.

1.1. Análisis proteómico en ventrículo de ratones KO vs. wt para TPC1 mediante la técnica 2-DE MALDI TOF/TOF.

Los corazones de los ratones wt (n=3) y KO para TPC1 (n=3) fueron diseccionados en: aurícula, ventrículo derecho y ventrículo izquierdo, utilizándose el ventrículo izquierdo para nuestro estudio proteómico, que se llevó a cabo mediante geles 2-DE, utilizando un pI entre 4-7 para la primera dimensión y geles de poliacrilamida al 12% para la segunda dimensión. Los geles fueron teñidos con Sypro Ruby y escaneados con el Typhoon. A continuación, se procedió al análisis estadístico con el programa Progenesis SameSpots, obteniéndose un gel representativo de las diferencias entre los ventrículos (Figura 14) de ratones KO vs. wt para TPC1.

Los resultados que se exponen a continuación corresponden al análisis de los geles obtenidos en ratones macho KO y wt para TPC1. También se realizó el mismo estudio en hembras, ya que nivel cardíaco se ha visto que existe un dimorfismo sexual (tanto en ratones como en humanos), que se cree que se debe, en parte, a los distintos niveles de estrógenos circulantes.²⁴⁹ Sin embargo, no conseguimos realizar el análisis de imagen comparativo entre wt y KO con el programa Progenesis SameSpots debido a la diversidad existente entre los distintos geles, lo que impidió el alineamiento de los mismos.

En el ventrículo izquierdo de ratones wt vs. KO para TPC1 el programa SameSpots reveló 1072 *spots*, 46 de ellos incrementados en ratones KO vs. wt y solo uno de ellos como disminuido en ratones KO vs. wt ($p < 0.05$ y *fold change* > 1.8). Los *spots* de interés se cortaron del gel y se procedió a su digestión trípica manual hasta, finalmente, obtener la correspondiente identificación de las proteínas de interés mediante MALDI TOF/TOF. En el ventrículo izquierdo, todos los *spots* excepto 3 fueron identificados, correspondiéndose con 29 proteínas únicas (Tabla 8) y 17 de ellas aparecieron en más de un spot (Tabla 9).

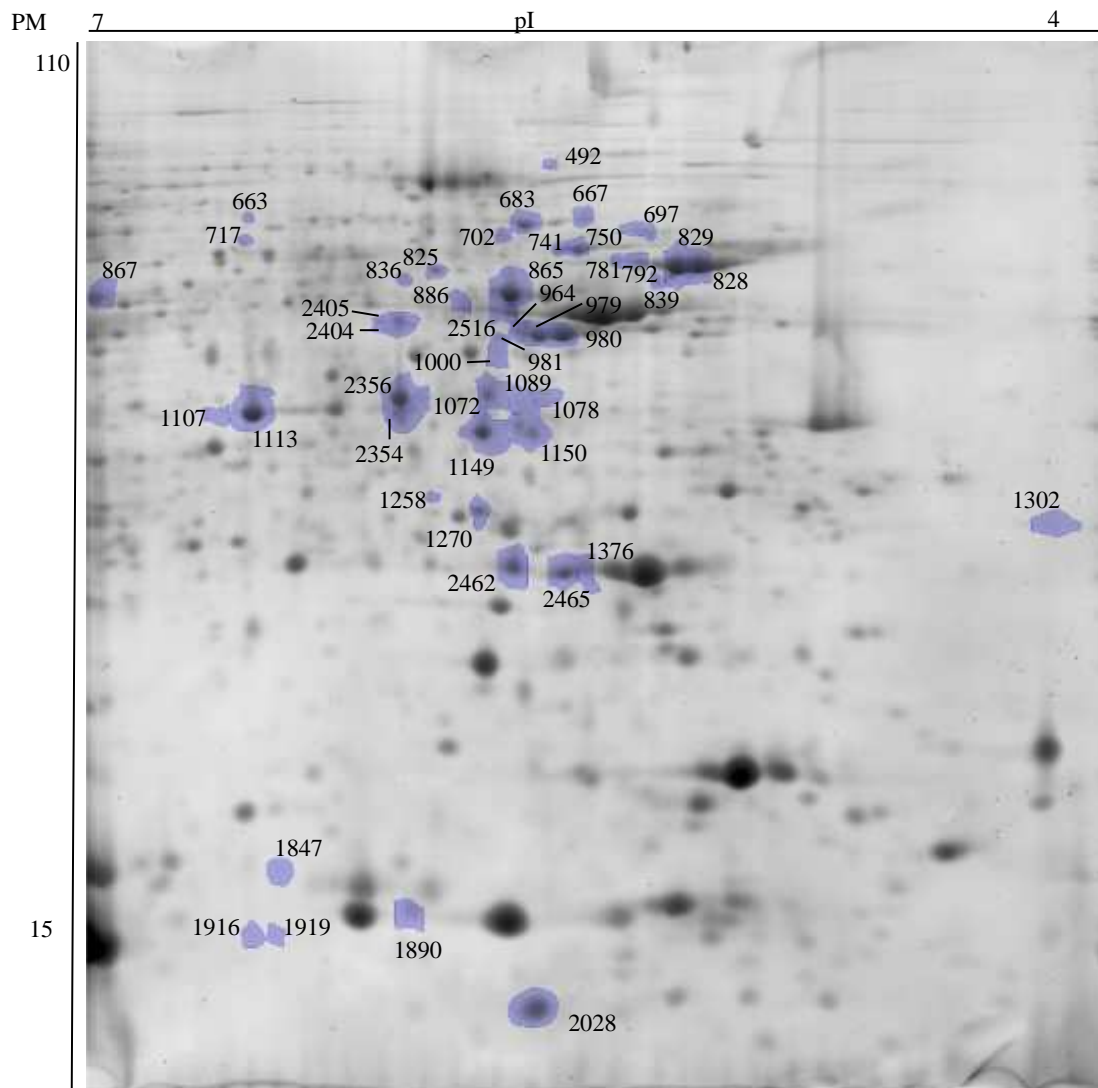


Figura 14. Gel virtual en dos dimensiones representativo de las diferencias entre ventrículo izquierdo de ratones wt y KO para TPC1. Tres ratones fueron seleccionados por grupo para realizar el correspondiente análisis. Las proteínas expresadas diferencialmente entre ambas condiciones están numeradas. Las proteínas se separan inicialmente según su pI y después en gels de poliacrilamida al 12%. Los gels fueron teñidos con Sypro Ruby.

Número mancha	Código Uniprot	Nombre proteína	Progenesis SameSpots		Teórico		Experimental		Puntuación	Péptidos únicos	Cobertura secuencia			
			Fold change	p	PM	pI	PM	pI						
492	MYH6_MOUSE	miosina 6	2.9	0.054	223	5.57	66	5.18	203	23	12%			
825			2.1	0.06			52	5.4				522	23	12%
492	MYH7_MOUSE	miosina 7	2.9	0.054	222.9	5.59	66	5.18	168	19	9%			
825			2.1	0.06			52	5.4				384	18	8%
1376	MYL3_MOUSE	miosina de cadena ligera 3	1.8	0.021	22.4	5.03	22	5.13	560	12	64%			
1890			-2.5	0.005			13	5.46				208	5	29%
2462			1.5	0.07			22	5.24				159	8	48%
2465			2.2	0.013			22	5.16				347	12	61%
492	QCR1_MOUSE	subunidad I del complejo citocromo b-c1, mit.	2.9	0.054	52.8	5.81	66	5.18	153	13	36%			
702			2.5	0.021			57	5.26				143	13	33%
865			2.2	0.007			47	5.24				321	6	20%
492	GRP75_MOUSE	proteína de choque térmico de 70 Kda	2.9	0.054	73.4	5.81	66	5.18	118	6	10%			
663	MDHC_MOUSE	malato deshidrogenasa, cit.	2.6	0.046	36.5	6.16	59	6.18	162	10	33%			
717			2.2	0.003			56	6.2				259	11	43%
1107			2.1	0.033			37	6.28				334	12	40%
1113			1.9	0.013			36	6.16				627	15	50%
2354			1.5	0.07			37	5.48				172	8	24%
663	DHSA_MOUSE	subunidad succinato deshidrogenasa (ubiquinona), mit	2.6	0.046	68	6.32	59	6.18	135	12	25%			
667	ACTBL_MOUSE	beta actina	1.8	0.034	42	5.3	59	5.13	137	3	9%			
697			2.6	0.023			57	5.03				102	4	10%
781			2.3	0.025			53	5.08				103	2	6%
2405			1.7	0.014			45	5.49				91	4	14%
697	VIME_MOUSE	vimentina	2.6	0.023	53.5	5.05	57	5.03	624	30	62%			
702	SUCB1_MOUSE	subunidad b de la succinil-CoA ligasa formadora de ADP, mit	2.5	0.021	50	6.57	57	5.26	136	12	25%			
2516			1.9	0.034			45	5.24				566	22	52%
741	DESM_MOUSE	desmina	2.4	0.013	53.36	5.21	55	5.17	484	19	52%			
750			2.1	0.006			54	5.14				1010	36	71%
1000			2.3	0.01			42	5.27				234	14	39%
781	ATPB_MOUSE	subunidad beta de la ATP sintetasa, mit.	2.3	0.025	56.3	5.19	53	5.11	869	25	74%			
792			2.4	0.0032			53	5.07				939	24	71%
839			2	0.038			50	5.05				307	15	44%
828			1.9	0.015			52	4.99				1040	24	71%
829			2	0.031			51	5.02				1160	24	71%
2028	ATP5J_MOUSE	factor acoplador 6 de la ATP sintasa, mit	1.8	0.056	12.5	9.36	9	5.2	151	6	52%			

(Continúa en la página siguiente)

Número mancha	Código Uniprot	Nombre proteína	Progenesis SameSpots		Teórico		Experimental		Puntuación	Péptidos únicos	Cobertura secuencia
			Fold change	p	PM	pI	PM	pI			
2028	ATP5J_MOUSE	factor acoplador 6 de la ATP sintasa, mit	1.8	0.056	12.5	9.36	9	5.2	151	6	52%
836	LDHB_MOUSE	cadena B de la lactato deshidrogenasa	1.8	0.058	36.44	5.7	50	5.48	110	11	37%
2356			2.4	0.014			38	5.49	465	18	66%
867	ENOB_MOUSE	beta-enolasa	1.9	0.04	46.9	6.73	47	6.8	471	22	61%
867	ENOG_MOUSE	gamma-enolasa	1.9	0.04	47.16	4.99	47	6.8	293	11	28%
964	TNNT2_MOUSE	troponina 3, del músculo cardíaco	1.9	0.004	35.8	4.98	44	5.23	505	16	42%
979			2.3	0.009			43	5.2	706	19	46%
980			1.9	0.037			43	5.16	755	20	47%
981			2.7	0.000545			43	5.26	145	10	28%
2404			1.9	0.03			44	5.49	147	7	23%
1258	NDUS3_MOUSE	NADH deshidrogenasa (ubiquinona) hierro-azufre 3 mit.l	2.1	0.05	30	5.67	29	5.42	286	9	34%
2462	NDUV2_MOUSE	NADH deshidrogenasa (ubiquinona) flavoproteína 2 mit	1.5	0.07	27.2	7	22	5.24	301	11	51%
1847	TTHY_MOUSE	transtirretina	2.7	0.059	15.7	5.77	15	5.91	179	6	76%
1890	FABPH_MOUSE	fatty acid-binding protein 3	-2.5	0.005	14.8	6.11	13	5.46	85	3	32%
2462	APOA1_MOUSE	apolipoproteína A-1	1.5	0.07	20.5	5.51	22	5.24	152	8	31%
2465			2.2	0.013			22	5.16	375	16	44%
781	ACTC_MOUSE	actina alfa del músculo cardíaco 1	2.3	0.025	42	5.23	42.3	5.08	155	25	29%
839			2	0.038			50	5.02	462	15	44%
886			2.1	0.06			46	5.33	132	8	26%
1072			2.1	0.000208			38	5.28	429	12	42%
1078			2.5	0.019			38	5.19	113	7	24%
2405			1.7	0.014			45	5.49	370	9	28%
981			2.7	0.000545			43	5.26	193	10	31%
667			1.8	0.034			59	5.13	624	14	54%
2516			1.9	0.034			45	5.24	183	12	38%
981			ACTH_MOUSE	actina gamma del músculo entérico liso			2.7	0.000545	41.8	5.3	43
683	CH60_MOUSE	proteína de choque térmico de 60 Kda	1.8	0.028	57.92	5.35	58	5.22	1120	27	61%
836	IDH3A_MOUSE	subunidad alfa de la isocitrato deshidrogenasa (NAD)	1.8	0.058	36.68	5.71	50	5.48	134	6	23%
1000			2.3	0.01			45	5.27	210	8	30%
1089	ODPB_MOUSE	piruvato deshidrogenasa componente E1	2.1	0.009	35.84	5.29	38	5.23	317	10	16%
1149			2.2	0.003			36	5.29	727	16	67%
1150			1.9	0.014			36	5.21	503	15	60%
1270	PHB_MOUSE	prohibitina	1.8	0.024	29.82	5.57	38	5.28	739	14	61%

Tabla 8. Proteínas identificadas como diferenciales en el análisis 2-DE MALDI TOF/TOF en el ventrículo izquierdo del corazón de ratones KO vs. wt para TPC1. Se representa el número de mancha, el código UniProt, el nombre de la proteína, el *fold change*, el p valor, el punto isoeléctrico, el peso

molecular tanto teórico como observado, la puntuación obtenida por MALDI TOF/TOF, los péptidos únicos encontrados y la cobertura de secuencia. mit., mitocondrial; cit., citoplasmática.

Las proteínas reguladas diferencialmente en el ventrículo izquierdo de ratones KO *vs.* wt para TPC1 se clasificaron de acuerdo con los criterios de las bases de datos NCBI, Phanter y Uniprot en 6 grupos principales atendiendo a su función biológica (Figura 15), observando que más del 50% de las proteínas identificadas como alteradas están relacionadas con procesos metabólicos a nivel cardíaco.

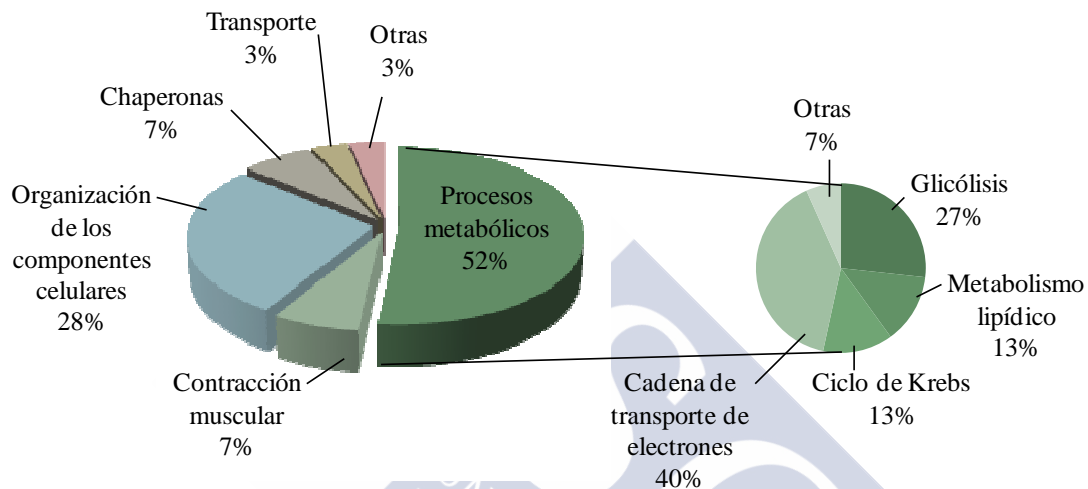


Figura 15. Diagrama que representa la clasificación de las proteínas identificadas como diferenciales en el ventrículo izquierdo de los ratones KO *vs.* wt para TPC1, mediante 2-DE MALDI TOF/TOF según la función biológica en la que participan de acuerdo con las bases de datos NCBI, Phanter y UniProt.

Las estrategias proteómicas se han utilizado a lo largo de estos últimos 10 años para incrementar el conocimiento de los mecanismos moleculares de los distintos sistemas biológicos, así como para la búsqueda de nuevos biomarcadores de las distintas enfermedades.²⁵⁰ La proteómica basada en geles, como la descrita en este apartado, ha sido el método más popular y versátil para la separación y cuantificación de proteínas, sin embargo, la identificación de proteínas con bajos niveles de expresión, bajo peso molecular y extremadamente básicas es difícil debido a las limitaciones del sistema 2-DE.²⁵¹ En los últimos años, las nuevas aproximaciones proteómicas proponen partir de mezclas proteicas complejas, digerirlas a péptidos y separarlas por cromatografía líquida de fase reversa (LC) para ser posteriormente analizadas mediante espectrometría de masas (MALDI-MS).²⁴² La tecnología LC-MALDI-MS posee una buena selectividad y además es rápida y precisa, lo que la convierte en una buena herramienta bioanalítica.

Esta tecnología ya ha sido usada en la caracterización de condiciones clínicas como el infarto de miocardio²⁵² o la diabetes,²⁵³ y en la búsqueda de biomarcadores para el cáncer.^{254,255} Esta tecnología también presenta sus limitaciones: no muestra las modificaciones postraduccionales y la potencial pérdida de péptidos, bien porque queden retenidos en la columna o bien porque, al ser poco abundantes, queden enmascarados por otros de mayor abundancia.²⁴² Por estos motivos, hemos utilizado ambas técnicas de forma complementaria. Así, para conocer la implicación de TPC1 y TPC2 en el metabolismo cardíaco, decidimos llevar a cabo un estudio cualitativo mediante LC-MALDI-MS en ventrículo izquierdo de ratones macho wt y KO para TPC1 y TPC1/2. En este segundo estudio, decidimos centrarnos en el ventrículo izquierdo de los ratones macho, debido a las dificultades de trabajar con los ratones hembra y, sobre todo, por el interés adicional que tiene el ventrículo izquierdo, al ser el encargado principal del bombeo de sangre hacia el resto del organismo.²⁵⁶

1.2. Estudio del ventrículo izquierdo de ratones KO vs. wt para TPC1 y TPC1/2 mediante LC-MALDI-MS.

Hallamos un total de 108 proteínas en el ventrículo izquierdo de ratones wt (n=3) y KO (n=3) para TPC1 (Apéndice) mediante LC-MALDI-MS. Las proteínas encontradas únicamente en los ventrículos izquierdos de los ratones KO para TPC1 (22) se agruparon en diferentes categorías según el proceso biológico en el que participaban (algunas proteínas están clasificadas en más de un grupo debido a que pueden tener un papel importante en más de un proceso), de acuerdo con los criterios de las bases de datos NCBI, Panther y UniProt (Tabla 9 y Figura 16). El hecho de que estas proteínas sean identificadas únicamente en el ventrículo izquierdo de ratones KO para TPC1 (y no en los wt) no se debe a que estas no estén presentes en los wt, sino a que en los ventrículos izquierdos de los ratones KO o bien sufren algún tipo de modificación o bien están en mayor abundancia, lo que permite su identificación.

Proceso biológico		Código UniProt	Nombre de la proteína
Procesos metabólicos	Glicólisis	ENOA_MOUSE	alfa-enolasa
		PGK1_MOUSE	fosfoglicerato kinasa 1
	Metabolismo lipídico	CPT2_MOUSE	carnitina palmitoiltransferasa 2, mit.
		ACSL1_MOUSE	acil CoA-ligasa de ácidos grasos de cadena larga 1
		ECHB_MOUSE	subunidad beta de la proteína trifuncional, mit.
	Ciclo de Krebs	ODO1_MOUSE	2-oxoglutarato deshidrogenasa, mit.
		DLDH_MOUSE	dihidrolipoil deshidrogenasa, mit.
	Cadena de transporte de electrones	ATPO_MOUSE	ATP sintasa subunidad O, mit.
		NDUS2_MOUSE	NADH deshidrogenasa (ubiquinona) hierro-azufre 2, mit.
		NDUS1_MOUSE	NADH-ubiquinona oxidoreductasa 75 Kda
		ATPG_MOUSE	subunidad gamma de la ATP sintasa, mit.
	Otras	CO3_MOUSE	complemento C3
		MYH7_MOUSE	miosina-7
		HIBCH_MOUSE	3-hidroxiisobutil-CoA hidrolasa, mit.
CMC1_MOUSE		proteína Aralar 1, mit.	
Contracción muscular	CMC2_MOUSE	proteína Aralar 2, mit.	
	MYPC3_MOUSE	miosina cardíaca proteína de unión-C	
Organización de los componentes celulares	MYH7_MOUSE	miosina-7	
	ACTG_MOUSE	actina 2 citoplasmática	
	MYPC3_MOUSE	miosina cardíaca proteína de unión-C	
	TBB2C_MOUSE	cadena beta 2C de la tubulina	
	TBA1C_MOUSE	cadena alfa 1C de la tubulina	
Procesos regulatorios intracelulares	MYH7_MOUSE	miosina-7	
	ACTG_MOUSE	actina 2 citoplasmática	
	CO3_MOUSE	complemento C3	
	TBB2C_MOUSE	cadena beta 2C de la tubulina	
	TBA1C_MOUSE	cadena alfa 1C de la tubulina	
Desarrollo	MYH7_MOUSE	miosina-7	
	ACTG_MOUSE	actina 2 citoplasmática	
	TBB2C_MOUSE	cadena beta 2C de la tubulina	
	TBA1C_MOUSE	cadena alfa 1C de la tubulina	
Procesos del sistema inmune	CO3_MOUSE	complemento C3	
Homeostasis del calcio	IMMT_MOUSE	mitofilina	
	CMC1_MOUSE	proteína Aralar 1, mit.	
	CMC2_MOUSE	proteína Aralar 2, mit.	

Tabla 9. Proteínas identificadas en el ventrículo izquierdo de ratones KO para TPC1, ausentes en wt mediante LC-MALDI-MS. Tres ratones fueron seleccionados por grupo para el correspondiente análisis. Las proteínas están clasificadas en función del proceso biológico en el que participan según las bases de datos NCBI, Phanter y UniProt. Se representa el código UniProt y el nombre completo de cada una de las proteínas. mit., mitocondrial.

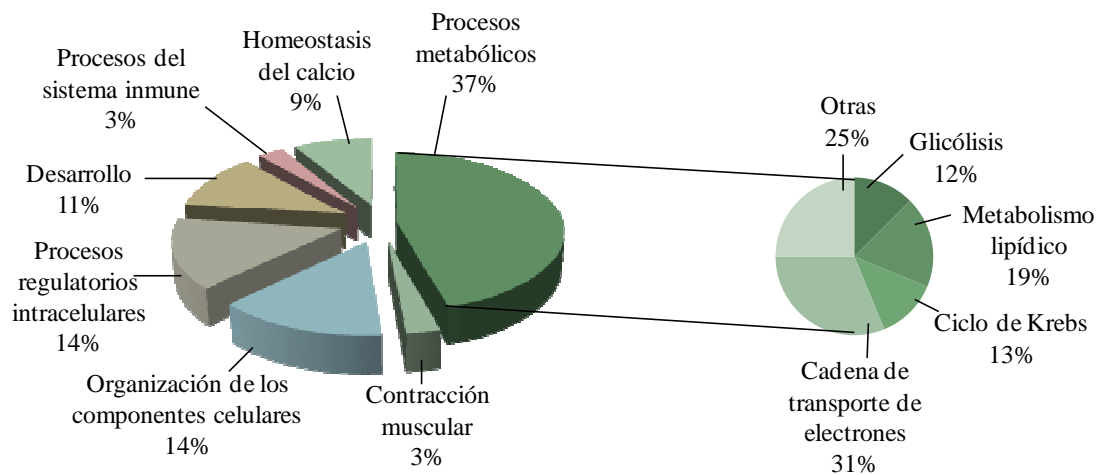


Figura 16. Diagrama que representa la clasificación de las proteínas encontradas en el ventrículo izquierdo de los ratones KO para TPC1 según la función biológica en la que participan de acuerdo con las bases de datos NCBI, Phanter y UniProt.

Identificamos una alteración mayoritaria en proteínas relacionadas con el metabolismo cardíaco en el ventrículo izquierdo de los ratones KO para TPC1, mediante dos metodologías distintas: 2-DE MALDI TOF/TOF (con una alteración del 52% de las proteínas, Figura 15) y LC-MALDI-MS (con una alteración de un 37% de las proteínas, Figura 16). El proceso biológico que sufre el segundo mayor cambio, en ambos casos, es la organización de los componentes celulares. Al comparar las proteínas identificadas por ambos métodos, observamos que aproximadamente el 60% (21) de ellas pueden considerarse comunes (Figura 17), entre ellas se encuentran proteínas que intervienen en la glucólisis, ciclo de Krebs, cadena de transporte de electrones y proteínas estructurales.

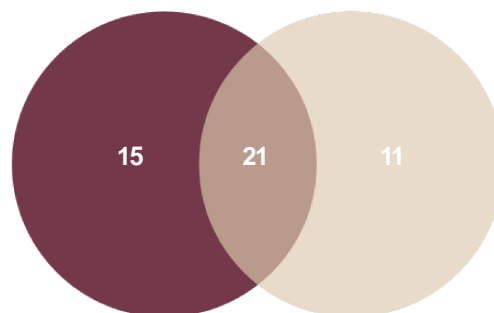


Figura 17. Número de proteínas identificadas mediante 2-DE MALDI TOF/TOF (granate), LC-MALDI-MS (beis) y mediante ambos en el ventrículo izquierdo de ratones KO vs. wt para TPC1 (camel).

A continuación, llevamos a cabo un análisis mediante LC-MALDI-MS en el ventrículo izquierdo de los ratones KO (n=3) y wt (n=3) para TPC1/2 e identificamos un total de 149 proteínas (Apéndice). Las proteínas encontradas únicamente en los ventrículos izquierdos de los ratones KO para TPC1/2 (43) se agruparon en diferentes categorías según el proceso biológico en el que participaban (algunas proteínas están clasificadas en más de un grupo debido a que pueden tener un papel importante en más de un proceso), de acuerdo con los criterios de las bases de datos NCBI, Phanter y UniProt (Tabla 10 y Figura 18).

Proceso biológico	Código UniProt	Nombre de la proteína	
Procesos metabólicos	Glicólisis	ODPA_MOUSE	piruvato deshidrogenasa subunidad alfa del componente E1
	Metabolismo lipídico	HYES_MOUSE	hidrolasa epóxido 2
		CPT1B_MOUSE	carnitina palmitoyltransferasa 1
		ACSL1_MOUSE	acil CoA-ligasa de ácidos grasos de cadena larga 1
		ECH1_MOUSE	delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoil-CoA isomerasa, mit.
		CACP_MOUSE	carnitina acil-transferasa
		APOA1_MOUSE	apolipoproteína A-1
	Ciclo de Krebs	ODO2_MOUSE	2-oxoglutarato deshidrogenasa
		DLDH_MOUSE	dihidrolipoil deshidrogenasa, mit.
		IDH3G_MOUSE	isocitrato deshidrogenasa (NAD) subunidad gamma, mit
	Cadena de transporte de electrones	COX2_MOUSE	subunidad 2 del citocromo C oxidasa
		UCRI_MOUSE	subunidad de Rieske citocromo b-c1
		NDUA4_MOUSE	NADH deshidrogenase (ubiquinone) 1 alfa
	Otros	EHD2_MOUSE	proteína 2 con dominio EH
		MPCP_MOUSE	proteína transportadora de fosfato, mit.
		M2OM_MOUSE	intercambiador de 2-oxoglutarato/malato
		EF1A2_MOUSE	factor de elongación 1-alfa 2
		TPIS_MOUSE	triosafosfato isomerasa
		ALDH2_MOUSE	aldehido deshidrogenasa, mit.
		AL4A1_MOUSE	delta-1-pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa, mit
Contracción muscular	AT2A2_MOUSE	ATPasa 2	
	AT1B1_MOUSE	subunidad beta 1 de la ATPasa sodio/potasio	
	TPM1_MOUSE	tropomiosina alfa-1	
	TNNT2_MOUSE	troponina T	
	ANXA6_MOUSE	anexina A6	
Organización de los componentes celulares o biogénesis	ACTG_MOUSE	actina 1 citoplasmática	
	TPM1_MOUSE	tropomiosina alfa-1	
	VINC_MOUSE	vinculina	
Adhesión	TITIN_MOUSE	títina	
	PGS2_MOUSE	decorina	
	VINC_MOUSE	vinculina	
	FIBG_MOUSE	cadena gamma del fibrinógeno	

(Continúa en la página siguiente)

Proceso biológico	Código UniProt	Nombre de la proteína
Procesos regulatorios intracelulares	TITIN_MOUSE	titina
	COX2_MOUSE	subunidad 2 del citocromo C oxidasa
	PGS2_MOUSE	decorina
	BASI_MOUSE	basigina
	FABPH_MOUSE	proteína de transporte de ácidos grasos del corazón
	EHD2_MOUSE	proteína 2 con dominio EH
	CASQ2_MOUSE	calsequestrina-2
	TPM1_MOUSE	tropomiosina alfa-1
	VINC_MOUSE	vinculina
	FIBG_MOUSE	cadena gamma del fibrinógeno
Desarrollo	PGS2_MOUSE	decorina
	ACTG_MOUSE	actina 1 citoplasmática
	FABPH_MOUSE	proteína de transporte de ácidos grasos del corazón
	MLRV_MOUSE	cadena ligera de la miosina
	VINC_MOUSE	vinculina
Procesos del sistema inmune	HS90B_MOUSE	proteína de choque térmico HSP 90-beta
	HSPB1_MOUSE	proteína de choque térmico beta-1
Regulación biológica	AT2A2_MOUSE	ATPasa 2 de calcio del retículo endoplásmico
	A1AT3_MOUSE	alfa-1-antitripsina 1-3
	EHD2_MOUSE	proteína 2 con dominio EH
	EF1A2_MOUSE	factor de elongación 1-alfa 2
Regulación de múltiples procesos	EHD2_MOUSE	proteína 2 con dominio EH
	MLRV_MOUSE	cadena ligera de la miosina
	TPM1_MOUSE	tropomiosina alfa-1
	TNNT2_MOUSE	troponina T
	HSPB1_MOUSE	proteína de choque térmico beta-1
Chaperonas	HS90B_MOUSE	proteína de choque térmico HSP 90-beta
	HSPB1_MOUSE	proteína de choque térmico beta-1
Otras	COQ9_MOUSE	proteína de biosíntesis de ubiquinona COQ9, mit
	TERA_MOUSE	ATPasa transitoria del retículo endoplásmico
	HBB1_MOUSE	subunidad beta-1 de la hemoglobina
	ES1_MOUSE	proteína homóloga ES1, mit
	PRDX5_MOUSE	peroxirredoxina-5, mit
	SMYD1_MOUSE	histona-lisina N-metiltransferasa Smyd1

Tabla 10. Proteínas identificadas en el ventrículo izquierdo de ratones KO para TPC1/2, ausentes en wt mediante LC-MALDI-MS. Tres ratones fueron seleccionados por grupo para el correspondiente análisis. Las proteínas están clasificadas en función del proceso biológico en el que participan según las bases de datos NCBI, Phanter y UniProt. Se representa tanto el código UniProt como el nombre completo de cada una de las proteínas.

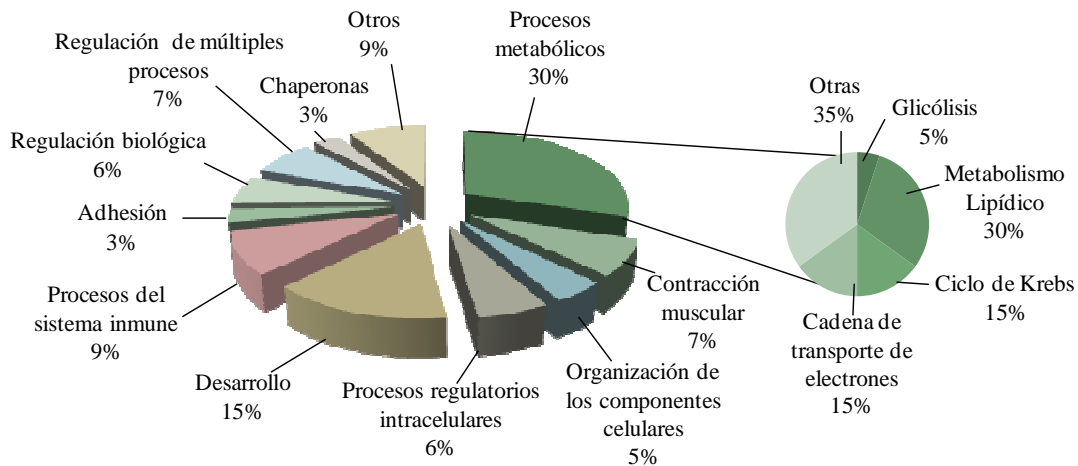


Figura 18. Diagrama que representa la clasificación de las proteínas encontradas en el ventrículo izquierdo de los ratones KO para TPC1 mediante LC-MALDI-MS según la función biológica en la que participan de acuerdo con las bases de datos NCBI, Panther y UniProt.

En este estudio realizado en ventrículo izquierdo de ratones KO vs. wt para TPC1/2, también se identificaron como procesos biológicos alterados el metabolismo cardíaco, la contracción muscular o la organización de los componentes celulares. Sin embargo, se identificaron además alteradas un significativo número de proteínas relacionadas con otros procesos biológicos, por lo que serán necesarios más estudios para determinar las diferencias existentes entre el ventrículo izquierdo de los ratones KO para TPC1 y los KO para TPC1/2.

1.3. Validación de los cambios en enolasa, fosfoglicerato kinasa 1 y FABP3 mediante western blot en el ventrículo izquierdo de los ratones wt y KO para TPC1.

La mayoría de las proteínas identificadas como alteradas en el ventrículo izquierdo de los ratones KO vs. wt para TPC1 fueron clasificadas como reguladoras de los procesos metabólicos (bien mediante la técnica de 2-DE MALDI TOF/TOF o bien mediante LC-MALDI-MS), lo cual nos llevó a comprobar si el metabolismo lipídico y glucídico estaba alterado, para lo cual determinamos cambios en proteínas identificadas como claves mediante western blot.

Enolasa.

Siguiendo con el análisis de los resultados obtenidos mediante 2-DE MALDI TOF/TOF y LC-MALDI-MS, la mayoría de las proteínas identificadas como incrementadas o alteradas en el ventrículo de ratones KO vs. wt para TPC1, se clasificaron como enzimas relacionadas con el metabolismo, y especialmente interesante resultó el hallazgo del incremento de enzimas implicadas en la glicólisis, proceso clave en el metabolismo cardíaco.

Nuestra siguiente aproximación fue la validación de la enolasa, proteína identificada mediante la técnica 2-DE MALDI TOF-TOF como incrementada de forma estadísticamente significativa (*fold change*=1.9 y $p<0.05$) en el ventrículo izquierdo de los ratones KO vs. wt para TPC1, e identificada únicamente en el ventrículo izquierdo de los ratones KO para TPC1, mediante LC-MALDI-MS.

Decidimos validar mediante western blot la enolasa porque, además de encontrarse modificada en los ratones KO para TPC1, y además ser una enzima que cataliza la transformación de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato durante la glicólisis, también juega un papel muy importante en otros procesos biológicos/patológicos como la miogénesis,²⁵⁷ la regulación de canales de potasio sensibles al ATP en cardiomiocitos (lo que podría tener efectos cardioprotectores)²⁵⁸ y la enfermedad cardiovascular isquémica²⁵⁹ e hipertrófica.²⁶⁰

En primer lugar, y al igual que en el caso anterior llevamos a cabo un western blot para determinar si existía una alteración en los niveles proteicos de enolasa, sin embargo, mediante esta técnica no conseguimos demostrar diferencias estadísticamente significativas entre el ventrículo izquierdo de los ratones wt y KO para TPC1 (Figura 19).

Para determinar si el incremento observado mediante 2-DE MALDI TOF/TOF se debía a una modificación postraducciona de la enolasa, llevamos a cabo un western blot en dos dimensiones en el ventrículo izquierdo de ratones wt y KO para TPC1, observando 5 modificaciones postraduccionales de la misma proteína, en donde solo una de ellas tiene un incremento estadísticamente significativo ($p<0.01$, $n=3$) (Figura 20).

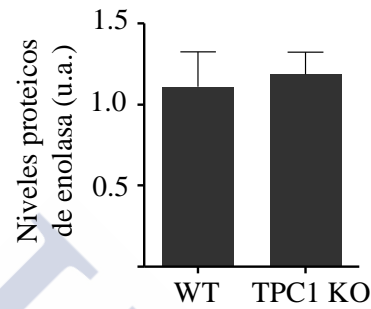
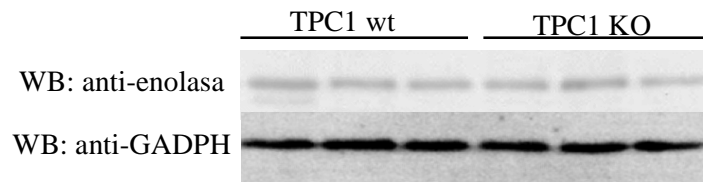


Figura 19. Los niveles proteicos de enolasa no están modificados en ventrículo izquierdo de ratones wt y KO para TPC1. Western blot y análisis estadístico representativo. u.a., unidades arbitrarias.

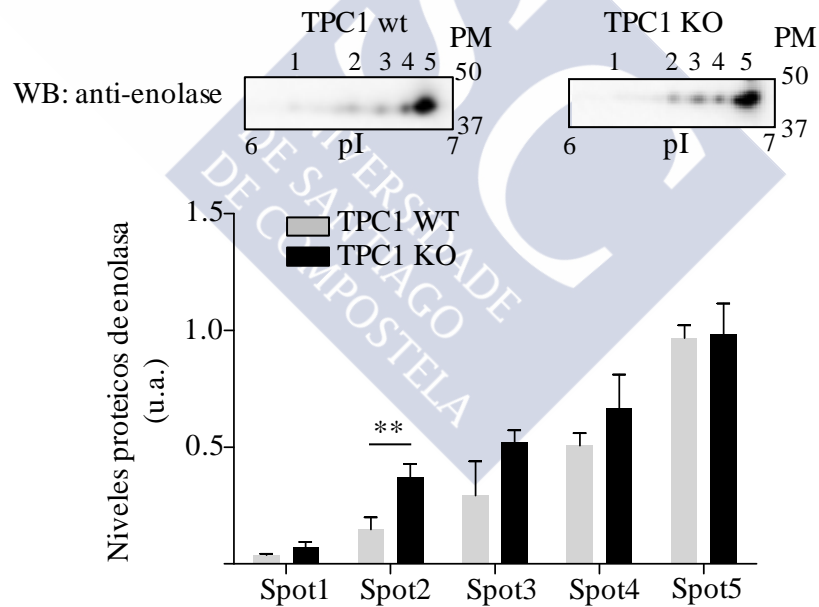


Figura 20. Una de las modificaciones postraduccionales de enolasa está incrementada en el ventrículo izquierdo de ratones KO vs. wt para TPC1. Western blot en dos dimensiones representativo y análisis estadístico de los niveles de las distintas modificaciones postraduccionales de enolasa en el ventrículo izquierdo de ratones wt y KO para TPC1. **, $p \leq 0.01$. u.a. unidades arbitrarias.

Fosfoglicerato kinasa 1.

Otra de las proteínas identificadas únicamente en los ratones KO para TPC1 mediante la técnica de LC-MALDI-MS que está implicada en la glicólisis (además de la enolasa, validada en el apartado anterior) fue la fosfoglicerato kinasa 1, que cataliza la conversión del 1,3-difosfoglicerato a 3-fosfoglicerato,²⁶¹ y que se ha sugerido además podría tener un papel importante durante la contracción cardíaca.²⁶² Llevamos a cabo un western blot monodimensional en el cual no encontramos diferencias estadísticamente significativas (Figura 21) y un western blot en dos dimensiones en el que observamos 4 modificaciones postraduccionales de la misma proteína, de las cuales solo una está incrementada ($p < 0.05$, $n = 3$) (Figura 22).

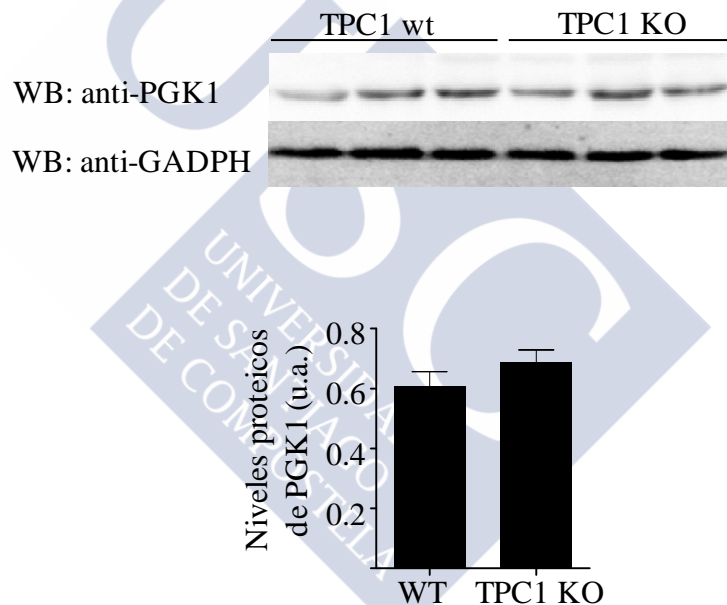


Figura 21. Los niveles proteicos de fosfoglicerato kinasa 1 (PGK1) no están modificados en ventrículo izquierdo de ratones wt y KO para TPC1. Western blot y análisis estadístico representativo. u.a., unidades arbitrarias.

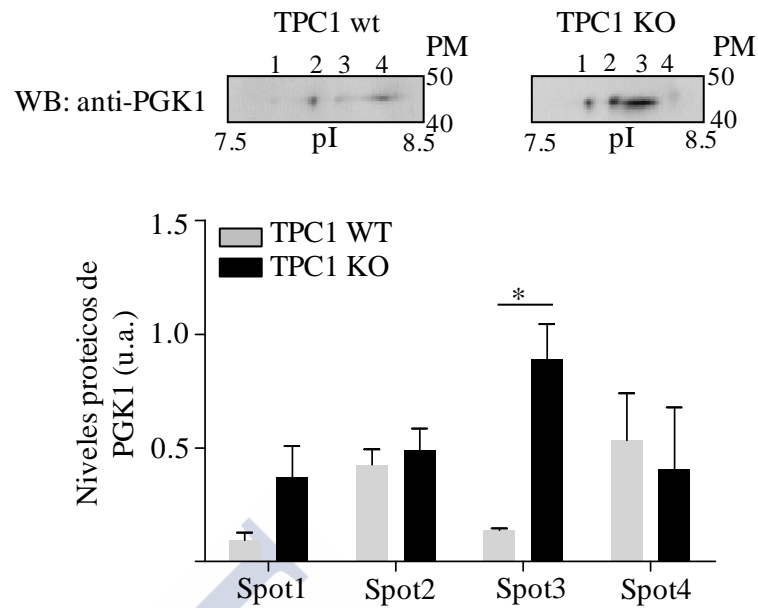


Figura 22. Una de las modificaciones postraduccionales de PGK1 está incrementada en el ventrículo izquierdo de ratones KO vs. wt para TPC1. Western blot en dos dimensiones representativo y análisis estadístico de los niveles de las distintas modificaciones postraduccionales de PGK1 en el ventrículo izquierdo de ratones wt y KO para TPC1. *, $p \leq 0.05$. u.a. unidades arbitrarias.

FABP3.

Decidimos validar la *fatty acid binding protein* (FABP3) por varios motivos: está involucrada en el transporte de ácidos grasos que proceden del exterior para la beta-oxidación que tiene lugar en la mitocondria, ayuda a la movilización de las reservas intracelulares de los mismos, y tiene gran relevancia como biomarcador en medicina cardiovascular, ya que sus niveles séricos son un marcador temprano de infarto agudo de miocardio; además, permite la detección y la evaluación del daño cardíaco en pacientes con insuficiencia cardíaca.²⁶³

El único *spot* disminuido en el ventrículo izquierdo de los ratones KO vs. wt para TPC1 (*spot* 1890), identificado mediante la técnica 2-DE MALDI TOF/TOF es una mezcla de una proteína del citoesqueleto (cadena ligera de la miosina) y una proteína del metabolismo lipídico, como la *fatty acid binding protein 3* (FABP3).

Para su validación, en primer lugar, realizamos un western blot para determinar si los niveles de FABP3 estaban alterados en ratones KO para TPC1 respecto a los wt. Determinamos que existe un incremento estadísticamente significativo en los niveles

totales de FABP3 en ventrículo izquierdo de ratones KO *vs.* wt para TPC1 ($p < 0.05$, $n = 6$) (Figura 23).

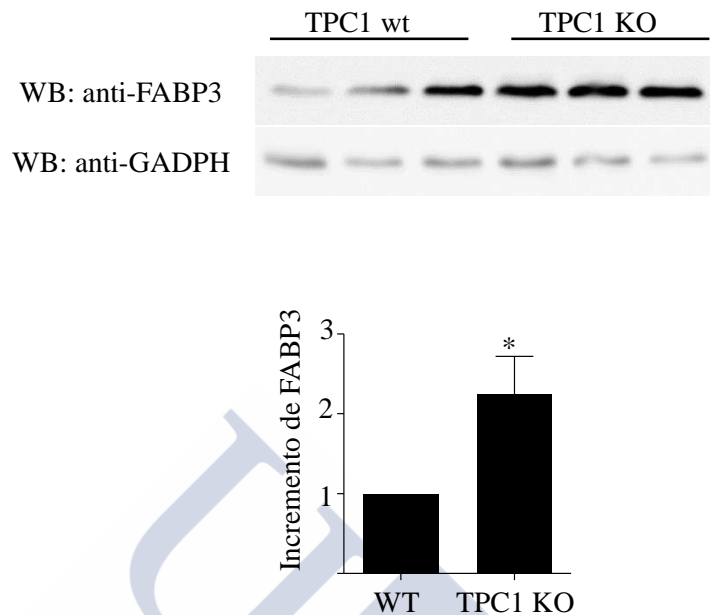


Figura 23. Los niveles proteicos de FABP3 están incrementados en ventrículo izquierdo de ratones KO *vs.* wt para TPC1. Western blot representativo y análisis estadístico de los niveles de FABP3 en ventrículo izquierdo de ratones wt y KO para TPC1. *, $p \leq 0.05$.

Para determinar si la disminución observada en el spot 1890 (formado por una mezcla de FABP3 y miosina) se debía a una modificación postraduccional de FABP3, llevamos a cabo un western blot en dos dimensiones en ventrículo izquierdo de ratones wt y KO para TPC1, en donde se observan 3 spots (comprendidos en un pI entre 4.5 y 5.5) para la proteína FABP3, uno de ellos con un incremento estadísticamente significativo en el ventrículo izquierdo de los ratones KO *vs.* wt para TPC1 ($p < 0.05$, $n = 3$) (Figura 24).

A la vista de los resultados anteriores, podemos concluir que la disminución en el spot 1890 observado mediante la técnica de 2-DE MALDI TOF/TOF no se debe a una modificación en los niveles de FABP3, y que quizás pueda deberse a un artefacto producido porque en el mismo *spot* (1890) se identificaron dos proteínas distintas: FABP3 y miosina. Sin embargo, hemos encontrado una modificación postraduccional en el ventrículo izquierdo de ratones KO *vs.* wt para TPC1 en una proteína (FABP3) clave en el metabolismo de los ácidos grasos a nivel cardíaco.

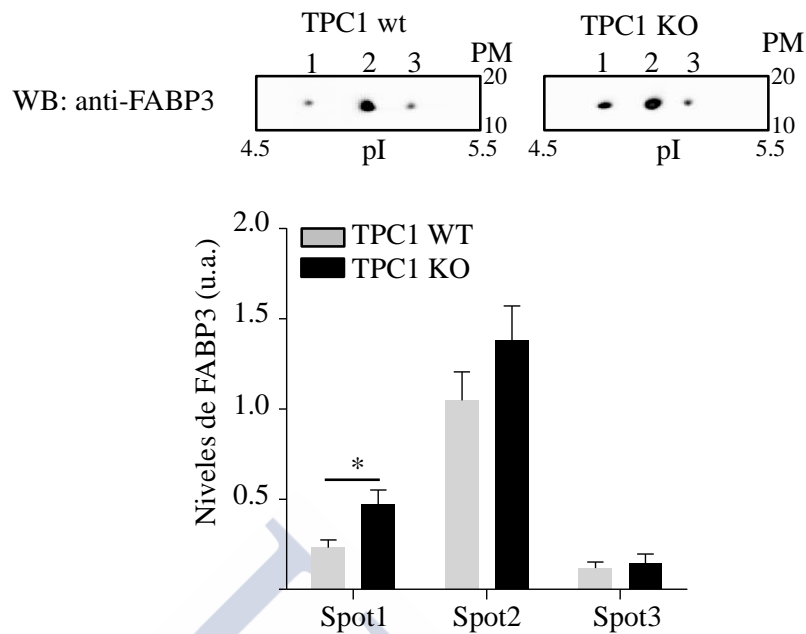


Figura 24. Una de las modificaciones postraduccionales de FABP3 está incrementada en el ventrículo izquierdo de ratones KO vs. wt para TPC1. Western blot en dos dimensiones representativo y análisis estadístico de los niveles de las distintas modificaciones postraduccionales de FABP3 en ventrículo izquierdo de ratones wt y KO para TPC1. *, $p \leq 0.05$. u.a. unidades arbitrarias.

1.4. Efecto del silenciamiento de los TPCs mediante siRNA sobre la captación de glucosa por parte de cardiomiocitos en cultivo.

Nuestra siguiente aproximación fue el silenciamiento mediante ARN interferente (siRNA) de TPC1, TPC2 y TPC1/2 *in vitro* en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata. De esta forma, la transfección en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata con un siRNA interferente para TPC1 induce un silenciamiento a nivel de ARNm de un $68.7 \pm 2.7\%$ para TPC1 ($p < 0.001$, $n=9$), mientras que la expresión a nivel de ARNm de TPC2 solo se ve reducida en un $26.4 \pm 18.2\%$ (n.s., $n=9$). Por otro lado, la transfección en cultivo primario de neonatos de rata con siTPC2 induce un silenciamiento a nivel de ARNm de un $54.1 \pm 1.1\%$ para TPC2 ($p < 0.01$, $n=9$), mientras que la expresión a nivel de ARNm de TPC1 solo se ve reducida en un $10.2 \pm 9.9\%$ (n.s., $n=9$) (Figura 25).

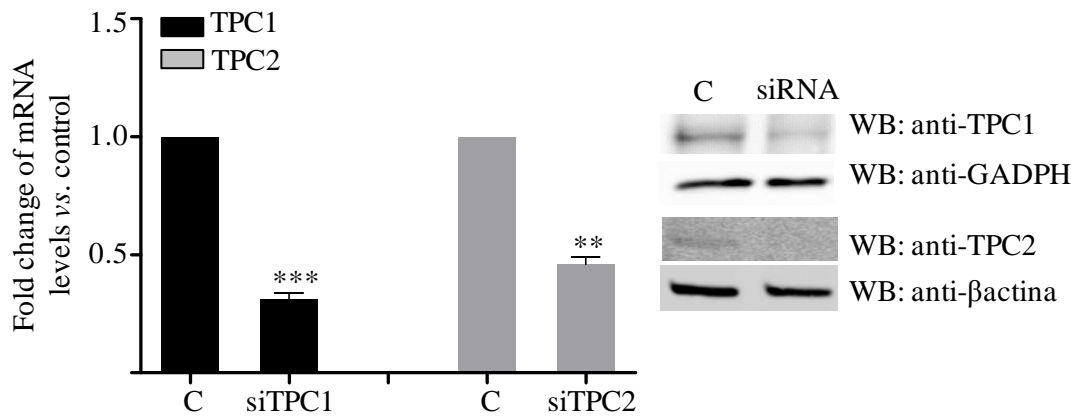


Figura 25. Efecto del silenciamiento mediante siRNA en los niveles de TPCs en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata. Las células fueron transfectadas con siRNA para TPC1, TPC2 y TPC1/2 durante 48 horas, tras las cuales se determinaron los niveles de ARNm (izquierda) y proteína (derecha). **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$.

La mayoría de las proteínas reguladas diferencialmente en el ventrículo izquierdo de los ratones KO para TPC1 y para TPC1/2 son enzimas claves en los procesos de glucólisis, del ciclo de Krebs o de la cadena respiratoria de electrones, lo que sugiere una posible alteración en el metabolismo de la glucosa en estos ratones. Por ello, decidimos determinar *in vitro* el efecto de la ausencia de los TPCs sobre la captación de glucosa. Así, el silenciamiento de TPC1, TPC2 y TPC1/2 incrementa la captación de 2-deoxi-D-[3H]-glucosa en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata en un $36.1 \pm 10.4\%$ con el siTPC1 ($p < 0.05$, $n=5$), en un $51.3 \pm 20.0\%$ con el siTPC2 ($p < 0.01$, $n=5$) y en un $52.6 \pm 17.3\%$ con el siTPC1/2 ($p < 0.01$, $n=5$), mientras que el tratamiento con 100 nM de insulina (control positivo) durante 1 hora incrementa la captación de 2-deoxi-D-[3H]-glucosa en un $33.3 \pm 7.2\%$ ($p < 0.01$, $n=5$) (Figura 26).

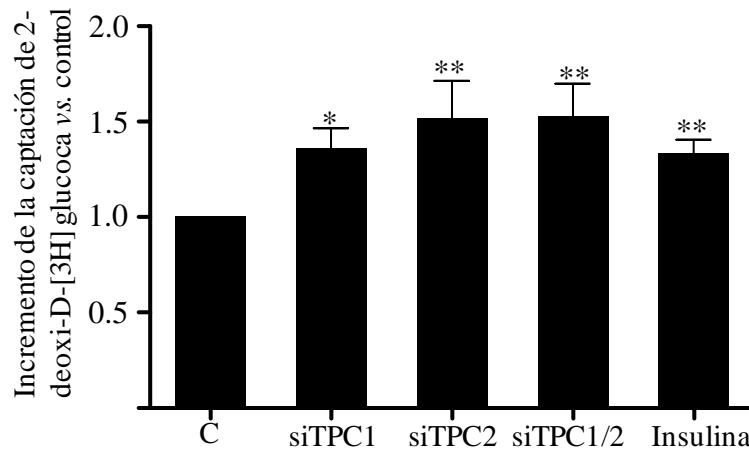


Figura 26. Efecto del silenciamiento de TPC1, TPC2 y TPC1/2 en la captación de 2-deoxi-D-[3H]-glucosa en el cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata. Las células fueron transfectadas durante 48 horas con los diferentes siRNAs para control, TPC1, TPC2 y TPC1/2 y a continuación se procedió al estudio de la captación de 2-deoxi-D-[3H]-glucosa. *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$.

1.5. Efecto del silenciamiento de TPC1 mediante siRNA sobre la movilización de GLUT-4 en cardiomiocitos en cultivo.

A la vista de los resultados anteriores, que muestran que los silenciamientos de TPC1, TPC2 y TPC1/2 incrementan la captación de 2-deoxi-D-[3H]-glucosa en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata, decidimos determinar si el silenciamiento de TPC1 también era capaz de movilizar al principal transportador de glucosa en el corazón: GLUT-4.²⁶⁴ Nos centramos en TPC1 ya que habíamos observado previamente una alteración en el metabolismo de la glucosa en el ventrículo izquierdo de los ratones KO vs. wt para TPC1 mediante distintas aproximaciones proteómicas. Mediante la técnica de microscopía confocal se estudió la movilización del transportador de glucosa GLUT-4 (media \pm SEM) en cardiomiocitos neonatales de rata en cultivo silenciados con siTPC1 (n=108 células) desde la región citoplasmática perinuclear hacia la periferia celular (Figura 27). Se demostró que el silenciamiento de TPC1 en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata induce la movilización de GLUT-4 desde la región citoplasmática perinuclear hacia la periferia celular (84.8 \pm 1.1%) con respecto al control (73.9 \pm 1.1%; $p < 0.001$, n=4) (Figura 27).

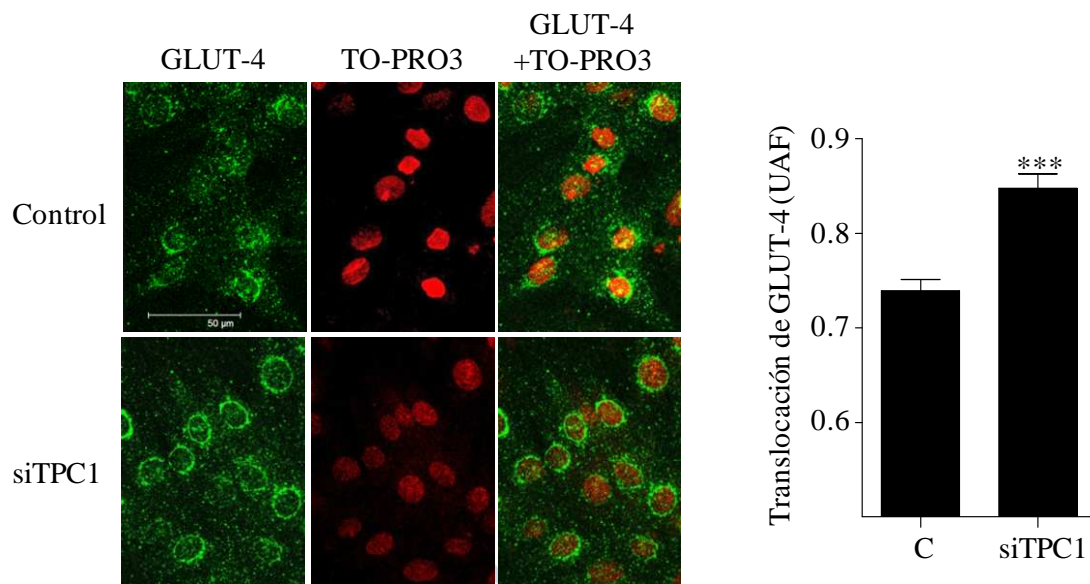


Figura 27. Estudio por microscopía confocal de la translocación del transportador de glucosa GLUT-4 hacia la periferia celular en cardiomiocitos neonatales de rata silenciados para TPC1. Microfotografías (izquierda) y análisis estadístico (derecha) del cociente entre la fluorescencia correspondiente a GLUT-4 entre la periferia celular y las regiones citoplasmáticas perinucleares tras el silenciamiento con siTPC1. ***, $p \leq 0.001$. UAF, unidades arbitrarias de fluorescencia.

1.6. Efecto del silenciamiento de TPCs mediante siRNA sobre la captación de ácidos grasos en cardiomiocitos en cultivo.

En apartados anteriores hemos visto un incremento en la captación de 2-deoxi-D-[3H]-glucosa en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata previamente silenciados con siTPC1, siTPC2 y siTPC1/2, complementario a un incremento en proteínas relacionadas con el metabolismo glucídico en el ventrículo izquierdo de ratones KO vs. wt para TPC1 mediante la técnica 2-DE MALDI TOF/TOF. Con esta última técnica, también hemos observado cambios en proteínas relacionadas con el metabolismo lipídico en estos mismos ratones, como la que ocurría con FABP3. Como un incremento en FABP3 puede influir en la captación de ácidos grasos del exterior celular y/o en la movilización de ácidos grasos a nivel intracelular,²⁶³ nuestra siguiente aproximación fue el estudio del posible efecto del silenciamiento con siRNA de TPC1, TPC2 y TPC1/2 en la captación de ácidos grasos en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata.

Así, 48 horas postransfección las células se incubaron con ácido dodecanoico marcado con Bodipy® durante 1 minuto, y se determinó su incorporación mediante citometría de flujo. No se observaron cambios estadísticamente significativos en la captación de ácidos grasos por parte de los cardiomiocitos (n=3) (Figura 28).

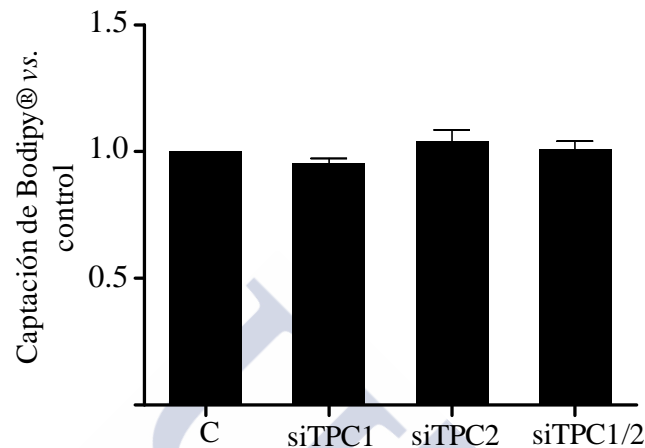


Figura 28. Efecto del silenciamiento de TPC1, TPC2 y TPC1/2 en la captación de ácidos grasos en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata.

2. Estudio del papel de los TPCs en la regulación de la autofagia cardiomiocitaria.

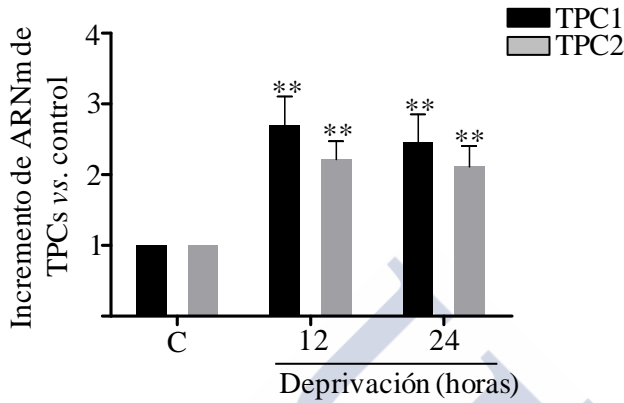
Como hemos mencionado anteriormente, uno de los mayores inductores de la autofagia es la privación energética.¹⁵⁶⁻¹⁵⁸ Por ello, en un primer lugar quisimos determinar el efecto de la privación energética sobre los niveles de los TPCs y de los distintos marcadores autofágicos.

2.1. Efecto de la privación energética sobre los niveles de los TPCs en cardiomiocitos en cultivo.

La privación de suero durante 12 y 24 horas induce un incremento estadísticamente significativo en TPC1 a nivel de ARNm de un $170.2 \pm 40.4\%$ y de un $146.0 \pm 39.1\%$, respectivamente ($p < 0.01$, $n=5$; Figura 29, Panel A) y de proteína de un $255.6 \pm 92.2\%$ y de un $359.2 \pm 121.8\%$, respectivamente ($p < 0.01$, $n=6$; Figura 29, Panel B), así como de TPC2 a nivel de ARNm de un $121.6 \pm 25.3\%$ y un $110.8 \pm 29.7\%$,

respectivamente ($p < 0.01$, $n = 5$; Figura 29, Panel A) y de proteína de un $68.5 \pm 25.8\%$ y de un $106.3 \pm 40.3\%$, respectivamente ($p < 0.05$, $n = 6$; Figura 29, Panel B) en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata.

A.



B.

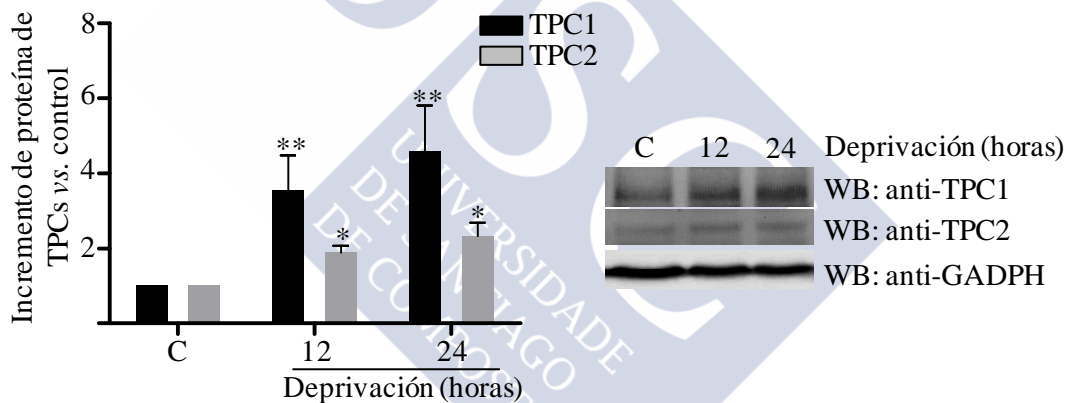


Figura 29. Los niveles de ARNm y proteína de los TPCs se incrementan durante la deprivación de suero en cardiomiocitos neonatales de rata. **A.** Incremento de los niveles de ARNm de TPC1 y TPC2 tras 12 y 24 horas de deprivación de suero. **B.** Análisis estadístico (izquierda) y western blot representativo (derecha) del incremento de los niveles proteicos de TPC1 y TPC2 tras 12 y 24 horas de deprivación. *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$.

Estos resultados fueron confirmados a nivel de proteína en la línea celular HL-1 (Figura 30). La deprivación de suero durante 12 horas induce un incremento estadísticamente significativo en los niveles proteicos de un $49.5 \pm 17.3\%$ de TPC1 ($p < 0.05$, $n = 7$) y de un $67.6 \pm 25.8\%$ de TPC2 ($p < 0.05$, $n = 7$) en células HL-1. Asimismo, la deprivación de suero durante 24 horas también induce un incremento estadísticamente significativo en los niveles proteicos de TPC1 de un $111.5 \pm 48.1\%$ ($p < 0.01$, $n = 7$) y de TPC2 de un $95.7 \pm 29.7\%$ ($p < 0.05$, $n = 7$) (Figura 30).

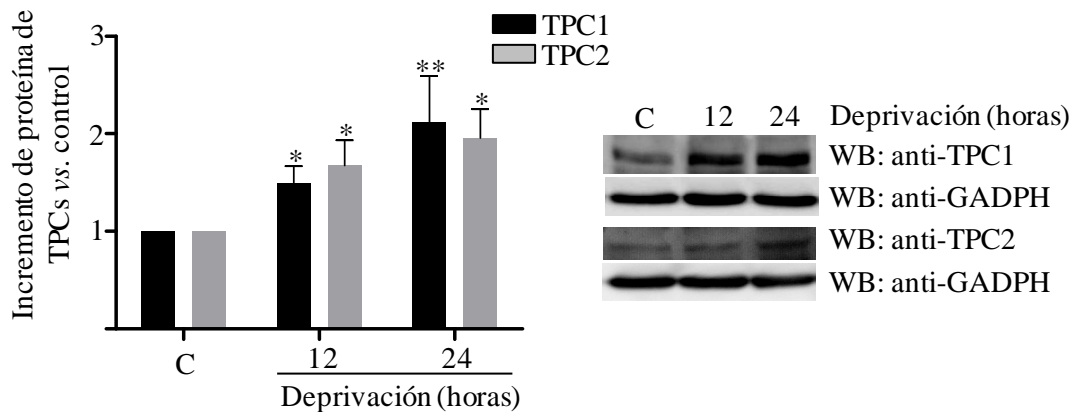


Figura 30. Los niveles de proteína de los TPCs se incrementan durante la privación energética de suero en la línea celular HL-1. Análisis estadístico (izquierda) y western blot representativo (derecha) del incremento de los niveles proteicos de TPC1 y TPC2 tras 12 y 24 horas de privación. *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$.

Paralelamente, estos resultados también fueron confirmados en cardiomiocitos humanos procedentes del cultivo primario de apéndice atrial de pacientes sometidos a cirugía cardíaca, observándose un incremento en los niveles de ARNm de un $34.3 \pm 14.5\%$ de TPC1 ($p < 0.05$, $n=4$) y de un $27.4 \pm 7.8\%$ de TPC2 ($p < 0.05$, $n=4$) (Figura 31).

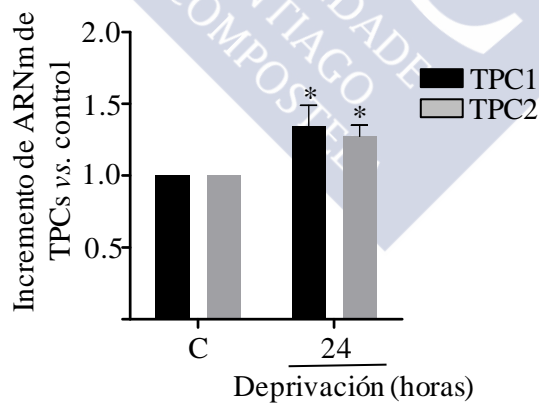


Figura 31. Los niveles de ARNm de los TPCs se incrementan después de 24 horas de privación energética en cardiomiocitos humanos procedentes del cultivo primario de apéndice atrial de pacientes. *, $p \leq 0.05$.

Estas alteraciones en los niveles de TPCs inducidos por la privación de suero fueron concomitantes con alteraciones en diversas proteínas marcadoras de activación

autofágica en cardiomiocitos: incremento de pAMPK y AMPK, y disminución de la forma fosforilada de mTOR.

La privación de suero durante 12 y 24 horas induce un incremento estadísticamente significativo en los niveles de proteína de pAMPK de un $58.8 \pm 37.3\%$ y de un $46.3 \pm 14.7\%$, respectivamente ($p < 0.05$, $n=5$) y de AMPK de un $23.7 \pm 7.9\%$ y de un $85.2 \pm 35.8\%$, respectivamente ($p < 0.01$, $n=5$) en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata (Figura 32).

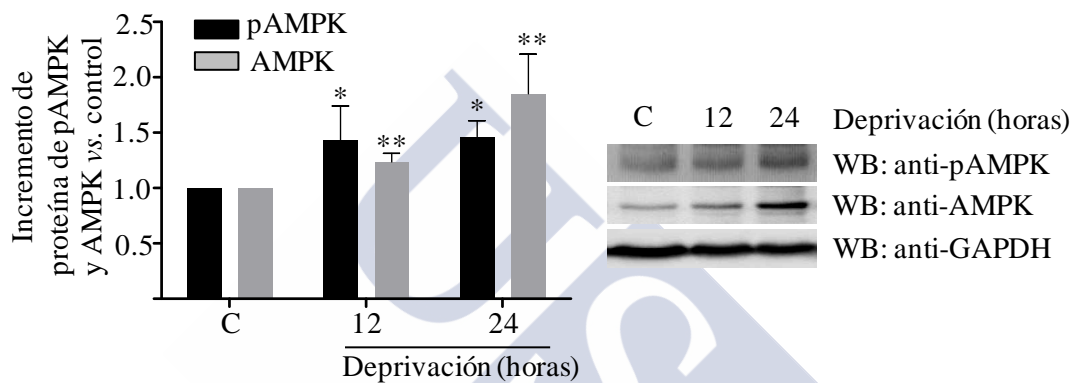


Figura 32. Los niveles proteicos de pAMPK y AMPK se incrementan después de 12 y 24 horas de privación en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata. Análisis estadístico (izquierda) y western blot representativo (derecha) del incremento de pAMPK y AMPK tras 12 y 24 horas de privación. *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$.

Estos resultados fueron confirmados en la línea celular HL-1. De esta forma, la privación de suero durante 12 y 24 horas induce un incremento estadísticamente significativo en los niveles de pAMPK de un $65.1 \pm 22.4\%$ y de un $72.4 \pm 19.7\%$, respectivamente ($p < 0.01$, $n=5$) y de AMPK de un $74.1 \pm 27.5\%$ y de un $138.6 \pm 41.1\%$, respectivamente ($p < 0.01$, $n=5$) en células HL-1 (Figura 33).

La privación de suero durante 12 y 24 horas induce una disminución estadísticamente significativa en los niveles de proteína de pmTOR de un $21.2 \pm 9.1\%$ ($p < 0.01$, $n=6$) y de un $35.4 \pm 5.4\%$ ($p < 0.01$, $n=5$), respectivamente en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata (Figura 34).

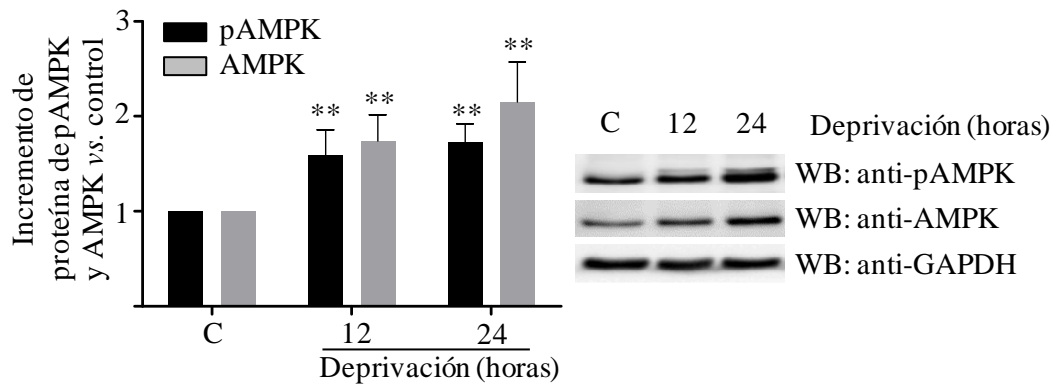


Figura 33. Los niveles proteicos de pAMPK y AMPK incrementan después de 12 y 24 horas de deprivación en células HL-1. Análisis estadístico (izquierda) y western blot representativo (derecha) del incremento de pAMPK y AMPK tras 12 y 24 horas de deprivación. **, $p \leq 0.01$.

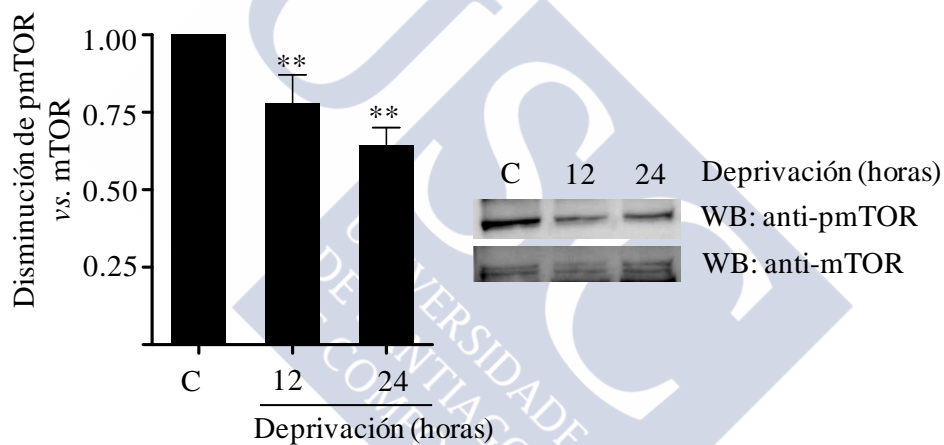


Figura 34. Los niveles proteicos de pmTOR disminuyen después de 12 y 24 horas de deprivación en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata. Análisis estadístico (izquierda) y western blot representativo (derecha) de la disminución de pmTOR tras 12 y 24 horas de deprivación. **, $p \leq 0.01$.

Estos resultados fueron confirmados en la línea celular HL-1. De esta forma, la deprivación de suero durante 12 y 24 horas induce una disminución estadísticamente significativa en los niveles de proteína de pmTOR de un $54.2 \pm 21.1\%$ ($p < 0.01$, $n=4$) y de un $71.6 \pm 12.1\%$ ($p < 0.01$, $n=4$), respectivamente en células HL-1 (Figura 35).

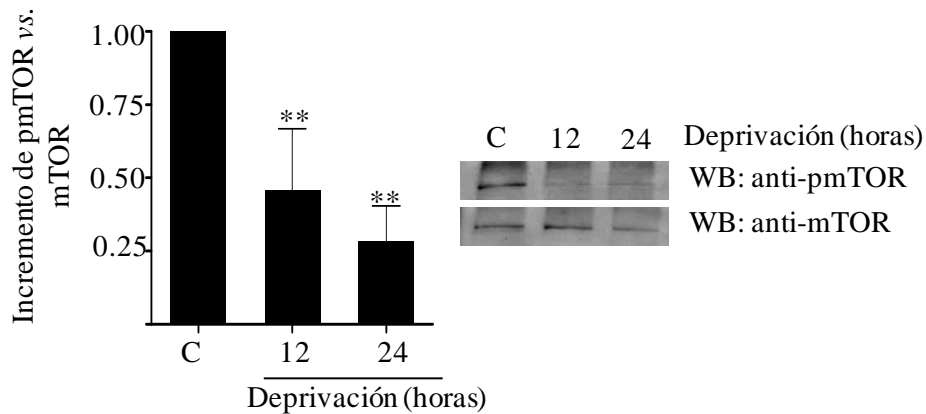


Figura 35. Los niveles proteicos de pmTOR disminuyen después de 12 y 24 horas de deprivación en células HL-1. Análisis estadístico (izquierda) y western blot representativo (derecha) de la disminución de pmTOR tras 12 y 24 horas de deprivación. **, $p \leq 0.01$.

Además de la ruta de activación anteriormente descrita, durante la inducción de la autofagia, LC3I sufre un proceso de lipidación covalente mediado por Atg7, por el cual se le añade un resto fosfatidiletanolamina (PE), dando lugar a la forma conjugada LC3II que se asocia con el autofagosoma (y con el fagoporo).¹²⁵ Aunque el peso molecular de LC3II debería ser mayor que el de LC3I por la adición de este resto PE, esto no es así debido a que este proceso de lipidación permite que LC3II migre más rápidamente durante el western blot, apareciendo en un peso molecular inferior (14 kDa vs. 16 kDa a la que aparece LC3I). El problema de LC3 como marcador de autofagia reside en que, a pesar de que proporciona una lectura aproximada del número de autofagosomas a determinados tiempos, no proporciona información sobre el flujo autofágico, ya que el número de autofagosomas puede estar incrementado por la inducción o por el bloqueo de la autofagia.¹²⁷ Por ello, para estudiar el flujo autofágico es importante determinar los niveles de LC3II en presencia y ausencia de inhibidores de la actividad lisosomal y/o determinar los niveles de p62, que es una proteína adaptadora que se degrada durante el proceso autofágico.^{119,140} Nuestros resultados muestran que existe un incremento de los niveles de LC3II vs. LC3I ($p < 0.05$, $n=4$) y una disminución de p62 en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata y en la línea celular HL-1 tras 12 y 24 horas de deprivación de suero (Figura 36), lo que indica una inducción y progresión autofágica durante la deprivación de suero.

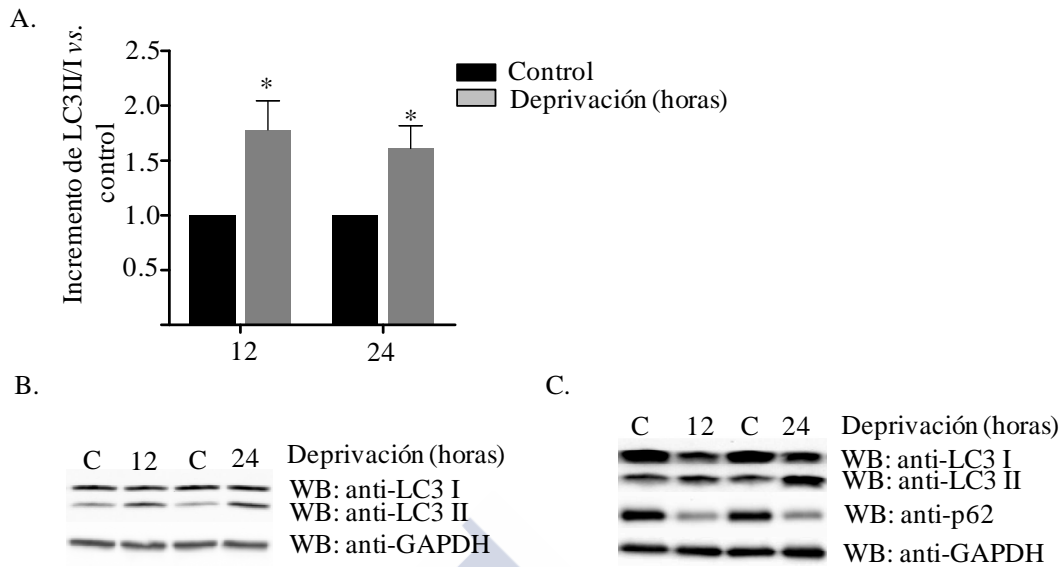


Figura 36. Los niveles proteicos de LC3II/I están incrementados y los niveles de p62 están disminuidos en cardiomiocitos tras 12 y 24 horas de privación. **A.** Análisis estadístico de los niveles proteicos de LC3II/I tras 12 y 24 horas de privación en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata. **B.** Western blot representativo del incremento de LC3II/I después de 12 y 24 horas de privación en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata. **C.** Western blot representativo del incremento de LC3II/I y disminución de p62 después de 12 y 24 horas de privación en células HL-1. *, $p \leq 0.05$.

2.2. Efecto del silenciamiento de TPC1 y TPC2 sobre la viabilidad cardiomiocitaria.

El silenciamiento de TPC1, TPC2 o ambos usando un ARN de interferencia (siRNAs) no modifica la viabilidad celular tras 6, 24 y 48 horas ($n=3$) (Figura 37).

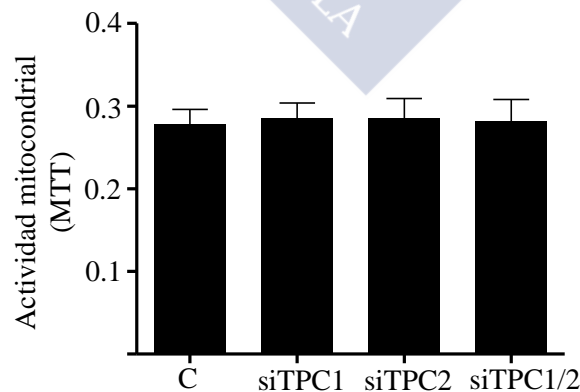


Figura 37. Análisis estadístico de la actividad metabólica mitocondrial en cardiomiocitos mediante el ensayo MTT. Efecto del silenciamiento mediante siRNA de TPC1, TPC2 y TPC1/2 en la actividad mitocondrial en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata. * vs. control, $p \leq 0.05$.

2.3. Efecto del silenciamiento de TPC1 y TPC2 en el progreso de la autofagia en cardiomiocitos en cultivo.

Después de observar los resultados obtenidos en el apartado anterior (2.1.) utilizaremos como modelo de inducción autofágica la deprivación de suero durante 24 horas en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata previamente silenciados con un siRNA control, siTPC1, siTPC2 y siTPC1/2, para determinar el posible papel que estos receptores tienen en la autofagia cardiomiocitaria. Al igual que en el apartado anterior, utilizamos como marcadores autofágicos la combinación de LC3 y p62.

2.3.1. Determinación de LC3 en cardiomiocitos en cultivo.

En primer lugar determinamos los niveles de LC3 utilizando dos aproximaciones complementarias:

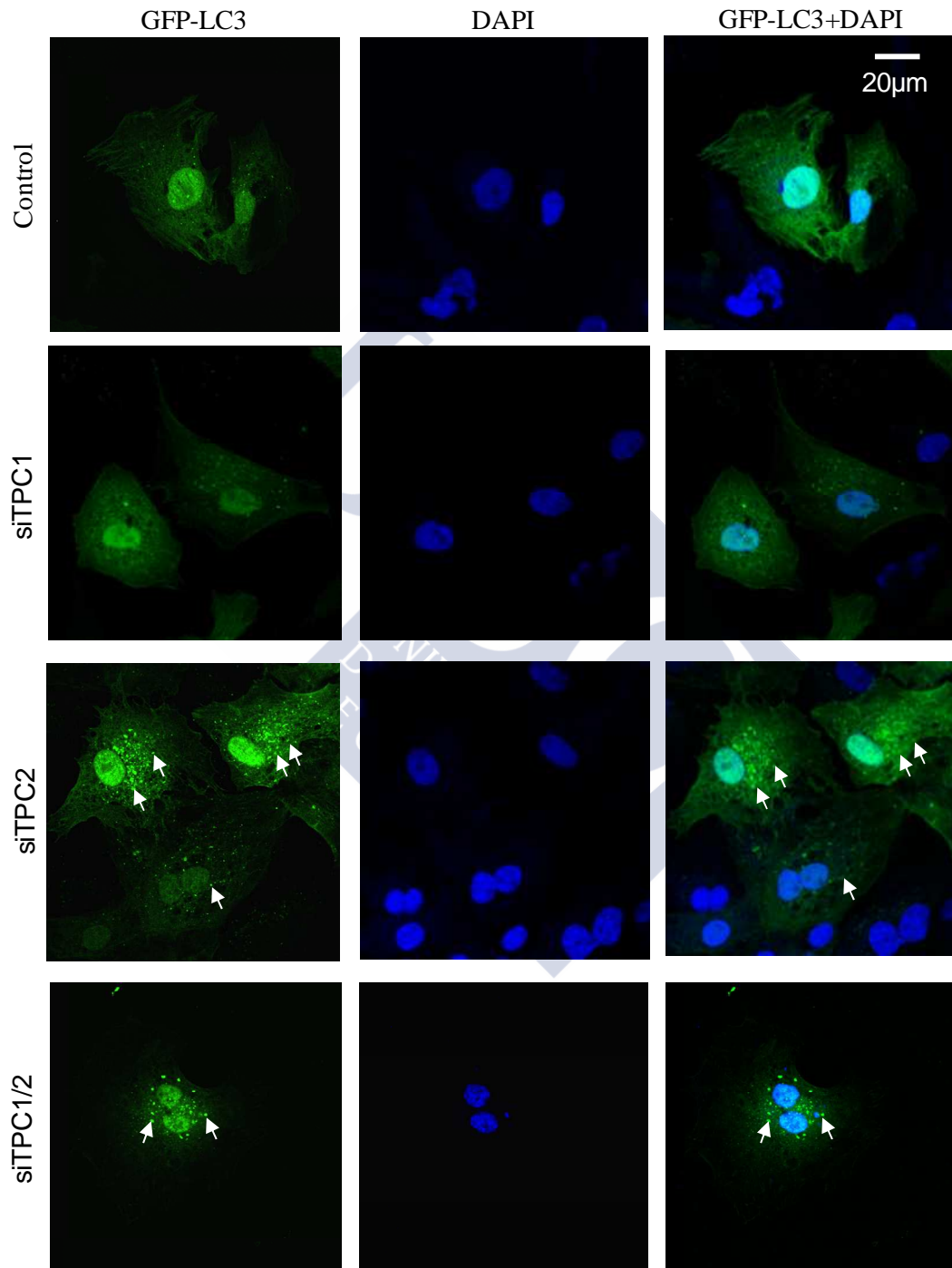
Inmunocitofluorescencia en células transfectadas con GFP-LC3.

Se ha utilizado LC3 marcada en su extremo N-terminal con GFP para monitorizar la autofagia a través de microscopía de fluorescencia mediante la medida del incremento en GFP-LC3 *puncta* en las distintas condiciones. Más concretamente, se ha determinado el número de *puncta* de GFP-LC3 en cada célula, ya que a nivel basal también existe una autofagia constitutiva, lo que impide que el conteo se realice como células que presentan o no autofagia.¹²¹

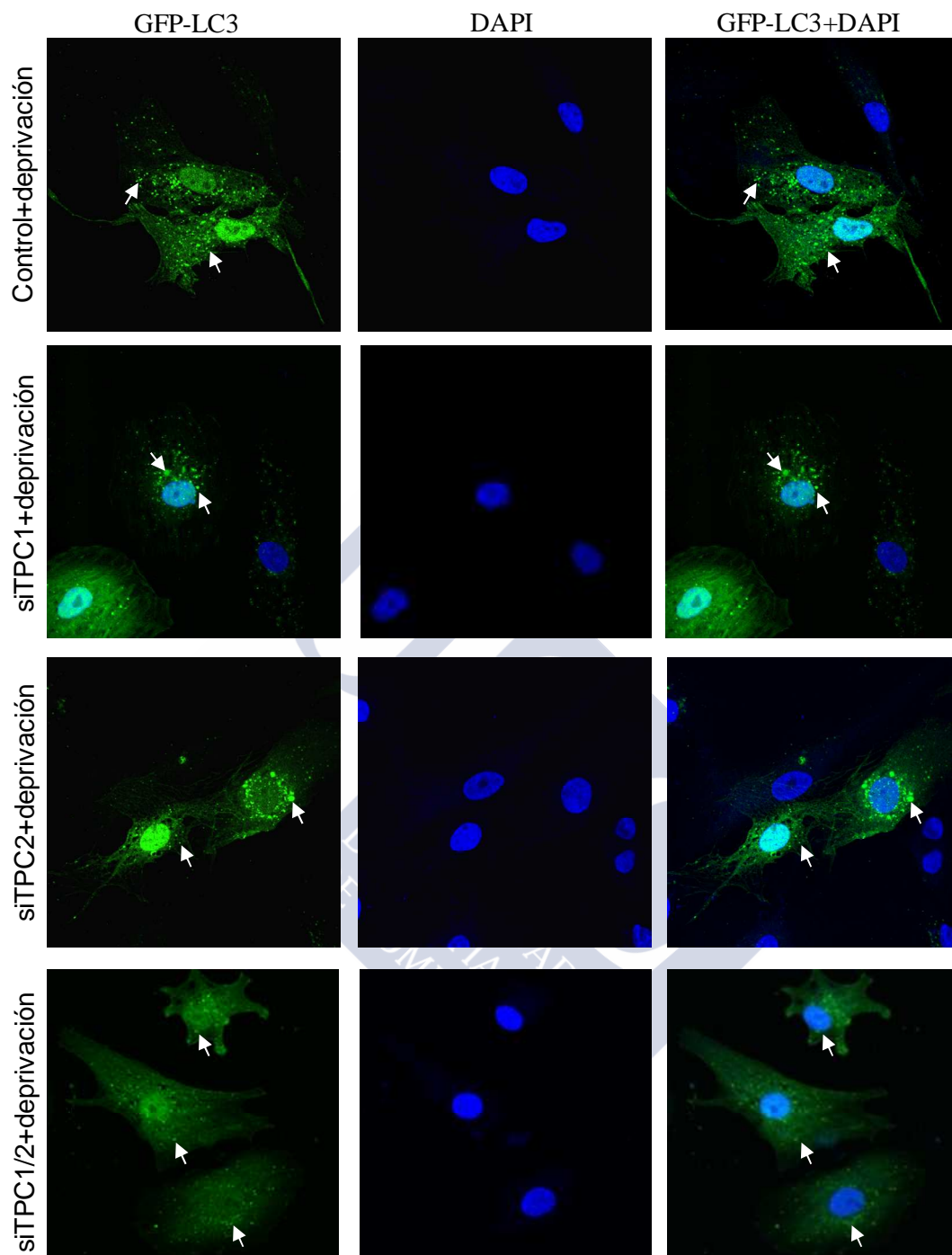
Los experimentos de autofagia se llevaron a cabo en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata que fueron transfectados con un siRNA control, siTPC1, siTPC2 y siTPC1/2 y 24 horas más tarde las células fueron infectadas con un adenovirus que expresa GFP-LC3. Una vez transcurridas 24 horas de la infección los cardiomiocitos se mantuvieron en condiciones basales o fueron deprivados de suero, para finalmente ser examinados al microscopio confocal para determinar los niveles de GFP-LC3 *puncta*.

En condiciones basales existe un incremento de GFP-LC3-*puncta* en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata transfectados con siRNA para TPC2

($p < 0.001$, $n = 4$) y para TPC1/2 ($p < 0.01$, $n = 4$), mientras que el *knockdown* de TPC1 solo induce un incremento estadísticamente significativo en *LC3-puncta* durante la privación ($p < 0.05$, $n = 4$) (Figura 38).



(Continúa en la página siguiente)



(Continúa en la página siguiente)

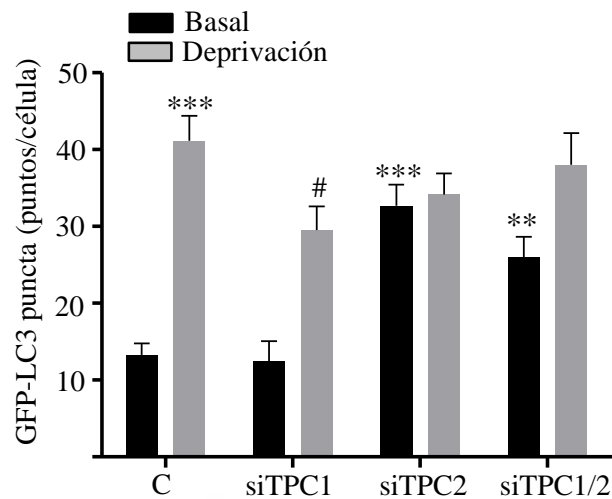


Figura 38. El silenciamiento de TPC2 y TPC1/2 induce un incremento en GFP-LC3 punta en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata. Inmunocitofluorescencia (ver páginas 107 y 108) y análisis estadístico demostrando que el silenciamiento de TPC2 y TPC1/2 induce un incremento en GFP-LC3 *puncta* en condiciones basales, mientras que el silenciamiento de TPC1 solo incrementa GFP-LC3 *puncta* después de la deprivación. *, vs. control basal; #, vs. siTPC1. **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$; #, $p \leq 0.05$.

Western blot de LC3.

Para monitorizar la autofagia también es importante determinar mediante western blot el ratio entre LC3I y LC3II (forma lipidada). De esta forma, el silenciamiento de TPC2 y TPC1/2 en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata induce un incremento estadísticamente significativo en el ratio proteico LC3II/I en condiciones basales ($p < 0.01$, $n=5$ en ambos casos). Sin embargo, el silenciamiento de TPC1 solo induce un incremento en el ratio proteico LC3II/I tras 24 horas de deprivación ($p < 0.05$, $n=5$) al igual que ocurre en el control ($p < 0.01$, $n=5$) (Figura 39).

Para determinar el flujo autofágico mediante western blot podemos determinar los niveles de LC3II en presencia y ausencia de inhibidores de la actividad lisosomal.¹²⁹ En nuestro caso, utilizamos como inhibidor la bafilomicina A1, que inhibe la bomba de protones V-ATPasa del lisosoma y, por lo tanto, neutraliza el pH lisosomal, con lo que finalmente inhibe la actividad lisosomal.¹³³ Por ello, determinamos los niveles de LC3 en presencia y ausencia de bafilomicina A1 utilizando dos aproximaciones complementarias:

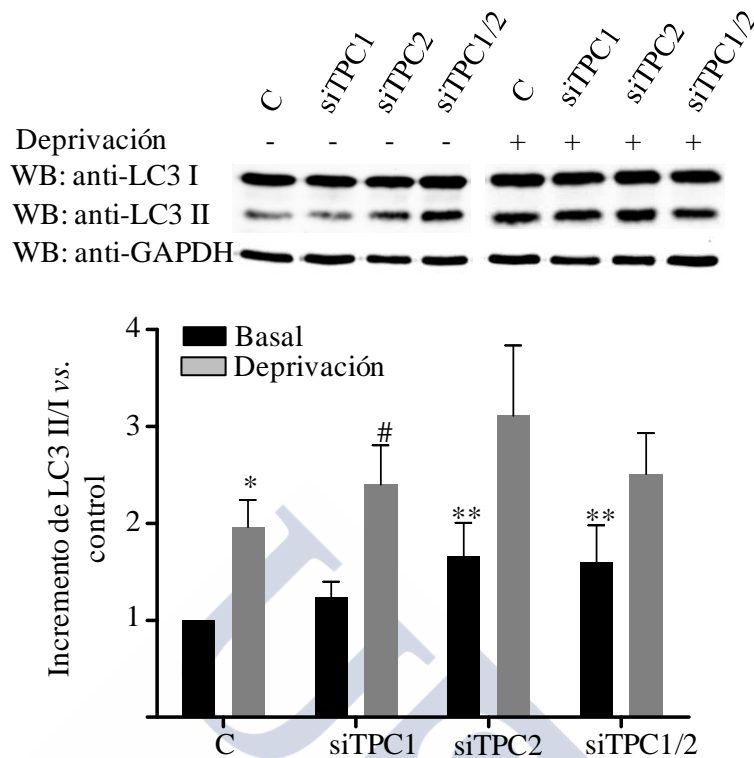


Figura 39. El silenciamiento de TPC2 y TPC1/2 induce un incremento en LC3II/I en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata. Western blot representativo y análisis estadístico que confirman que el silenciamiento de TPC2 y TPC1/2 induce un incremento en LC3II/I en condiciones basales, mientras que el silenciamiento de TPC1 solo incrementa LC3II/I en deprivación. *, vs. control basal; #, vs. siTPC1. **, $p \leq 0.01$.

Western blot de LC3 en presencia y ausencia de bafilomicina A1.

Así, el tratamiento con bafilomicina A1 en condiciones tanto basales como de deprivación energética induce un incremento en los niveles de LC3II ($p < 0.01$, $n = 6$), que es parcialmente (en el caso del silenciamiento de TPC1, $p < 0.05$, $n = 6$) o totalmente (en el caso del silenciamiento de TPC2, no significativo, $n = 6$) revertido por el silenciamiento de los TPCs (Figura 40).

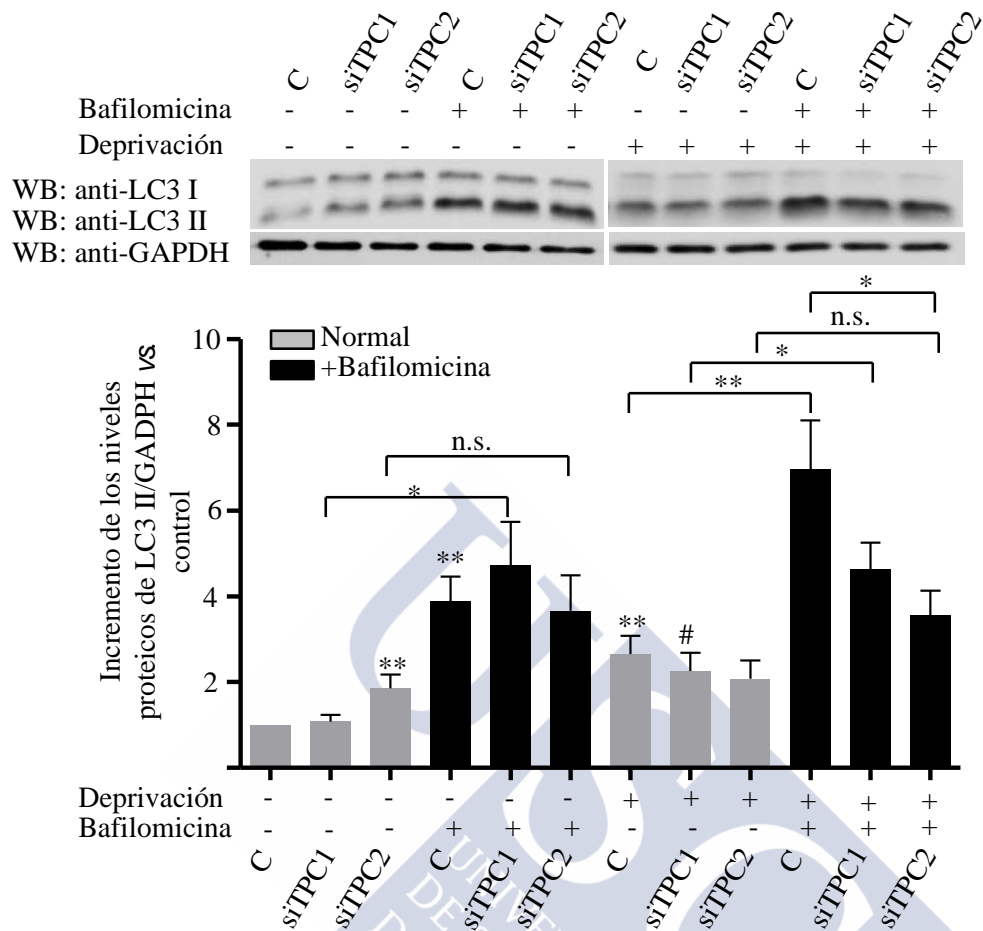
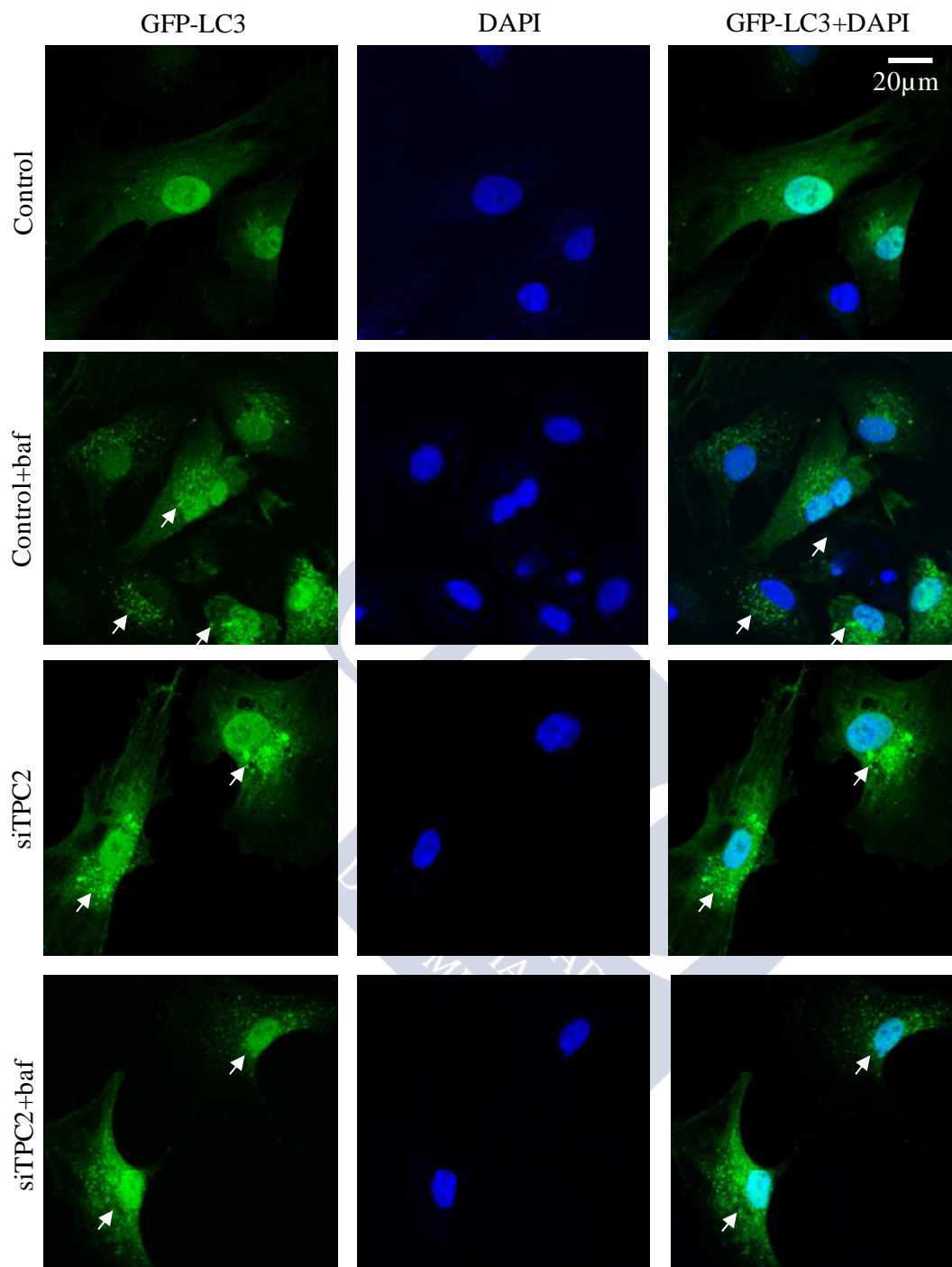


Figura 40. El silenciamiento de los TPCs afecta al flujo autofágico en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata. Western blot representativo y análisis estadístico demostrando que el silenciamiento de TPC2 disminuye el flujo autofágico, medido mediante el tratamiento con bafilomicina A1, en cardiomiocitos neonatales de rata, tanto en condiciones basales como de deprivación energética; mientras que el silenciamiento de TPC1 en cardiomiocitos neonatales de rata muestra una tendencia en la misma dirección. *, vs. control basal; #, vs. siTPC1. *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$; n.s., no significativo.

Immunocitofluorescencia en células transfectadas con GFP-LC3 en presencia y ausencia de bafilomicina A1.

Los resultados anteriores fueron confirmados mediante la determinación de GFP-LC3 puncta en presencia y ausencia de bafilomicina A1. De esta forma, el tratamiento con bafilomicina A1 de cardiomiocitos neonatales de rata silenciados con TPC2 no incrementa de forma estadísticamente significativa el número de GFP-LC3 *puncta* respecto al silenciamiento solo (Figura 41).



(Continúa en la página siguiente)

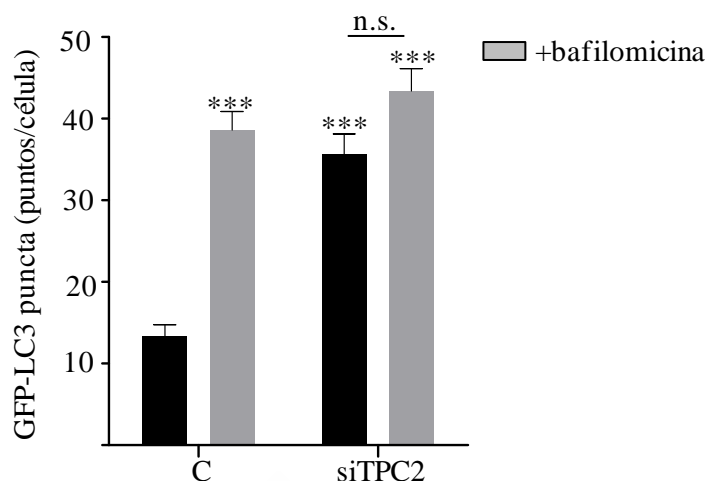


Figura 41. El silenciamiento de los TPC2 afecta al flujo autofágico en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata. Inmunocitofluorescencia (ver página 112) y análisis estadístico demostrando que el silenciamiento de TPC2 disminuye el flujo autofágico, medido mediante el tratamiento con bafilomicina A1, en cardiomiocitos neonatales de rata en condiciones basales. ***, $p \leq 0.001$. n.s., no significativo.

2.3.2. Determinación de p62 en cardiomiocitos en cultivo.

Determinamos mediante inmunocitofluorescencia y western blot los niveles del adaptador p62, que se encuentra disminuido cuando se activa el flujo autofágico, al degradarse por esta vía.^{119,140} El silenciamiento de TPC2 y TPC1/2 induce un incremento en los niveles proteicos de p62 en condiciones basales ($p < 0.01$ y $p < 0.05$, respectivamente) en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata. Además, el silenciamiento de TPC1 ($p < 0.05$, $n=5$), TPC2 ($p < 0.05$, $n=5$) y TPC1/2 ($p < 0.05$, $n=5$) induce un incremento en los niveles de p62 (respecto al descenso del control) tras la privación durante 24 horas (Figura 42).

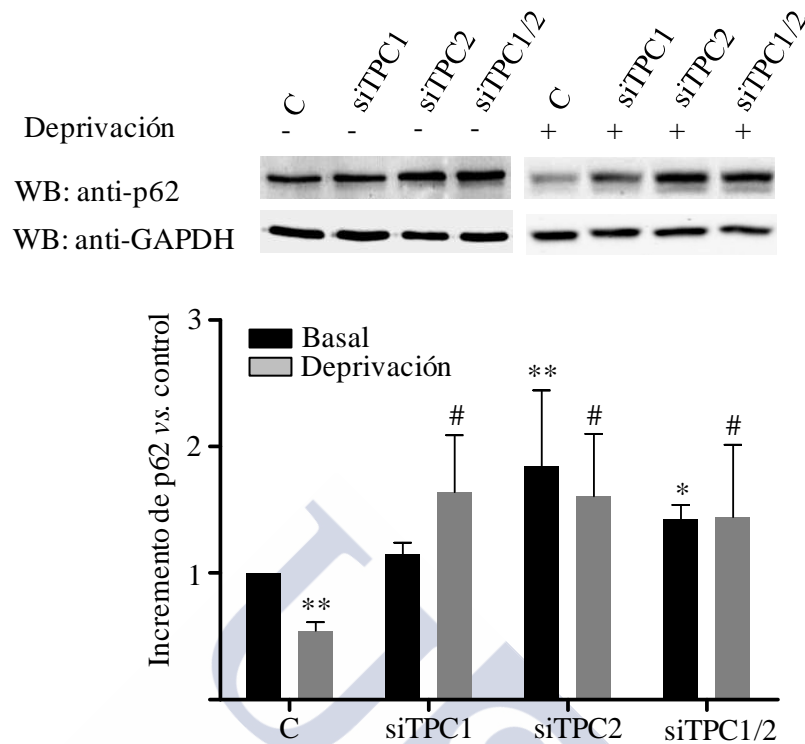


Figura 42. El silenciamiento de TPC2 y TPC1/2 induce un incremento en p62 en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata. Western blot representativo y análisis estadístico que confirman que el silenciamiento de TPC2 y TPC1/2 induce un incremento en p62 en condiciones basales, mientras que el silenciamiento de TPC1 solo incrementa p62 en deprivación. *, vs. control basal; #, vs. control deprivado. *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; #, $p \leq 0.05$.

Paralelamente, mediante inmunocitofluorescencia, se determinaron los niveles de p62 en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata tras el silenciamiento mediante siRNA control, siTPC1, siTPC2 y siTPC1/2, tanto en condiciones basales como de deprivación de suero durante 24 horas, observándose (al igual que mediante western blot) un incremento en p62 durante el silenciamiento de TPC2 y TPC1/2 en condiciones basales, y de TPC1, TPC2 y TPC1/2 tras la deprivación de suero. En condiciones basales, también se observa una tendencia en el incremento de p62 tras el silenciamiento de TPC1 (Figura 43).

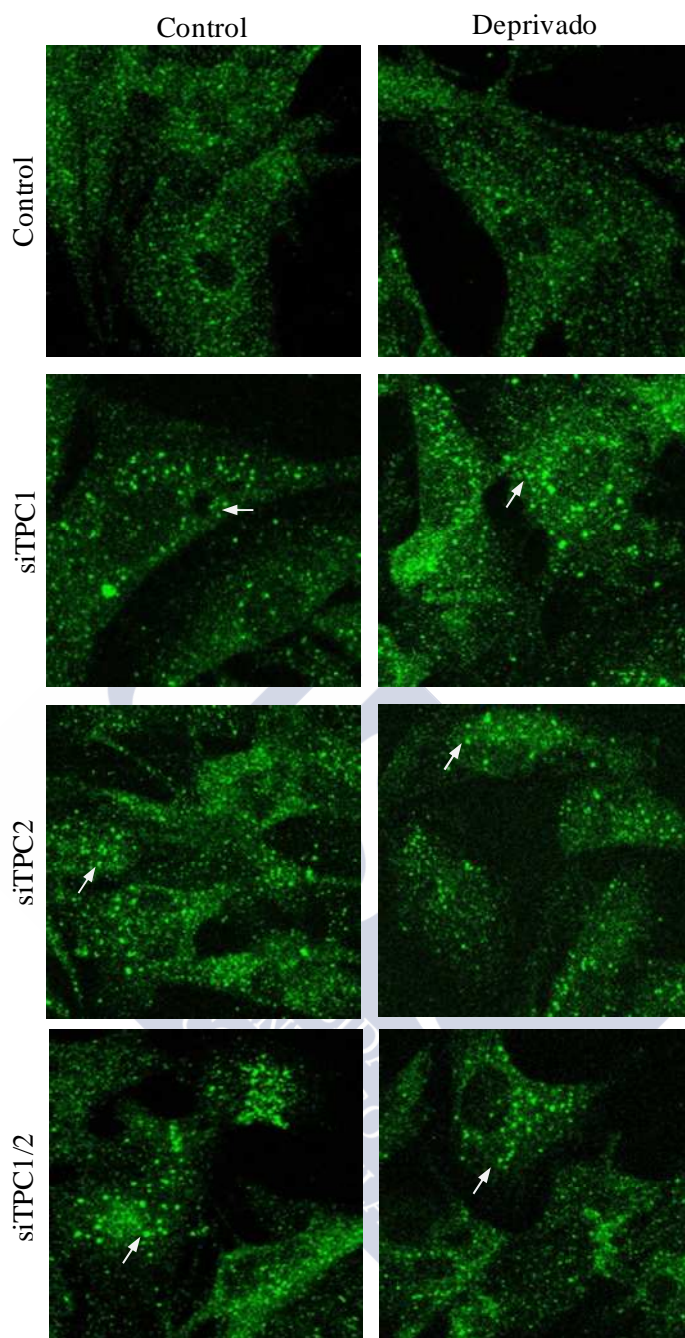


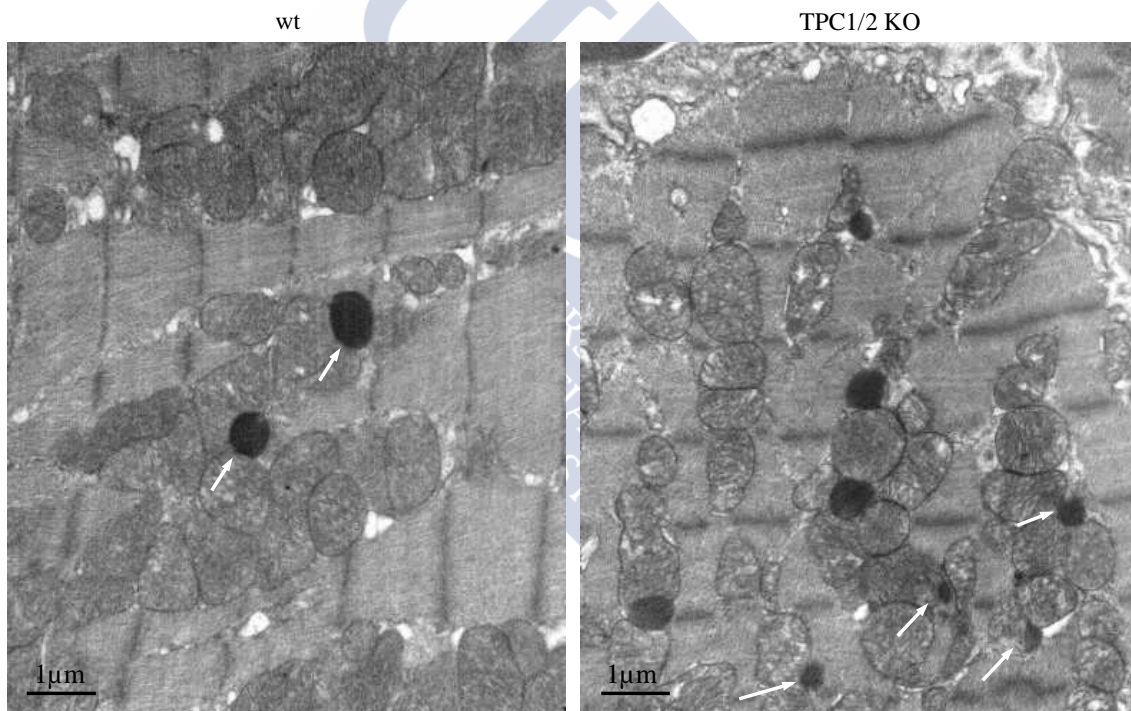
Figura 43. El silenciamiento de TPC2 y TPC1/2 induce un incremento en p62 en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata. Inmunofluorescencia que confirma que el silenciamiento de TPC2 y TPC1/2 induce un incremento en p62 en condiciones basales, mientras que el silenciamiento de TPC1 solo incrementa p62 en deprivación.

Estos resultados ponen de manifiesto que durante el silenciamiento de TPC1, TPC2 y TPC1/2 en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata existe un bloqueo (bien sea parcial o total) de la autofagia que se muestra por los niveles de LC3 (medidos tanto por western blot como por inmunocitofluorescencia, con y sin tratamiento con

bafilomicina) y por p62 (medido tanto por inmunocitofluorescencia como por western blot).

2.3.3. Microscopía electrónica en ventrículo izquierdo de ratones KO vs. wt para TPC1/2.

Realizamos estudios de microscopía electrónica en tejido cardíaco de ventrículo izquierdo de ratones wt (n=3) y KO (n=3) para TPC1/2 para determinar la morfología lisosomal. Tras el análisis de 63 células, se observó un incremento en el número de lisosomas (3.9 lisosomas/1000 μm en wt vs. 23.2 lisosomas/1000 μm) y un descenso en el diámetro de los mismos ($p<0.05$) (Figura 44).



(Continúa en la página siguiente)

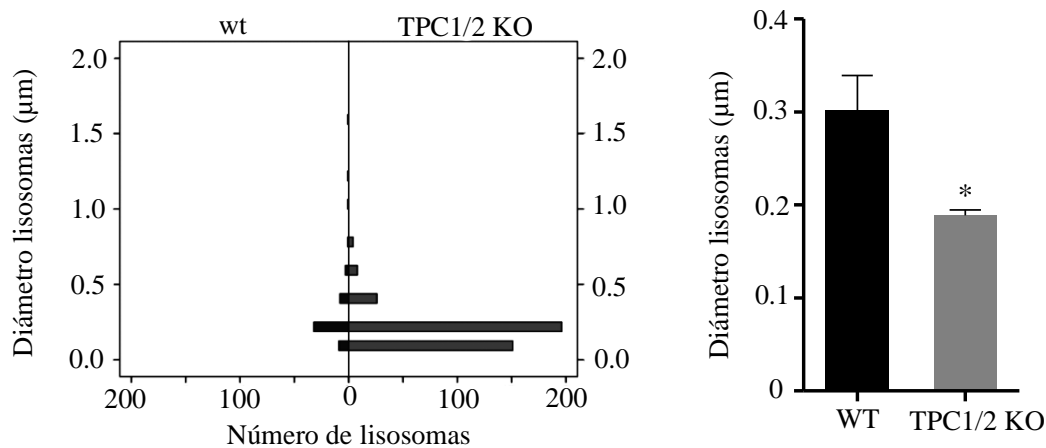


Figura 44. Incremento del número y descenso del diámetro lisosomal en el ventrículo izquierdo cardíaco de ratones TPC1/2 KO vs. wt. **A.** Imágenes representativas de microscopía electrónica mostrando un incremento del número y una disminución del diámetro lisosomal en ratones KO vs. wt para TPC1/2 (ver página 116). **B.** Distribución del número vs. diámetro lisosomal (izquierda) y análisis estadístico del número de lisosomas (derecha) en los ratones wt y KO para TPC1/2. *, $p \leq 0.05$.

4. Regulación de los niveles de expresión cardíaca de TPC1 y TPC2 en ratas por el ayuno y la dieta.

4.1. Ayuno.

En tejido cardíaco de ratas alimentadas con dieta normal durante 18 semanas y posteriormente sometidas a ayuno durante 36 horas, se observa un incremento estadísticamente significativo en los niveles de ARNm de TPC2 ($p < 0.05$, $n = 6$) sin observarse cambios estadísticamente significativos en los niveles de ARNm de TPC1 (Figura 45).

Para confirmar este incremento durante el ayuno en los niveles de TPC2, realizamos western blot y observamos que existe un incremento significativamente estadístico en los niveles proteicos de TPC2 en tejido cardíaco de ratas sometidas a ayuno, respecto a las *ad libitum* ($p < 0.01$, $n = 6$) (Figura 46).

Determinamos en paralelo los niveles de LC3, sin observarse cambios estadísticamente significativos en los niveles de LC3II/I (Figura 47).

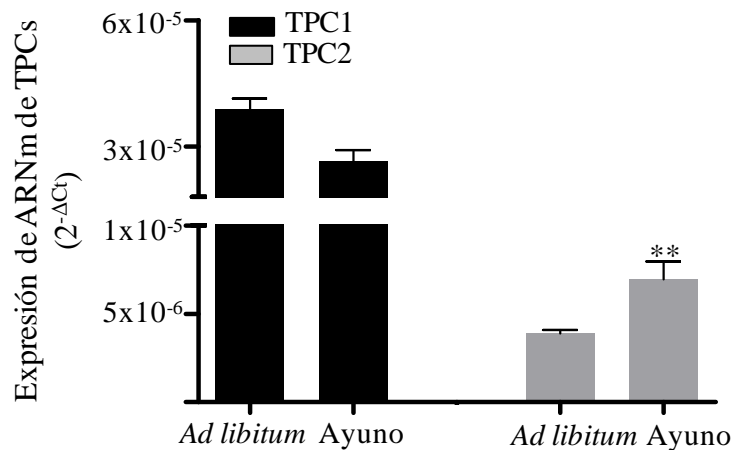


Figura 45. Niveles de expresión de ARNm de TPC1 y TPC2 en tejido cardíaco de ratas alimentadas *ad libitum* o en ayuno durante 36 horas. Existe un incremento estadísticamente significativo en los niveles de TPC2 en ratas sometidas a ayuno durante 36 horas. **, $p \leq 0.01$.

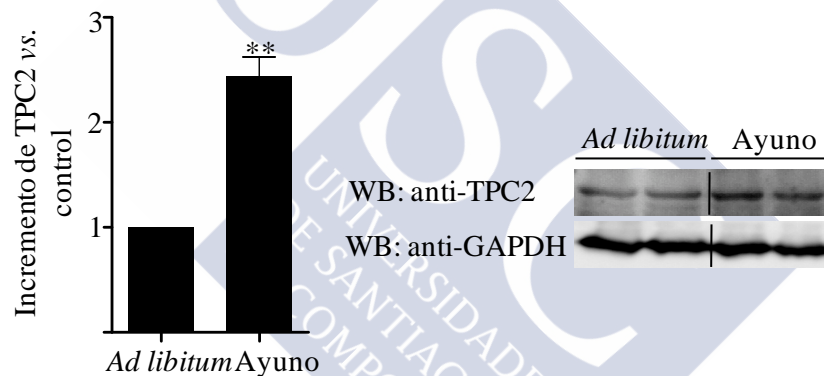


Figura 46. Niveles de expresión proteica de TPC2 en tejido cardíaco de ratas alimentadas *ad libitum* o en ayuno durante 36 horas. Análisis estadístico (izquierda) y western blot representativo (derecha) del incremento de los niveles proteicos de TPC2 en ratas sometidas a ayuno durante 36 horas, respecto de las *ad libitum*. **, $p \leq 0.01$.

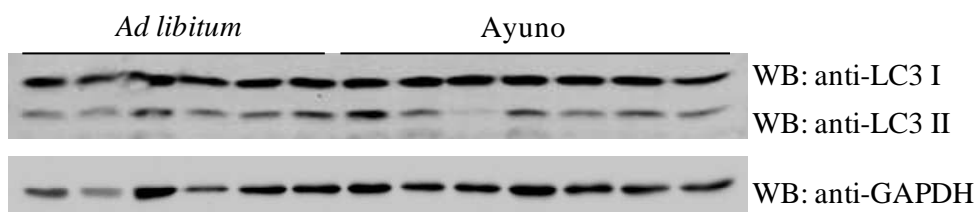


Figura 47. Western blot representativo de los niveles de proteína de LC3I, LC3II en tejido cardíaco de ratas alimentadas *ad libitum* o en ayuno durante 36 horas.

4.2. Dieta.

En ratas alimentadas con dieta alta en grasa durante 18 semanas se demostró que no existe un incremento estadísticamente significativo de los niveles de expresión de ARNm de TPC1 y TPC2 en tejido cardíaco con respecto a las alimentadas con dieta estándar (n=9) (Figura 48). Por otro lado, tampoco se observan cambios estadísticamente significativos en los niveles de LC3II/I y p62 (Figura 49).

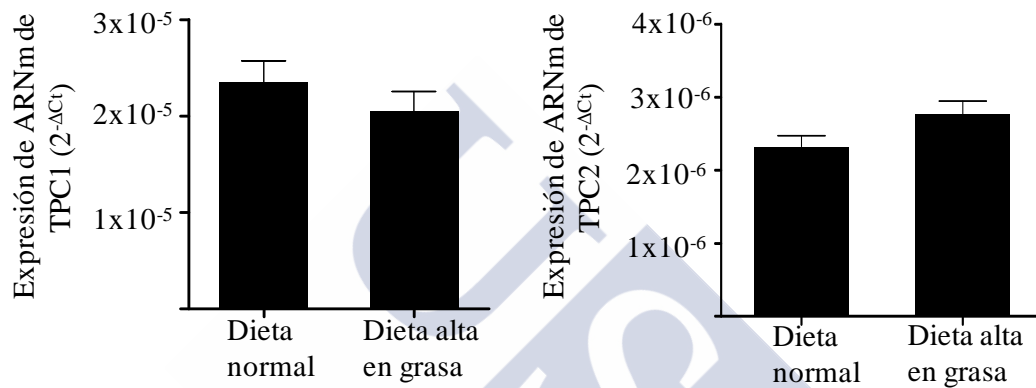


Figura 48. Influencia de la dieta en los niveles de ARNm de TPC1 y TPC2 en tejido cardíaco de rata (n=9).

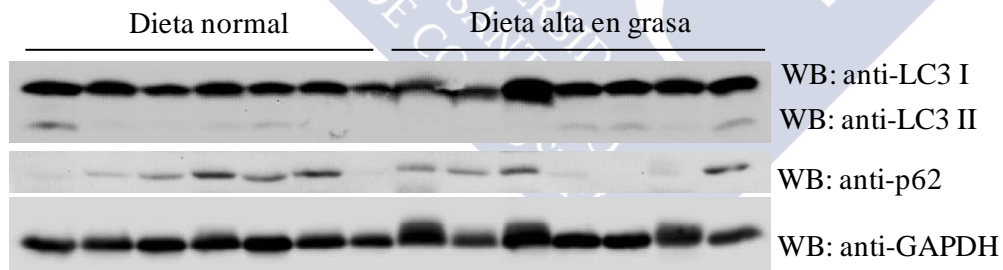


Figura 49. Western blot representativo de los niveles de proteína de LC3II, LC3I y p62 en tejido cardíaco de ratas alimentadas con dieta estándar y dieta alta en grasa.

5. Estudio de los niveles de expresión génica y proteica de TPC1 y TPC2 en tejido cardíaco humano.

5.1. Estudio de los niveles de expresión de TPC1 y TPC2 en aurícula cardíaca de pacientes sometidos a cirugía cardíaca.

Las muestras de aurícula cardíaca humana se obtuvieron de pacientes procedentes del Servicio de Cardiología/Cirugía Cardíaca de la Xerencia de Xestión Integrada de Santiago de Compostela, sometidos a cirugía cardíaca con *bypass* cardiopulmonar. Se determinaron los niveles de ARNm de TPC1 y TPC2 en 199 hombres y 100 mujeres (con las características clínicas que aparecen en la tabla 1). Se demostró que los niveles de expresión auriculares cardíacos de TPC1 y TPC2 son mayores en mujeres que en los hombres, tanto a nivel de ARNm ($p < 0.001$) como de proteína ($p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente) (Figura 50).

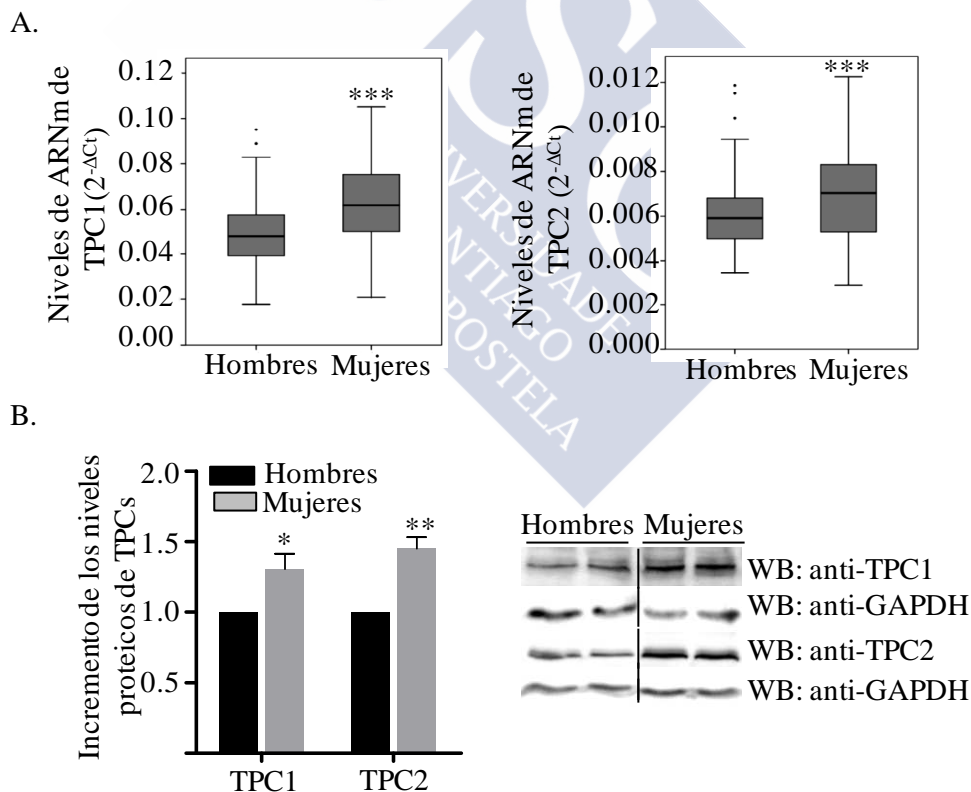


Figura 50. Influencia del sexo en los niveles de TPCs en aurículas cardíacas de pacientes. **A.** Incremento en los niveles de ARNm en mujeres vs. hombres de TPC1 (izquierda) y TPC2 (derecha) en aurícula cardíaca de pacientes sometidos a cirugía cardíaca. **B.** Análisis estadístico (izquierda) y western blot representativo (derecha) del incremento en mujeres vs. hombres de los niveles proteicos de TPC1 y TPC2. *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$.

Regulación de los niveles de expresión cardíaca de TPC1 y TPC2 en ratas por el género.

Complementariamente estudiamos la influencia del sexo sobre los niveles de expresión de TPC1 y TPC2 en aurícula de ratas observando que existe un incremento estadísticamente significativo en los niveles de ARNm de TPC1 y TPC2 en hembras *vs.* machos a las 8 semanas de edad (ratas jóvenes en edad fértil) ($p < 0.05$, $n = 10$) (Figura 51).

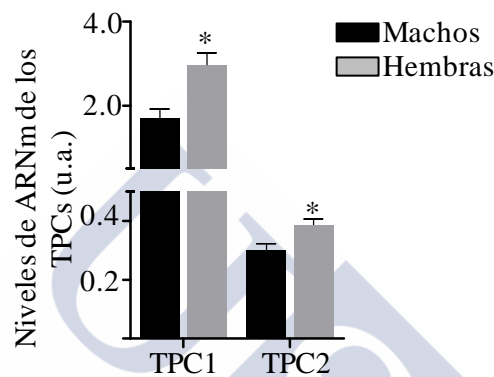


Figura 51. Los niveles de expresión de ARNm de TPC1 y TPC2 en aurículas de rata están incrementados en las hembras respecto a los machos de 8 semanas de edad. *, $p \leq 0.05$. u.a., unidades arbitrarias.

Para confirmar el dimorfismo sexual a 8 semanas, realizamos western blot y observamos que existe un incremento estadísticamente significativo en los niveles proteicos de TPC1 y TPC2 en la aurícula cardíaca de ratas hembras *vs.* machos de 8 semanas de edad ($p < 0.05$, $n = 7$) (Figura 52).

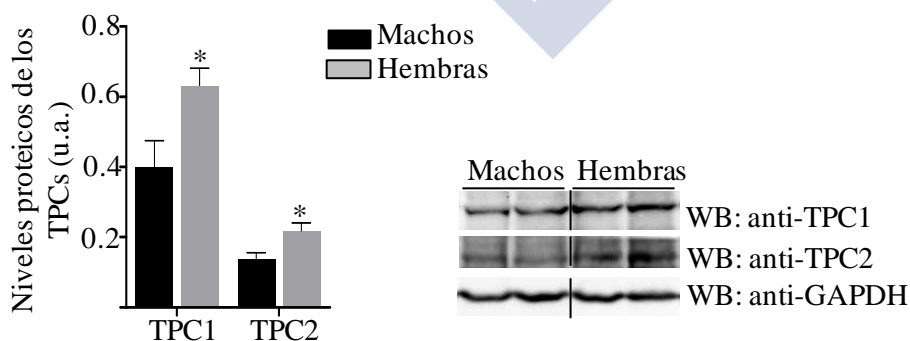
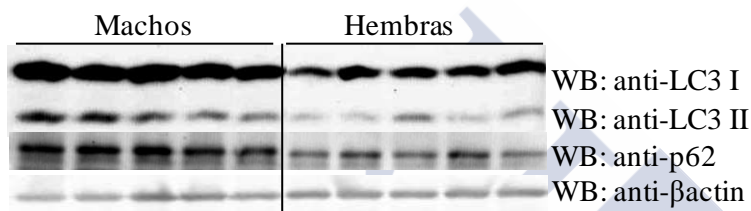


Figura 52. Los niveles proteicos de TPC1 y TPC2 están incrementados en aurícula cardíaca de ratas de hembras *vs.* machos de 8 semanas de edad. Análisis estadístico (izquierda) y western blot representativo (derecha) del incremento de los niveles proteicos de TPC1 y TPC2 en aurícula de rata hembra *vs.* macho, ambos de 8 semanas de edad. *, $p \leq 0.05$. u.a., unidades arbitrarias.

Niveles cardíacos de marcadores de autofagia en función del género.

Estudios previos han puesto de manifiesto el dimorfismo sexual de marcadores autofágicos como LC3 y p62 de forma constitutiva en músculo esquelético y médula ósea.²⁶⁵ En concordancia con estas observaciones, hemos demostrado que también los niveles proteicos de LC3I ($p < 0.01$, $n=7$), LC3II ($p < 0.01$, $n=7$) y p62 ($p < 0.05$, $n=7$), pero no el ratio LC3II/I están estadísticamente disminuidos en la aurícula cardíaca de ratas hembras respecto a los machos (Figura 53).

A.



B.

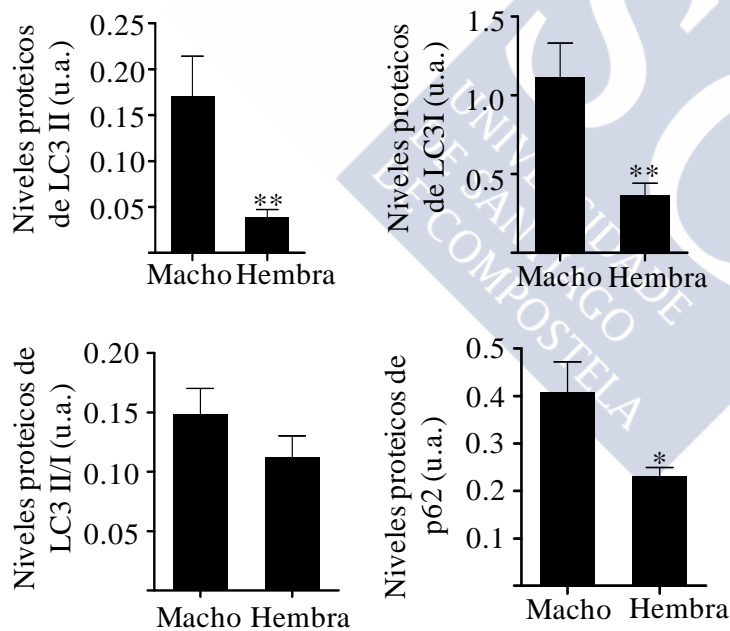


Figura 53. Dimorfismo sexual en marcadores autofágicos en aurícula cardíaca de ratas de 8 semanas de edad. Western blot representativo (A) y análisis estadístico (B) de los niveles de proteína de LC3II, LC3I y p62 en aurícula cardíaca de ratas de 8 semanas de edad. *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$. u.a., unidades arbitrarias.

Paralelamente, existe una correlación entre los niveles de ARNm de TPC1 y TPC2 y los niveles proteicos de p62 ($p < 0.001$ y $p < 0.001$, respectivamente, $n=23$) en aurícula cardíaca de ratas macho y hembra (Figura 54).

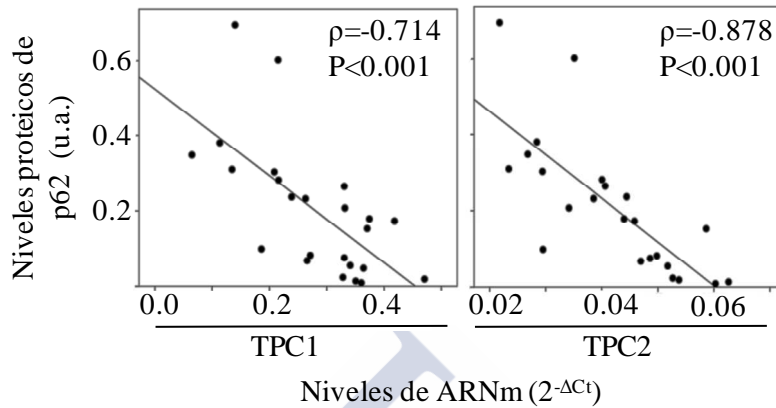


Figura 54. Correlación negativa entre los niveles proteicos de p62 y los niveles de ARNm de TPC1 y TPC2 en aurícula de ratas ($n=23$). u.a. unidades arbitrarias. ρ , Rho de Spearman.

Efecto de las hormonas sexuales sobre los niveles cardíacos de los TPCs.

Estudiamos si los niveles de expresión de los TPCs estaban influenciados por las hormonas sexuales. Para ello se utilizó un modelo de ratas de 8 semanas de edad a las que se les practicó una ovariectomía o una gonadectomía, según procediese, se mantuvieron durante 1 semana y, a continuación, a un grupo de ellas se les practicó un reemplazo con estrógenos o testosterona, respectivamente, durante 3 días. No se observa ninguna diferencia estadísticamente significativa en los niveles de ARNm de TPC1 y TPC2 en aurícula de corazón entre los distintos grupos ($n=9$) con los tiempos y dosis de tratamiento empleados (Figura 55).

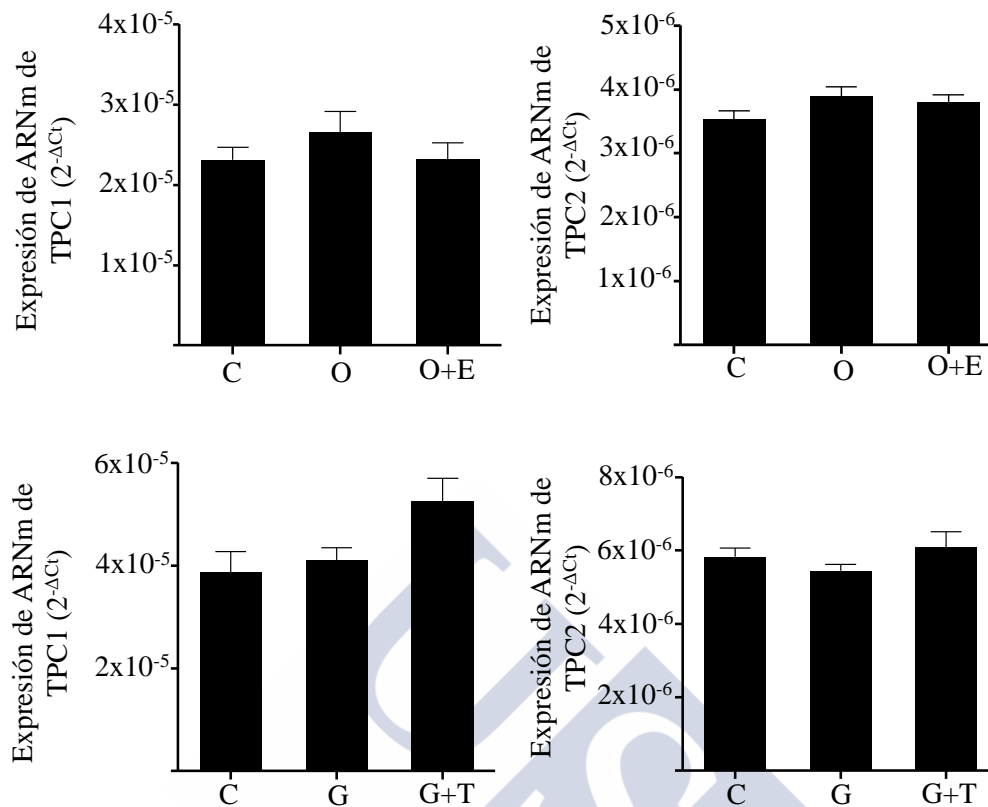


Figura 55. Influencia de la ovariectomía y gonadectomía y posterior reemplazo hormonal en los niveles de expresión de ARNm de TPC1 y TPC2 en aurículas de ratas de 8 semanas de edad. C, control; O, ovariectomía; O+E, ovariectomía+estrógenos; G, gonadectomía; G+T, gonadectomía+testosterona.

5.2. Estudio de los niveles de expresión de TPC1 y TPC2 en ventrículos de pacientes sometidos a trasplante cardíaco.

Se obtuvieron muestras de ventrículo izquierdo a partir de corazones explantados de 16 pacientes con cardiopatía isquémica (ISQ) y 20 pacientes con cardiopatía dilatada (DIL), todos no diabéticos y en la fase final de la insuficiencia cardíaca, sometidos a trasplante de corazón. Como controles se utilizaron 6 donantes no enfermos en parada cardioplégica durante 2.5 horas, descartados para trasplante debido a incompatibilidad sanguínea o de tamaño. En los pacientes con insuficiencia cardíaca (dentro de este grupo incluimos a los pacientes con cardiopatía isquémica y dilatada, ya que ambos están en la fase final de la enfermedad) existe un incremento a nivel de ARNm de TPC1 ($p < 0.05$, $n = 36$) y TPC2 ($p < 0.01$, $n = 36$) respecto al grupo control (Figura 56, Panel A). Separando a los pacientes según patología, en los pacientes con

cardiomiopatía isquémica existe un incremento de expresión de TPC2 a nivel de ARNm ($p < 0.01$, $n = 16$) y proteína ($p < 0.05$, $n = 8$) respecto al grupo control ($n = 6$); mientras que en los pacientes con cardiomiopatía dilatada existe un incremento de expresión de TPC1 a nivel de ARNm ($p < 0.05$, $n = 20$) y proteína ($p < 0.01$, $n = 13$) y un incremento de expresión de TPC2 a nivel de ARNm ($p < 0.01$, $n = 20$) y proteína ($p < 0.05$, $n = 6$), respecto al grupo control ($n = 6$) (Figura 56).

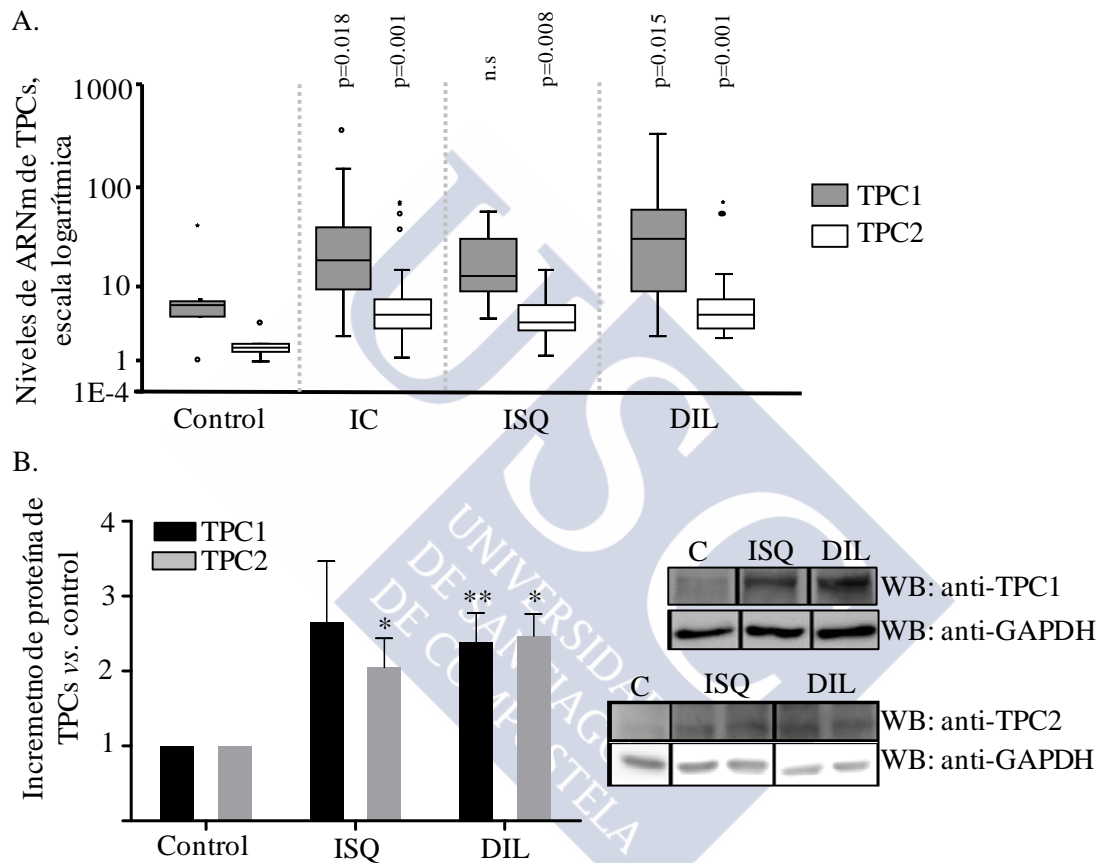


Figura 56. Incremento de los niveles de TPCs en ventrículo izquierdo de pacientes con cardiomiopatía isquémica, dilatada e insuficiencia cardíaca (en su conjunto). **A.** Incremento en los niveles de ARNm de TPC1 en cardiomiopatía dilatada y de TPC2 en cardiomiopatía isquémica y dilatada. **B.** Análisis estadístico (izquierda) y western blot representativo (derecha) de los cambios en los niveles proteicos de los TPCs en cardiomiopatía isquémica y dilatada. *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$. u.a., unidades arbitrarias.





DISCUSIÓN



Los TPCs fueron descritos por primera vez por Calcraft y col.³ en el año 2009 como canales de calcio activados por NAADP. Se describieron tres diferentes subtipos: TPC1, TPC2 y TPC3.³ TPC1 y TPC3 se encuentran predominantemente en las membranas endosomales, mientras que TPC2 se encuentra generalmente en los lisosomas, por lo que colectivamente se conocen por su distribución endolisosomal.³ Nuestro trabajo se centra en el estudio de TPC1 y TPC2, ya que ambos subtipos están presentes en las tres especies objeto de estudio: humano, rata y ratón.⁵

Wang y col.⁵⁸ en el año 2012 y Cang y col.¹⁹³ en el año 2013 revolucionaron la concepción que había hasta la fecha sobre el posible papel de los TPCs como receptores de calcio activados por NAADP, al demostrar que los TPCs eran canales de sodio activados por PI(3,5)P₂. A pesar de estas discrepancias, se ha postulado que ambas hipótesis pueden ser compatibles,¹⁰ ya que los TPCs podrían funcionar como canales de sodio y/o calcio¹⁹⁶ y la activación a través del NAADP podría no ser directa, sino que podría necesitar de proteínas auxiliares.¹⁹⁸

A pesar de que desde su descubrimiento se ha trabajado ampliamente en intentar comprender su biología, no existe ningún estudio sobre su posible papel en el sistema cardiovascular. Los trabajos de Ishibrashi y col. (2000)¹, Calcraft. y col. (2009)³ y Zong y col. (2009)²¹, describen la expresión de los TPCs mediante northern blot en tejido cardíaco, sin embargo no estudian sus funciones a nivel cardiomiocitario.

Estudios previos han puesto de manifiesto la presencia de enzimas ADP-ribosil ciclasas (capaces de sintetizar NAADP) en preparaciones de membranas cardíacas^{232,233} y, además, se ha visto que estas enzimas pueden incrementar su actividad a través de la estimulación de los receptores beta-adrenérgicos, lo que a su vez daría lugar a un incremento de NAADP.²³³ Este NAADP es capaz de aumentar la amplitud y frecuencia de las corrientes de calcio en los cardiomiocitos²³⁴ y, por otro lado, el PI(3,5)P₂ también es capaz de regular la concentración de calcio en los cardiomiocitos, al activar uno de los mayores movilizadores de calcio a nivel intracelular: el receptor de rianodina.²³⁶

Independientemente de que los TPCs puedan funcionar como canales de sodio y/o calcio,¹⁹⁶ ambos iones son claves para el mantenimiento de un correcto funcionamiento cardíaco.²⁶⁶ La movilización de calcio no solo gobierna los eventos contráctiles (como la sístole y la diástole) sino que sus concentraciones intracelulares están estrechamente acopladas con las concentraciones intracelulares de sodio, por lo que cualquier

perturbación en estos iones da lugar a alteraciones electrofisiológicas y metabólicas a nivel cardíaco.²⁶⁷ Por lo tanto, a nivel cardiovascular, el descubrimiento de los TPCs como receptores endolisosomales abrió un nuevo campo de investigación debido a las probables implicaciones de estos receptores sobre el control de las funciones básicas de las células cardíacas, que se caracterizan por ser células muy especializadas y diferenciadas.

En este trabajo de tesis presentamos una aproximación traslacional para el estudio de los niveles de expresión de los TPCs en condiciones fisiológicas y patológicas en humano, rata y ratón. También estudiamos el efecto de su ausencia en relación a procesos autofágicos y metabólicos. Nuestro estudio es el primero en relacionar los TPCs y el sistema endolisosomal con la regulación del metabolismo y la autofagia cardiomiocitaria.

1. Estudio comparativo del proteoma cardíaco en ratones wild type (wt) y knockout (KO) para TPC1 y TPC1/2.

Dada la fuerte complejidad interfuncional y estructural que define las actividades contráctiles del ventrículo izquierdo, ventrículo derecho y aurícula, está claro que las alteraciones patológicas de una sola cámara del corazón, inevitablemente influirán en todo el órgano.²⁵⁶ El ventrículo izquierdo tiene, sin embargo, un papel de especial relevancia en el sistema cardiocirculatorio;²⁵⁶ por ello, nuestro estudio comparativo del proteoma cardíaco en ratones KO vs. wt para TPC1 se llevó a cabo en este compartimento.

Llevamos a cabo un estudio proteómico diferencial en ventrículo izquierdo de ratones hembras KO vs. wt para TPC1, sin embargo, no conseguimos una buena reproducibilidad entre los distintos geles, con lo que fue imposible realizar el análisis estadístico, ya que los geles no se pudieron alinear correctamente con el programa Progenesis SameSpots. Nuestra hipótesis es que estos problemas podrían deberse a la diversidad en el ciclo ovulatorio entre las distintas hembras tanto wt como KO para TPC1. De hecho, a nivel cardíaco existe además un dimorfismo sexual entre machos y hembras, tanto en ratones como en humanos, que se cree que se debe, en parte, a los distintos niveles de estrógenos circulantes, que se unirían a receptores específicos

cardíacos y podrían ser capaces de modular ciertas funciones.²⁴⁹ Por ello, en nuestro estudio tratamos de investigar las alteraciones proteicas diferenciales mediante 2-DE MALDI TOF/TOF en el ventrículo izquierdo de ratones macho KO *vs.* wt para TPC1 y paralelamente, mediante LC-MALDI-MS identificamos y comparamos las proteínas identificadas en el ventrículo izquierdo de ratones macho KO *vs.* wt para TPC1 y KO *vs.* wt para TPC1/2.

Nuestra primera aproximación mediante 2-DE MALDI TOF/TOF en ratones KO *vs.* wt para TPC1 presenta la limitación de que utilizamos geles al 12% con un rango de pI comprendido entre 4 y 7, con lo que no identificamos proteínas con un bajo peso molecular, ni proteínas muy ácidas o muy básicas, ni aquellas proteínas con bajos niveles de expresión (debido a que no es posible visualizarlas con las tinciones disponibles) lo que significa que nuestro estudio está focalizado en un rango muy concreto de proteínas. Sin embargo, esta aproximación proteómica presenta la ventaja de ser un método versátil de separación y cuantificación de proteínas²⁵¹ y nos permite la visualización de diferentes isoformas o modificaciones postraduccionales de una misma proteína.²⁶⁸ Además, como método complementario, hemos utilizado la cromatografía líquida en fase reversa (LC) acoplada a espectrometría de masas (MALDI-MS) ya que posee buena selectividad y es rápida y precisa, con lo que nos permite identificar proteínas de todos los rangos de pH y de peso molecular. Sin embargo, también presenta sus limitaciones: no muestra las modificaciones postraduccionales, existe una potencial pérdida de péptidos (bien porque pueden quedar retenidos en la columna o bien porque al ser poco abundantes, quedan enmascarados por aquellos más abundantes)²⁴² y, además, la mayor limitación de esta técnica en nuestro estudio es que la hemos realizamos de forma cualitativa y no cuantitativa debido a la falta de disponibilidad de tejido, ya que para cuantificar es necesario marcar isotópicamente determinados residuos aminoacídicos de proteínas a nivel tisular. A pesar de ello, la realización de ambas técnicas (2-DE MALDI TOF/TOF, técnica cuantitativa y LC-MALDI-MS, técnica cualitativa) en el ventrículo izquierdo de ratones KO *vs.* wt para TPC1 y la complementariedad de los datos nos permitió reforzar y validar nuestros resultados.

Las proteínas identificadas en los distintos estudios proteómicos han sido clasificadas utilizando el programa de análisis Phanter y las bases de datos Uniprot y NCBI. Con las diferentes aproximaciones (2-DE MALDI TOF/TOF, LC-MALDI, western blot, western blot en dos dimensiones), hemos validado una serie de alteraciones en rutas relacionadas con el metabolismo cardíaco en el ventrículo izquierdo de ratones KO vs. wt para TPC1, que se muestran esquemáticamente en la Figura 57.

1.1. Alteraciones en el metabolismo cardíaco y/o cardiomiocitario.

1.1.1. Alteraciones en proteínas implicadas en el metabolismo de la glucosa.

Mediante la técnica de 2-DE MALDI TOF/TOF y LC-MALDI-MS, identificamos proteínas alteradas de la ruta de la glicólisis (alfa-enolasa, beta-enolasa, gamma-enolasa, piruvato deshidrogenasa componente E2, cadena B de la lactato deshidrogenasa y la fosfoglicerato kinasa 1) en el ventrículo izquierdo de ratones KO vs. wt para TPC1 (Tabla 8 y 9).

Para validar estos resultados, en primer lugar llevamos a cabo un western blot para determinar los niveles de la enolasa, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre el ventrículo izquierdo de ratones KO vs. wt para TPC1 (Figura 19). Para determinar si este incremento se debía a una modificación postraduccional, llevamos a cabo un western blot en dos dimensiones en el ventrículo izquierdo de estos mismos ratones y observamos la existencia de 5 modificaciones postraduccionales de la enolasa, en donde solo una de ellas se encontraba incrementada (Figura 20). El patrón de modificaciones postraduccionales encontradas en nuestro estudio es muy similar al de dos estudios realizados anteriormente, uno de ellos estudia la modulación de las modificaciones postraduccionales de la enolasa causadas por el virus del Dengue,²⁶⁹ y el otro describe mediante un análisis proteómico las células pancreáticas ductales.²⁷⁰ En este último estudio, la espectrometría de masas revelaba 6 spots diferentes correspondientes a la fosforilación de serina, la acetilación de lisina y la metilación de un residuo de ácido glutámico y de una asparagina de la alfa enolasa.²⁷⁰ Otros estudios postulan la existencia de otras modificaciones de la enolasa como la fosforilación en tirosina²⁷¹ y treonina²⁷², la carbamilación²⁷³, la nitración en tirosina²⁷⁴, la adición de un

grupo glutatión en cistatina²⁷⁵ y la adición de un grupo malonil en lisina²⁷⁶ en diferentes tejidos y modelos experimentales. La alteración de una de las modificaciones postraduccionales de la enolasa observada en nuestro estudio en el ventrículo izquierdo de ratones KO *vs.* wt para TPC1 resulta muy interesante, sin embargo, requiere de una investigación en mayor profundidad para determinar su implicación a nivel funcional, ya que son muy pocos los estudios que relacionan cada una de las modificaciones postraduccionales con una función específica de la proteína y, a nivel cardíaco, son incluso menos: únicamente se ha visto que la nitración en tirosina de la alfa enolasa podría dar lugar a un daño de la glicólisis a nivel cardíaco en ratones con cardiomiopatía diabética,²⁷⁷ mientras que se ha observado un incremento en los niveles totales de alfa enolasa en respuesta a distintos estímulos hipertróficos como el ejercicio²⁷⁸ o la hipertensión,^{279,280} lo que sugiere un papel muy importante de la oxidación de la glucosa en el remodelado del ventrículo izquierdo. El tejido cardíaco, además de la isoforma alfa, también contiene la beta y la forma intermedia (la gamma), asociándose una reducción de la beta enolasa en relación a la alfa con cambios energéticos beneficiosos durante la hipertrofia cardíaca.²⁸¹ Además, se observaron altos niveles de beta enolasa después de un ejercicio de resistencia, con lo que se consideró un marcador sérico de daño muscular inducido por el ejercicio.²⁸²

En segundo lugar, decidimos validar mediante western blot la proteína fosfoglicerato kinasa 1 (PGK1), otra de las enzimas que participa en la glicólisis al catalizar la conversión del 1,3-difosfoglicerato a 3-fosfoglicerato.²⁶¹ Debemos mencionar que esta proteína no pudo ser identificada mediante 2-DE MALDI TOF/TOF debido a su pI, que es de 8, ya que nuestros geles en dos dimensiones cubren un rango de pI entre 4-7. Al igual que hicimos con la enolasa, en primer lugar llevamos a cabo un western blot para determinar los niveles totales de PGK1, sin observar diferencias estadísticamente significativas entre el ventrículo izquierdo de ratones KO *vs.* wt para TPC1 (Figura 21). Sin embargo, mediante western blot en dos dimensiones observamos 4 isoformas de la PGK1, encontrándose una de ellas incrementada de forma estadísticamente significativa en los ratones KO para TPC1 respecto de los wt (Figura 22). Estudios previos ya han postulado la existencia de diversas fosforilaciones²⁶⁷ y modificaciones postraduccionales de PGK1,^{283,284} de hecho, en un estudio previo realizado con células madre embrionarias diferenciadas a cardiomiocitos, se ha

observado un incremento estadísticamente significativo en determinadas modificaciones postraduccionales de PGK1.²⁶² No se conoce el significado biológico de estos cambios en PGK1 pero sí se ha demostrado que el promotor de PGK1 está muy activo en las áreas donde se produce la contracción cardíaca,²⁶² con lo que podría existir una estrecha relación entre PGK1 y la contractibilidad cardiomiocitaria.

Por lo tanto, nuestros resultados obtenidos con respecto a la enolasa y PGK1, ilustran la intrincada regulación a nivel postraducciona l de las enzimas glicolíticas y ponen de manifiesto los nuevos retos a los que nos enfrentamos al intentar conocer la regulación energética a nivel cardíaco.

Paralelamente, en ratones KO para TPC1/2 identificamos mediante LC-MALDI-MS alteraciones en proteínas relacionadas con la glicólisis como en el componente E1 de la piruvato deshidrogenasa (Tabla 10).

Para conocer si los TPCs además de regular la glicólisis, tenían un papel en la captación de glucosa, determinamos la captación de glucosa “*in vitro*” en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata silenciados con siRNA control, siTPC1, siTPC2 y siTPC1/2, observando un incremento en la captación de 2-deoxy-D-glucosa en aquellas células silenciadas con siTPC1, siTPC2 y siTPC1/2 (Figura 26). Además, mediante microscopía confocal observamos un incremento en la movilización del transportador de glucosa GLUT-4 (principal transportador de glucosa en el corazón²⁶⁴) desde la región citoplasmática perinuclear hacia la periferia celular en cardiomiocitos neonatales de rata previamente silenciados con TPC1, respecto al control (Figura 27). Para su translocación, GLUT-4 necesita 1) a proteínas que participen en su empaquetamiento en las membranas endosomales, 2) al citoesqueleto (a través de cual se desplazan las vesículas que lo contienen), y 3) a los endosomas de reciclaje que intervienen en su propio almacenamiento.²⁸⁵ Asimismo, se ha visto que el pH endosomal podría afectar a la regulación de GLUT-4²⁸⁵ y, a su vez, este pH podría estar en parte regulado a través de TPC1,¹⁹² por lo que podemos hipotetizar que el silenciamiento de TPC1 podría afectar al pH endosomal y, en consecuencia, regular el transporte de GLUT-4 a la membrana plasmática.

Estos resultados *in vitro* apoyan las alteraciones anteriormente encontrados mediante las distintas técnicas proteómicas sobre el posible papel de los TPCs como reguladores de la glicólisis, y la captación de glucosa.

El corazón adulto normal necesita grandes cantidades de energía para mantener su función contráctil, siendo los ácidos grasos su principal sustrato energético, al proporcionar el 70% del ATP;²⁸⁶ sin embargo, el corazón es altamente flexible y puede utilizar otros sustratos como los hidratos de carbono, los lípidos, los aminoácidos y los cuerpos cetónicos para la generación de ATP, dependiendo del contexto en el que se encuentre; esta capacidad se conoce con el nombre de flexibilidad metabólica del corazón.²⁸⁷ Cuando el corazón está sometido a una elevada carga de trabajo, su sustrato energético preferente son los hidratos de carbono,²⁸⁸ y se ha demostrado en otros tejidos musculares que una glicólisis acelerada puede, a su vez, estimular aún más la captación de glucosa.²⁸⁹ Nuestros resultados son los primeros en mostrar una alteración en el metabolismo de las enzimas del metabolismo energético cardíaco y en la captación de glucosa producida por la ausencia de los TPCs, nuevos canales iónicos voltaje dependiente que pueden actuar como canales de calcio y/o sodio.¹⁹⁶

Estudios previos han sugerido una asociación entre la actividad de los canales iónicos y el metabolismo de la glucosa en cardiomiocitos: un estudio demostró que las enzimas glicolíticas (enolasa y fosfoglicerato kinasa incluidas) se asociaban con vesículas del retículo endoplásmico en músculo cardíaco, y que el ATP generado mediante la actividad de dichas enzimas participaba en el funcionamiento de la bomba Ca^{2+} -ATPasa del retículo endoplásmico,²⁹⁰ encargada de la transferencia de calcio desde el citosol al lumen del retículo sarcoplásmico durante la relajación cardíaca, ejerciendo por tanto estas enzimas un papel clave en la regulación del calcio cardiomiocitario;²⁹¹ además, la inhibición de una enzima clave en el metabolismo de la glucosa (la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa) puede reducir la actividad de los canales iónicos de calcio de tipo L;²⁹² y la translocación de GLUT-4 hacia la membrana plasmática para la captación de glucosa por cardiomiocitos necesita del inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y de su correspondiente receptor,²⁹³ encargado de liberar calcio del retículo sarcoplásmico.²⁹⁴ En la actualidad, no se conoce como los TPCs podrían regular el metabolismo de la glucosa, ya sea actuando como canales de calcio, como canales de sodio o como ambos, o si su ausencia podría afectar a la actividad de otros canales como mecanismo compensatorio. Sin embargo, con este trabajo hemos demostrado que la ausencia de los mismos induce una alteración tanto en el metabolismo como en la captación de la glucosa a nivel cardiomiocitario. De acuerdo con nuestros resultados, se ha visto que la

deficiencia de otro canal de calcio como es el TRPM2 (receptor de potencial transitorio de cationes, subfamilia M, miembro 2) mejora la sensibilidad a la insulina en ratones obesos (obesidad inducida por la dieta) al disminuir los niveles de calmodulina (a través de la regulación de la señalización calcio/calmodulina), lo que produce un incremento en el metabolismo de la glucosa en órganos como el músculo esquelético y cardíaco.²⁹⁵

1.1.2. Alteraciones en proteínas implicadas en el metabolismo de los ácidos grasos.

Mediante la técnica de 2-DE MALDI TOF/TOF identificamos como proteínas alteradas del metabolismo lipídico la apolipoproteína A1 y FABP3 en el ventrículo izquierdo de ratones KO vs. wt para TPC1 (Tabla 8 y 9). Debido a que la FABP3 es un marcador de daño miocárdico sérico (al ser rápidamente liberado a la circulación)²⁹⁶ y juega un papel clave como transportador intracelular de ácidos grasos, en la selección de sustratos energéticos y en la regulación de la homeostasis metabólica,²⁹⁷ decidimos validar este resultado mediante western blot. Nuestros resultados indicaron que existía un incremento estadísticamente significativo en los niveles totales de FABP3 en el ventrículo izquierdo de ratones KO vs. wt para TPC1 (Figura 23) y mediante western blot en dos dimensiones, observamos tres spots diferentes, uno de ellos estadísticamente incrementado en el ventrículo izquierdo de los ratones KO vs. wt (Figura 24), con lo que hemos encontrado una modificación en una proteína (FABP3) clave en el metabolismo de los ácidos grasos a nivel cardiomiocitario. El hecho de que hayamos detectado 3 spots diferentes puede deberse a que FABP3 puede fosforilarse en distintos residuos (<http://www.phosphosite.org/proteinAction.do?id=4956&showAllSites=true>) aunque todavía no se conoce cómo cada una de estas fosforilaciones podría afectar a la función de FABP3.

Nuestra observación de un incremento en FABP3 en el ventrículo izquierdo de ratones KO vs. wt para TPC1, paralela a un incremento en la captación de glucosa y movilización del transportador de glucosa GLUT-4 en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata previamente silenciados con TPC1, es concordante con otro estudio en el que se describe en otro modelo experimental esta misma relación: Kusudo y col. (2011)²⁹⁸ observaron que en miotubos C2C12 un aumento de FABP3 incrementaba la utilización de ácidos grasos al estimular la activación de AMPK y/o

AKT, lo que facilitaría la fosforilación de AS160 y consiguientemente incrementaría también la captación de glucosa, lo que hipotetizaron que contribuiría a mejorar el estado hiperglucémico durante la obesidad.

FABP3 está involucrado en el transporte de ácidos grasos que proceden tanto del exterior como de las reservas intracelulares,²⁶³ por lo que decidimos determinar si la captación de ácidos grasos en experimentos *in vitro* se encontraba alterada. Para ello, estudiamos el posible efecto del silenciamiento con siRNA para TPC1, TPC2 y TPC1/2 en la captación de ácidos grasos en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata. Sin embargo, no observamos cambios estadísticamente significativos entre las distintas condiciones de tratamiento (Figura 28). Podemos hipotetizar que la ausencia de TPCs conduce no solo a un incremento en la captación y utilización de la glucosa (como hemos visto anteriormente) sino también a la utilización de los depósitos intracelulares de ácidos grasos.

Mediante la técnica de LC-MALDI-MS en el ventrículo izquierdo de ratones KO vs. wt para TPC1 identificamos 3 proteínas relacionadas con el metabolismo lipídico (carnitina palmitoiltransferasa 2 (CPT2), acil CoA-ligasa de ácidos grasos de cadena larga 1 y la subunidad beta de la proteína trifuncional) (Tabla 9), mientras que en el ventrículo izquierdo de los ratones KO vs. wt para TPC1/2 se identificaron 6 (hidrolasa epóxido 2, carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1), acil CoA-ligasa de ácidos grasos de cadena larga 1, delta(3,5)-delta(2,4)-dienoil-CoA isomerasa, carnitina O-acetiltransferasa, apolipoproteína A1) (Tabla 6). Algunas de estas enzimas están implicadas directamente en el catabolismo de los lípidos, específicamente CPT1 y CPT2, de esta forma, la entrada a la mitocondria de los ácidos grasos es regulada a través de CPT1, (identificada en los ratones KO para TPC1/2) que se encarga de la conversión de acil-CoA de cadena larga en acilcarnitina de cadena larga (ACL).²⁸⁶ Una vez en la matriz mitocondrial, la ACL es convertida de nuevo a acil-CoA de cadena larga a través de CPT2 (identificada en ratones KO para TPC1), una enzima de 70 KDa localizada en la membrana interna de la mitocondria.²⁸⁶ Sin embargo, serían necesarios más estudios para determinar el papel exacto que tendrían CPT1, CPT2 y el resto de las enzimas identificadas en ausencia de los TPCs.

Todos estos resultados sugieren que los TPCs también podrían tener un papel en la regulación del metabolismo lipídico a nivel cardíaco. Recientemente, un estudio mostró

que los ratones KO respecto a los wt para TPC1/2 desarrollan obesidad madura de inicio entre los 6 y los 9 meses de edad debido a la menor disponibilidad y utilización de lípidos a nivel sistémico,²¹⁵ lo que plantea el posible papel de los TPCs en el manejo lipídico, pero en este caso no a nivel cardíaco, sino a nivel sistémico. No podemos decir con certeza cómo ni por qué la ausencia de los TPCs parece activar rutas de catabolismo lipídico y movilización de depósitos grasos, pero se ha visto en células cardíacas que los depósitos lipídicos contienen calcio, lo cual podría tener efectos beneficiosos al controlar niveles excesivamente elevados de calcio citosólicos en determinadas condiciones patológicas (como la isquemia/reperfusión), lo que sugiere una intrincada regulación entre la movilización de ácidos grasos y de calcio a nivel cardiovascular.²⁹⁹

1.1.3. Alteraciones en proteínas relacionadas con el ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones.

Mediante la técnica de 2-DE MALDI TOF/TOF y LC-MALDI-MS, identificamos proteínas alteradas implicadas en el ciclo de Krebs (TCA) (malato deshidrogenasa, subunidad de la isocitrato deshidrogenasa, subunidad b de la succinil-CoA ligasa formadora de ADP, subunidad succinato deshidrogenasa (ubiquinona), 2-oxoglutarato deshidrogenasa y dihidrolipoil deshidrogenasa) y en la cadena de transporte de electrones (subunidad 1 del complejo citocromo b-c1, subunidad beta de la ATP sintasa mitocondrial, factor acoplador 6 de la ATP sintasa, NADH deshidrogenasa hierro-azufre 3, NADH deshidrogenasa flavoproteína 2, ATP sintasa subunidad 0, NADH deshidrogenasa, NADH ubiquinona oxidoreductasa y subunidad gamma de la ATP sintasa) en el ventrículo izquierdo de ratones KO vs. wt para TPC1 (Tabla 8 y 9). Mediante LC-MALDI-MS en el ventrículo izquierdo de ratones KO vs. wt para TPC1/2, también se identificaron proteínas relacionadas con el TCA (2-oxoglutarato deshidrogenasa, dihidrolipoil deshidrogenasa e isocitrato deshidrogenasa subunidad gamma) y con la cadena de transporte de electrones (subunidad 2 del citocromo C oxidasa, subunidad de Rieske citocromo b-c1 y NADH deshidrogenasa 1 alfa) (Tabla 10).

Todos estos resultados sugieren la posible participación de los TPCs en la regulación de la síntesis de ATP a nivel cardíaco, objetivo final común del metabolismo

de la glucosa y de los ácidos grasos.³⁰⁰ Hasta el momento, solo hay un estudio, el de Cang y col. en el año 2013,¹⁹³ que relaciona los niveles de ATP con la función de los TPCs en células HEK293. Este estudio mostró que, en condiciones basales, mTOR se encuentra asociado con los TPCs y/o sus proteínas adyacentes para mantener al canal en un estado cerrado, sin embargo, cuando existe una disminución en los niveles de ATP, mTOR se disocia de los TPCs y se redistribuye al citosol, permitiendo su apertura y la liberación de sodio y otros iones desde el lumen del lisosoma al citosol.¹⁹³ Esta despolarización podría afectar al reciclado y obtención de nutrientes a través de la vía autofágica.²³¹ De esta forma, el ATP parece tener un papel clave como regulador de los TPCs, sin embargo, serían necesarios más estudios para comprender con mayor exactitud la desregulación de las proteínas claves en la síntesis de ATP por la ausencia de los TPCs.

1.2. Alteraciones en proteínas que regulan la contracción muscular y la organización de los componentes celulares.

Mediante la técnica de 2-DE MALDI TOF/TOF y LC-MALDI-MS, identificamos proteínas alteradas implicadas en la contracción muscular (troponina 3 y miosina cardíaca proteína de unión C) y en la organización de los componentes celulares (miosina 6, miosina 7, desmina, cadena beta 2C de la tubulina, cadena alfa 1C de la tubulina, vimentina y distintos tipos de actinas) en el ventrículo izquierdo de ratones KO vs. wt para TPC1 (Tabla 8 y 9). Mediante LC-MALDI-MS en el ventrículo izquierdo de ratones KO vs. wt para TPC1/2, también se identificaron proteínas relacionadas la contracción muscular (ATPasa 2, subunidad beta 1 de la ATPasa sodio/potasio, tropomiosina alfa-1, troponina T y anexina 6) y con la organización de los componentes celulares (actina 1 citoplasmática, tropomiosina alfa-1 y vinculina) (Tabla 10). Por lo tanto, nuestros resultados parecen indicar una desregulación de las miofibrillas que se encargan de la contracción y/o el mantenimiento estructural en ausencia de los TPCs.

La actina, por su parte, es una proteína que cuando se encuentra aislada se denomina actina G (globular), pero que al asociarse forma la actina F.³⁰¹ Las actinas G tienen un sitio de unión a la miosina, sin embargo, cuando el músculo está relajado este

sitio de alta afinidad por la miosina está ocupado por la tropomiosina, que a su vez está unida a la troponina (con alta afinidad por el calcio).³⁰² Por el contrario, cuando el músculo se contrae, se libera calcio, que se une a la troponina, desplazando consigo a la tropomiosina y permitiendo, por tanto, la unión entre la actina y la miosina y consiguientemente, se produce la contracción muscular para lo cual también es necesario la hidrólisis de ATP.³⁰² Por lo tanto, cambios en proteínas del citoesqueleto (actina, miosina, desmina, tubulina), bien sea por diversas modificaciones postraduccionales como la fosforilación, la glicación, la glicosilación, etc. pueden ser causa y consecuencia de disfunciones en las propiedades contráctiles de los miofilamentos, lo que podría originar una disfunción contráctil.³⁰³ Otro aspecto muy importante de la regulación de la función contráctil cardíaca es el control de la homeostasis del calcio,³⁰⁴ en donde se ha visto que los TPCs juegan un papel clave al ser capaces de liberar calcio desde el lisosoma, que a su vez estimula a los grandes movilizadores de calcio a nivel intracelular como son los receptores de rianodina e IP3.³⁰⁵ Sin embargo, nuestros resultados son preliminares, y serían necesarios más estudios para determinar el papel concreto que esta desregulación de las miofibrillas en ausencia de los TPCs podría tener en la capacidad contráctil a nivel cardíaco. Otros estudios han observado las relaciones que existen entre los canales de calcio y los componentes del citoesqueleto: numerosos componentes del citoesqueleto pueden regular, localizar y determinar la expresión de canales de calcio voltaje dependientes en respuesta a determinados estímulos extracelulares en músculo,³⁰⁶ los niveles de calcio pueden estimular la polimerización de la actina en células excitatorias como las neuronas³⁰⁷ y, en concreto a nivel cardiovascular, determinados depresores de la fuerza cardíaca actúan disminuyendo la respuesta de los miofilamentos al calcio.³⁰⁸

2. Estudio del papel de los TPCs en la regulación de la autofagia cardiomiocitaria.

Justificación del estudio.

1. Una de las proteínas incrementadas en el ventrículo izquierdo de los ratones KO vs. wt para TPC1 fue la desmina. La desmina es un filamento intermedio necesario para mantener la integridad del sarcómero,³⁰⁴ sin embargo, su agregación o perturbación da lugar a una enfermedad conocida como miopatía relacionada con la desmina, enfermedad particularmente severa que conduce a insuficiencia cardíaca.¹⁸¹ Se ha visto que la autofagia, que es un proceso catabólico en el que las proteínas y los orgánulos dañados son secuestrados por vesículas de doble membrana, llamados autofagosomas, y posteriormente degradados,³⁰⁹ podría tener un papel clave en este proceso fisiológico, al ser capaz de degradar agregados proteicos y, por lo tanto, mejorar la progresión de la enfermedad.¹⁸¹
 2. Identificamos un incremento en enzimas clave relacionadas con el metabolismo de la glucosa en el ventrículo izquierdo de ratones KO vs. wt para TPC1, en concordancia con un incremento en la captación de glucosa y movilización del transportador de glucosa GLUT-4 en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata con TPC1 silenciado. Recientemente Roberts y col. (2014)³¹⁰ han demostrado que la hexoquinasa, que cataliza el primer paso de la glicólisis al fosforilar la glucosa a glucosa 6-fosfato, coopera con mTORC1 para mantener un equilibrio entre la captación de glucosa, su utilización, el crecimiento celular y la autofagia, para así conseguir una adecuada regulación de la homeostasis celular: de esta forma, cuando la concentración de glucosa es limitada, la hexokinasa II se uniría a mTORC1 e inhibiría su actividad, lo que suprimiría el crecimiento celular y promovería la autofagia; por el contrario, cuando la captación de glucosa excediese la capacidad de metabolizarla, la acumulación de glucosa 6-fosfato provocaría la desestabilización de la unión entre la hexokinasa II y mTORC1, lo que promovería el crecimiento celular y
-

bloquearía la autofagia. Este trabajo pone de manifiesto la interrelación existente entre el metabolismo de la glucosa y la autofagia.³¹⁰

3. La distribución endolisosomal de los TPCs pone de manifiesto su papel como potenciales controladores de aquellos procesos regulados vía endosomas y/o lisosomas.³⁰⁵ Los lisosomas juegan un papel clave durante la autofagia, al participar en su fusión y posterior degradación de los materiales presentes en el autofagosoma.⁸⁰

Papel de los TPCs en la regulación de la autofagia cardiomiocitaria.

Las células monitorizan de forma constante la función lisosomal y poseen la capacidad de aumentar el número y la actividad de los lisosomas en respuesta a sus necesidades energéticas o de degradación, regulando a través del factor de transcripción EB, la expresión de genes relacionados con la autofagia, que se traducirán a proteínas implicadas tanto en la formación de autofagosomas, como en la regulación de la fusión entre el autofagosoma y el lisosoma.²³¹

La autofagia basal es un mecanismo de protección especialmente importante en células diferenciadas como los cardiomiocitos, ya que permite mantener una adecuada función cardiovascular al ser un mecanismo de control de calidad que se encarga del reciclaje de componentes celulares dañados³¹² y un daño en estos mecanismos contribuye al desarrollo de distintas enfermedades cardiovasculares.¹⁷⁰

Estudios previos han sugerido que los TPCs podrían regular los procesos autofágicos en varios tejidos,^{216,217,313} pero en la actualidad se desconoce su papel en la regulación del flujo autofágico a nivel cardíaco. Se ha demostrado que la autofagia juega un papel beneficioso durante la deprivación energética en el corazón al ejercer un efecto citoprotector.³¹⁴ Nuestros resultados mostraron que, tras la deprivación energética tanto en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata como en células HL-1, existe una activación de AMPK y una defosforilación de mTOR (Figuras 32-35) (lo que se sabe que conduce a una inducción de la biogénesis lisosomal y cambios en el potencial de la membrana lisosomal²³¹) que eran concomitantes con un aumento significativo en los niveles de ARNm y proteína de los TPCs (Figuras 29-31) con una

activación de la autofagia, evaluada por el aumento en los niveles de LC3II/I y la disminución en los niveles de p62 (Figura 36).

Como hemos comentado anteriormente, en un primer momento se postuló que los TPCs podían actuar como canales de calcio activados por NAADP, regulando de esta forma el pH de las organelas acídicas, lo que permitiría a TPC2 proporcionar las condiciones adecuadas para el correcto funcionamiento de las enzimas lisosomales.³⁰⁵ Sin embargo, posteriormente, Cang y col. (2013)¹⁹³ sugirieron que cuando se reducen los niveles de ATP, mTORC1 se redistribuye al citosol, lo que permite la apertura de los TPCs y la liberación de sodio y otros iones desde el lumen del lisosoma al citosol. Esta despolarización de la membrana lisosomal podría afectar potencialmente a distintos parámetros lisosomales, como el pH luminal, su capacidad de fusión con el autofagosoma o el transporte de nutrientes,¹⁹³ pero poco se sabe sobre el papel de los TPCs en la función lisosomal o en la regulación de los procesos autofágicos.

Para conocer la posible implicación de los TPCs en los procesos autofágicos a nivel cardíaco utilizamos un siRNA interferente control, siTPC1, siTPC2 y siTPC1/2 en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata. Nuestros resultados muestran que, en condiciones basales, el silenciamiento de TPC2 o de TPC1/2 (pero no el de TPC1) induce un incremento significativo en los niveles de LC3II (formado a partir de LC3I tras sufrir un proceso de lipidación que conduce a su asociación con el autofagosoma¹²⁵) (Figura 38 y 39). Debido a que la acumulación de autofagosomas puede ser debida a un aumento en su formación y/o a un acúmulo de los mismos, monitorizamos el flujo autofágico a través de las diferencias en la cantidad de LC3II en presencia y ausencia de un inhibidor lisosomal, la bafilomicina A1. De esta forma, el tratamiento con bafilomicina A1 en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata tanto en condiciones basales como de privación energética, incrementó aún más los niveles de LC3II (confirmando un incremento del flujo autofágico en las situaciones control), que fueron parcialmente (en el caso de TPC1) o casi en su totalidad (en el caso de TPC2) revertidos con el silenciamiento de los TPCs (Figuras 40 y 41). En línea con estos resultados, en condiciones basales, el silenciamiento de TPC2 o de TPC1/2 (pero no el de TPC1) induce también un incremento significativo en los niveles de p62 (el silenciamiento de TPC1 solo induce un ligero incremento en p62, pero que no resulta

significativo), mientras que el silenciamiento de TPC1, TPC2 y TPC1/2 induce siempre un acúmulo de p62 tras la deprivación energética (Figuras 42 y 43).

p62 puede actuar como adaptador incorporando sustratos ubiquitinizados al proceso autofágico al trasladar los distintos sustratos hacia el fagoporo y hacia el sitio de formación del autofagosoma.¹³⁹ De esta forma, p62 se incorpora selectivamente al autofagosoma y posteriormente se degrada vía autofagia.^{119,140} Los niveles de expresión de p62 están estrictamente regulados mediante su degradación a través de la autofagia basal, sin embargo, un deterioro en la misma conduce la acumulación masiva de p62 y posteriormente a la formación de agregados.¹⁴¹ Por el contrario, cuando la autofagia está activada ante situaciones como la deprivación energética, y no existe un deterioro de la misma, p62 se degrada rápidamente y su nivel se reduce drásticamente.^{118,144} Por ello, se ha postulado que los niveles citoplasmáticos de p62 podrían ser indicadores de flujo autofágico, correlacionándose negativamente con este, con lo que la acumulación de p62 (detectada mediante inmunocitofluorescencia o western blot) se corresponden con un flujo autofágico deficiente.¹²¹ En condiciones de estrés tales como la deprivación energética, la autofagia se induce rápidamente teniendo un efecto protector en los cardiomiocitos,³¹⁴ sin embargo, el malfuncionamiento o defectos en el flujo autofágico producidos por la inhibición de la fusión del autofagosoma con el lisosoma y/o endosoma podría causar importantes acúmulos de p62.³¹⁵

El primer estudio que relacionó la autofagia con la señalización vía TPCs fue el de Pereira y col.²¹⁶ en el año 2011, cuando demostraron en cultivos de astrocitos de rata que el NAADP inducía la liberación de calcio de las organelas ácidas incrementando los marcadores de autofagia LC3II y Beclin1; sin embargo, al introducir un dominante negativo para TPC2, estos marcadores autofágicos se veían reducidos, sugiriendo un potencial papel de TPC2 en la regulación de la autofagia en astrocitos. Un año más tarde, Kayala y col.²¹⁷ observaron que la reducción de la función de TPC2 con el antagonista de NAADP, Ned-19, podría regular negativamente la autofagia.

En contraste con estos artículos y con nuestros resultados, Lu y col. (2013)²¹⁸ demostraron que la sobreexpresión de TPC2 (mediante un lentivirus) en células HeLa para hacerlas competentes al NAADP, conducía a un incremento de LC3II y p62, mientras que el tratamiento con bafilomicina A1 no inducía un incremento de LC3II, lo que sugería una inhibición de la fusión entre el autofagosoma y el lisosoma y por lo

tanto, un bloqueo en la autofagia. La discrepancia con nuestros resultados podría atribuirse, al menos parcialmente, al distinto tipo celular usado (línea celular tumoral cérvico-uterino humana frente a un cultivo primario de células cardíacas primarias diferenciadas) y a la distinta metodología utilizada (el silenciamiento con un siRNA de cardiomiocitos con expresión constitutiva de TPC1 y TPC2, frente a una sobreexpresión de TPC2 en una línea tumoral) para determinar el flujo autofágico. En un estudio reciente llevado a cabo por Lin y col. (2014)²¹⁹ se observó una acumulación de autofagosomas, un descenso en el pH lisosomal que conducía a una reducción de la actividad de las proteasas lisosomales, y una reducción en los niveles de p62 en el músculo esquelético de ratones KO para TPC2 con respecto a los wt, pero esta respuesta autofágica no se asoció con una reducción en la fosforilación de mTOR, como sí ocurre en nuestro caso y en muchos otros trabajos.^{159,163,316} Además, en el trabajo de Lin y col. (2014),²¹⁹ la deprivación energética indujo un aumento en los niveles de p62 y pmTOR tanto en el músculo esquelético de ratones wt como KO para TPC2, en contraste con nuestras observaciones y con otras muchas publicaciones en donde la serodeprivación o la deprivación energética induce un aumento en el flujo autofágico caracterizado por una disminución en los niveles de p62 y pmTOR, en condiciones normales.^{118,121,122,144,317} En el artículo de Lin y col. (2014)²¹⁹ también midieron el flujo autofágico, y observaron que el tratamiento con bafilomicina A1 en miotubos en cultivo incrementó los niveles de LC3II tanto en los ratones wt como KO para TPC2, sugiriendo que no existía un bloqueo del flujo autofágico. Sin embargo, nuestros resultados sugieren un bloqueo del flujo autofágico durante el silenciamiento de TPC2 en cultivo primario de cardiomiocitos neonatales de rata en cultivo. Estas diferencias podrían potencialmente atribuirse a las diferentes dosis y tiempo en presencia de bafilomicina (200nM durante 3.5 horas del estudio de Lin y col. (2014)²¹⁹ respecto a nuestro estudio, en el cual utilizamos una dosis de 100nM durante 2 horas), que es crítica, ya que puede conducir a resultados aparentemente distintos según la ventana de tiempo y dosis de tratamiento utilizada, incluso en una misma línea celular.¹³³

Las diferencias encontradas entre el silenciamiento de TPC1 y TPC2 en los marcadores autofágicos en nuestro trabajo podrían explicarse por la diferente localización intracelular de TPC1 (predominantemente en endosomas) y TPC2 (predominantemente en lisosomas) y por el papel que ambos orgánulos podrían tener en

la autofagia. Durante la autofagia, los autofagosomas maduran para posteriormente poder fusionarse con los endosomas (tempranos o tardíos) y/o lisosomas,¹⁰¹ con lo que podemos hipotetizar que los TPCs, a través de su distribución endolisosomal, podrían funcionar como integradores de las señales provenientes del citosol y del lumen, y de los lisosomas y endosomas, provocando cambios funcionales en las propias organelas que podrían afectar al funcionamiento de la autofagia, por lo que el silenciamiento de los TPCs podría bloquear el flujo autofágico a través del bloqueo de la fusión del autofagosoma con el lisosoma y/o endosoma.

Paralelamente, nuestros resultados de microscopía electrónica mostraron que existe una alteración en el número y morfología lisosomal en los ratones KO para TPC1/2 vs. wt, incrementándose el número de lisosomas pero disminuyendo su superficie (Figura 44), asemejándose a lisosomas inmaduros o tempranos.³¹⁸ En concordancia con nuestros resultados Lin-Moshier y col. (2014)³¹⁹ y Hockey y col. (2013)³²⁰ sugirieron que los TPCs podrían tener un papel importante en determinados estados patogénicos de proliferación lisosomal, por ejemplo patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson. Asimismo, Kayala y col. (2012)²¹⁷ han observado que fibroblastos embrionarios de ratón deficientes en presinilina (que es importante para la adecuada proteólisis durante la autofagia) presentaban anomalías en el calcio lisosomal y alteraciones de la expresión de los TPCs y que, a pesar de un incremento del número de lisosomas, existía una disminución del flujo autofágico.

3. Regulación de los niveles de expresión cardíaca de TPC1 y TPC2 *in vivo* por el ayuno, la dieta y el género.

3.1. Ayuno.

Hemos visto que deprivación energética, tanto en cultivo primario de neonatos de rata como en células HL-1, provoca un aumento significativo en los niveles de ARNm y proteína de los TPCs. Estudios previos han demostrado la inducción de una autofagia cardíaca *in vivo* en ratones sometidos a deprivación energética a partir de 24 horas.^{155,321,322} Nuestros resultados muestran un incremento en los niveles de ARNm y

proteína de TPC2 en ratas sometidas a ayuno (Figuras 45 y 46); sin embargo, no observamos cambios en los niveles de LC3 (Figura 47). Estos resultados pueden deberse a que, al ser la autofagia un proceso altamente dinámico, no siempre se podría detectar este incremento de LC3II de forma puntual (36h); de hecho, la mayoría de los estudios realizados hasta la fecha *in vivo* utilizan un modelo de ratón transgénico con la proteína GFP-LC3,^{126,323,324} lo que permite una mejor visualización y seguimiento del proceso autofágico.

3.2. Dieta.

El síndrome metabólico se caracteriza por un conjunto de factores de riesgo como son la hiperglucemia, la dislipemia, la hipertensión y obesidad abdominal.³²⁵ Durante las últimas décadas, la prevalencia del síndrome metabólico se ha incrementado drásticamente, lo cual supone un importante riesgo para la salud ya que conlleva asociado un mayor riesgo de desarrollar diabetes mellitus y enfermedades cardiovasculares.³²⁶ Entre los diversos modelos experimentales de síndrome metabólico, la obesidad inducida por la dieta se ha considerado como un modelo aceptado para evaluar las anomalías cardíacas asociadas al mismo.³²⁷ Por ejemplo, la ingesta prolongada (5 meses) de una dieta alta en grasa induce en ratones síndrome metabólico, caracterizado por obesidad, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina, dislipemia y alteraciones en la geometría y la función cardíaca con un aumento del grosor de la pared ventricular.^{328,329}

Hasta la fecha, se han postulado distintos mecanismos que tratan de explicar las complicaciones cardíacas derivadas del síndrome metabólico, entre las que se incluyen la lipotoxicidad cardíaca, la inflamación, el estrés oxidativo, la apoptosis y la sobreactivación del sistema simpático; y, más recientemente, se ha comenzado a prestar atención a la autofagia, ya que juega un papel muy importante en el mantenimiento de la geometría y función cardíaca en condiciones fisiológicas y patológicas.³³⁰ Sin embargo, en nuestro trabajo, realizado en tejido cardíaco de ratas macho alimentadas con dieta alta en grasa durante 18 semanas, no hemos encontrado evidencias de cambios en los niveles de ARNm de TPC1 y TPC2, ni tampoco variaciones en los niveles proteicos de los marcadores autofágicos LC3 y p62 (Figuras 48 y 49). Nuestros

resultados están en concordancia con otro estudio realizado en ratas hembras alimentadas con una dieta alta en grasa durante 16 semanas en donde no observan cambios en la autofagia en músculo esquelético.³³¹ En cuanto a los estudios realizados en animales con síndrome metabólico, existe una gran controversia sobre el papel de la autofagia en el desarrollo del mismo, ya que a pesar de que algunos autores postulan que no existe una relación entre ambos procesos,^{332,333} otros sugieren que existe o bien un descenso en la autofagia (identificada como una disminución en LC3II y Beclin1) en tejido cardíaco de cerdos,³²⁷ o bien un bloqueo en el flujo autofágico (determinado por un incremento en los niveles de LC3II y p62) en tejido cardíaco de ratones.³²⁶ Estas discrepancias pueden deberse a diferencias entre los distintos estudios en cuanto a los modelos experimentales utilizados, las características de las dietas, el tiempo de duración del experimento, el género y/o la edad de los animales.

3.3. Género.

Nuestros resultados mostraron que en tejido cardíaco (aurícula), los niveles de expresión de ARNm y proteína de TPC1 y TPC2 eran mayores en ratas hembras y en mujeres que en ratas macho y hombres (Figuras 50-52). Además, observamos que en ratas tanto macho como hembra, los niveles de ARNm de TPC1 y TPC2 se correlacionaban negativamente con los niveles de expresión proteica de p62 (Figura 54). Nuestro estudio es, por lo tanto, el primero en mostrar, por un lado, un dimorfismo sexual en los niveles de expresión de los TPCs en tejidos cardíacos murinos y humanos y, por otro, una disminución de los niveles proteicos de p62 en corazones de ratas hembras respecto a los machos (mientras que no se observan diferencias en la relación LC3II/I) (Figura 53). Estos resultados podrían sugerir la existencia de un mayor flujo constitutivo autofágico en corazones de rata hembra, lo que podría tener consecuencias en varios aspectos, como en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Otros autores han descrito previamente el dimorfismo sexual en la autofagia constitutiva en otros tejidos como músculo esquelético y médula espinal.²⁶⁵ A nivel cardíaco, y en concordancia con nuestros resultados, se ha demostrado recientemente que los niveles de expresión de un marcador de glucofagia (autofagia selectiva de glucógeno) es menor en los corazones de ratones hembra respecto a los machos, en condiciones basales.³³⁴

Estudios recientes han demostrado no solo un dimorfismo sexual en la autofagia, sino también la existencia de una especificidad tisular/celular en la autofagia constitutiva: de esta forma, el género afecta a la autofagia, pero el modo en que la afecta puede diferir dependiendo del tipo celular y de las circunstancias fisiológicas y/o patológicas.³³⁵

A pesar de la existencia de un dimorfismo sexual en los niveles de TPCs y p62, no encontramos diferencias significativas en los niveles de expresión de ARNm de TPC1 y TPC2 en ratas ovariectomizadas y gonadectomizadas con o sin reemplazo hormonal respecto al grupo control (Figura 55). Esto puede deberse a la existencia de un dimorfismo sexual independiente de las hormonas sexuales. De hecho, se ha visto que muchas características como la tasa de desarrollo temprano, la adiposidad o los circuitos neuronales, vienen determinados por el cromosoma X y no por las gónadas, lo que da lugar a que determinados dimorfismos puedan tener lugar incluso antes de que las gónadas empiecen a producir hormonas.³³⁶

Serían necesarios trabajos adicionales para contextualizar este dimorfismo sexual en las diferentes condiciones fisiológicas y fisiopatológicas.

4. Estudio de los niveles de expresión génica y proteica de TPC1 y TPC2 en tejido cardíaco humano procedente de pacientes con enfermedades cardiovasculares.

La insuficiencia cardíaca es una enfermedad progresiva que se caracteriza por un remodelado ventricular que da lugar a cambios en el balance entre la síntesis y degradación de las proteínas.¹⁸⁸ El papel que puede jugar la autofagia en el desarrollo de esta enfermedad es controvertido, ya que a pesar de que su desregulación o reducción está asociada con insuficiencia cardíaca y que su activación es protectora, un exceso de la misma también puede constituir una respuesta maladaptativa, al causar destrucción progresiva de cardiomiocitos.³³⁷ Modular la autofagia de forma precisa constituye una diana terapéutica atractiva para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares, por lo que conocer su regulación, así como las proteínas implicadas en la misma, es muy importante. Por ello, decidimos llevar a cabo el estudio de los niveles de expresión de

los TPCs en ventrículos de donantes sanos (controles) frente a pacientes con insuficiencia cardíaca (tanto de etiología isquémica como dilatada).

Nuestros resultados en ventrículo izquierdo de corazones explantados de 6 pacientes control, 16 pacientes con cardiomiopatía isquémica y 20 pacientes con cardiomiopatía dilatada, ambos grupos en el estado final de la insuficiencia cardíaca, mostraron un incremento en los niveles de ARNm y proteína de TPC1 y TPC2 respecto al grupo control (Figura 56). La regulación de ambos canales podría estar relacionada con los resultados de otros estudios, que muestran un incremento en la expresión de los receptores de rianodina (canal de calcio localizado en el retículo endoplásmico, muy importante para la regulación de la contracción cardíaca) en pacientes también con insuficiencia cardíaca.^{338,339} La expresión de TPC2 se encuentra elevada tanto en cardiomiopatía isquémica como dilatada, a diferencia de TPC1 que solo se encuentra elevado en cardiomiopatía dilatada, lo que sugiere que TPC2 podría estar implicado en un mecanismo general que subyace a la insuficiencia cardíaca de ambos orígenes.

Estudios previos han demostrado que en el corazón insuficiente existe un incremento en la expresión del receptor de inositol 3-fosfato situado en el retículo endoplasmático, capaz de incrementar a su vez la sensibilidad del receptor de rianodina por el calcio, lo que originaría un incremento de los niveles de calcio característicos de la insuficiencia cardíaca.³⁴⁰ Como hemos comentado anteriormente, se ha visto que los TPCs, podrían actuar como canales de calcio, lo que daría lugar a una liberación del mismo, que a través del CICR (calcio induce la liberación de más calcio) activaría a su vez a los receptores inositol 3 fosfato y rianodina.³ Basándonos en estos estudios y en nuestros resultados, podemos sugerir que durante la insuficiencia cardíaca TPC1 y/o TPC2 podrían estar involucrados en las alteraciones en la movilización de calcio a través de los canales de inositol 3 fosfato y rianodina, características de la insuficiencia cardíaca, aunque serían necesarios más estudios para determinar el papel exacto que los TPCs juegan durante la fisiopatología de la insuficiencia cardíaca tanto en relación con su capacidad de actuar como canales iónicos, como con su relación con la autofagia cardiomiocitaria.





CONCLUSIONES/CONCLUSION



1. The cardiac tissue of TPC1 KO mice shows significant alterations in key proteins related with glycolysis, fatty acid mobilization, Krebs cycle and transport electron chain.
2. The cardiac tissue of TPC1 KO mice shows significant alterations in proteins related with cardiac contraction and/or structure maintenance.
3. SiRNA depletion of TPC1, TPC2 and TPC1/2 induces an increase in glucose uptake in cultured cardiomyocytes.
4. SiRNA depletion of TPC1 induces an increase on GLUT-4 (the main glucose transporter in the heart) translocation, favouring translocation from the cytoplasmic/perinuclear regions to the cell periphery in cultured cardiomyocytes.
5. Serum starvation induces significant increases in TPC1 and TPC2 levels *in vitro* (in neonatal rat cardiomyocytes, HL-1 cells and human cardiomyocytes) and in TPC2 levels *in vivo* in cardiac tissue of fasting rats.
6. SiRNA depletion of TPC2 alone or together with TPC1 increases both LC3II and p62 levels under basal conditions and in response to starvation, meanwhile siRNA depletion of TPC1 increases both markers only in response to starvation.
7. In rat heart tissues transcript levels of both TPC1 and TPC2 correlate negatively with p62 protein levels.
8. Electron micrographs of cardiac tissue from TPC1/2 double knockout mice showed that cardiomyocytes contained large numbers of immature lysosomes with diameters significantly smaller than those of wild-type mice
9. In cardiac tissues from both humans and rats, TPC1 and TPC2 transcripts and protein levels were higher in females than in males.
10. Transcript and protein levels of TPC1 and TPC2 increase in heart failure patients compared to healthy controls. TPC2 has similar levels of significance in all heart failure groups that were analyzed, regardless of cardiomyopathy. However, TPC1's increase is statistically significant in dilated cardiomyopathy, whereas in ischemic cardiomyopathy did not reach statistical significance.

These data are the first evidence that showing that the TPCs and the endolysosomal system could be involved in cardiac metabolism, cardiac autophagy, and thus, in the physiopathology of cardiovascular diseases.





APÉNDICE



TPCN1 M 1 wt			
% Cob (95)	Código Uniprot	Nombre	Péptidos (95%)
10,1	MYH6_MOUSE	Myosin-6	19
38,2	ACTC_MOUSE	Actin, alpha cardiac muscle 1	19
21	ATPB_MOUSE	ATP synthase subunit beta, mit	12
24	ACTG_MOUSE	Actin, cytoplasmic 2	12
13,7	ATPA_MOUSE	ATP synthase subunit alpha, mit	7
11,7	ACON_MOUSE	Aconitate hydratase, mit	7
34,5	HBA_MOUSE	Hemoglobin subunit alpha	6
35,4	HBB1_MOUSE	Hemoglobin subunit beta-1	5
12,4	DESM_MOUSE	Desmin	5
9,2	ALBU_MOUSE	Serum albumin	5
12,1	QCR1_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mit	4
23	MYL3_MOUSE	Myosin light chain 3	3
8,6	ACADM_MOUSE	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	3
6,7	AATM_MOUSE	Aspartate aminotransferase, mit	3
7,1	NIPS2_MOUSE	Protein NipSnap homolog 2	3
10	KCRS_MOUSE	Creatine kinase S-type, mit	3
7,5	QCR2_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mit	3
8	TNNT2_MOUSE	Troponin T, cardiac muscle	3
3,3	ECHA_MOUSE	Trifunctional enzyme subunit alpha, mit	3
7	ADT1_MOUSE	ADP/ATP translocase 1	2
11,4	ETFB_MOUSE	Electron transfer flavoprotein subunit beta	2
4,8	HEMO_MOUSE	Hemopexin	2
8,6	THIM_MOUSE	3-ketoacyl-CoA thiolase, mit	2
14,3	FABPH_MOUSE	Fatty acid-binding protein, heart	2
3,8	DHSA_MOUSE	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mit	2
5,3	IDHP_MOUSE	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mit	2
4,5	CISY_MOUSE	Citrate synthase, mit	2
3,5	D3D2_MOUSE	3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mit	1
9,7	MYG_MOUSE	Myoglobin	1
2,1	ODPA_MOUSE	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mit	1
4	MYL10_MOUSE	Myosin regulatory light chain 10	1
3,1	AT5F1_MOUSE	ATP synthase subunit b, mit	1
3,8	MDHM_MOUSE	Malate dehydrogenase, mit	1
2,2	SUCB1_MOUSE	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mit	1
2,2	IDH3A_MOUSE	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mit	1
6,6	DECR_MOUSE	2,4-dienoyl-CoA reductase, mit	1
3,3	SPA3N_MOUSE	Serine protease inhibitor A3N	1
3,1	THIL_MOUSE	Acetyl-CoA acetyltransferase, mit	1
6,7	COQ9_MOUSE	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mit	1
2,6	ACOT6_MOUSE	Acyl-coenzyme A thioesterase 6	1
7,7	COX41_MOUSE	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mit	1
2,4	NDUA9_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mit	1
2,9	HCDH_MOUSE	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mit	1
3,2	ACADS_MOUSE	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	1
2,3	ACADL_MOUSE	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	1
6,3	CRYAB_MOUSE	Alpha-crystallin B chain	1
3	MDHC_MOUSE	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	1
2,7	LDHB_MOUSE	L-lactate dehydrogenase B chain	1
1	ACS2L_MOUSE	Acetyl-coenzyme A synthetase 2-like, mit	1
3,6	ETFA_MOUSE	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mit	1
2,6	HPT_MOUSE	Haptoglobin	1
1,9	KIFC2_MOUSE	Kinesin-like protein KIFC2	1

Tabla 11. Proteínas identificadas por LC-MALDI en el ventrículo izquierdo cardíaco del ratón número 1 wt para TPC1. Se representa el porcentaje de cobertura, el código UniProt, el nombre y el número de péptidos encontrados para cada proteína. mit, mitocondrial.

TPCN1 M2 wt			
% Cob (95)	Código Uniprot	Nombre	Péptidos (95%)
63,1	ACTC_MOUSE	Actin, alpha cardiac muscle 1	35
20,3	MYH6_MOUSE	Myosin-6	34
59,2	ATPB_MOUSE	ATP synthase subunit beta, mi	27
44,5	ATPA_MOUSE	ATP synthase subunit alpha, mit	21
27,8	ECHA_MOUSE	Trifunctional enzyme subunit alpha, mit	19
25,1	ACON_MOUSE	Aconitate hydratase, mit	14
49,1	MDHM_MOUSE	Malate dehydrogenase, mit	14
78,9	HBB1_MOUSE	Hemoglobin subunit beta-1	13
28,3	ALBU_MOUSE	Serum albumin	12
39,3	ADT1_MOUSE	ADP/ATP translocase 1	12
22,6	IDHP_MOUSE	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mit	11
31,7	KCRS_MOUSE	Creatine kinase S-type, mit	11
62,7	HBA_MOUSE	Hemoglobin subunit alpha	9
19,4	ACADV_MOUSE	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	7
27,5	THIM_MOUSE	3-ketoacyl-CoA thiolase, mit	7
32,7	ENOB_MOUSE	Beta-enolase	7
20,6	ECHB_MOUSE	Trifunctional enzyme subunit beta, mit	7
38,9	TNNI3_MOUSE	Troponin I, cardiac muscle	7
8,7	ACTN2_MOUSE	Alpha-actinin-2	6
22	DESM_MOUSE	Desmin	6
16,2	CISY_MOUSE	Citrate synthase, mit	6
48	MYL3_MOUSE	Myosin light chain 3	6
19	NDU3_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mit	6
17,2	QCR2_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mit	6
18,3	MDHC_MOUSE	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	6
18,5	FUMH_MOUSE	Fumarate hydratase, mit	5
17,7	QCR1_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mit	5
25,9	ETFB_MOUSE	Electron transfer flavoprotein subunit beta	4
17,7	G3P_MOUSE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	4
27,8	FABPH_MOUSE	Fatty acid-binding protein, heart	4
23,5	MYOZ2_MOUSE	Myozenin-2	4
39,1	ATP5H_MOUSE	ATP synthase subunit d, mit	4
16,5	NDUA9_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mit	4
40,4	MLRV_MOUSE	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	4
15	KCRM_MOUSE	Creatine kinase M-type	4
18,2	VDAC1_MOUSE	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	4
5,9	SRCA_MOUSE	Sarcalumenin	4
6,3	ACADL_MOUSE	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	4
9,2	DHSA_MOUSE	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mit	4
7,2	KPYM_MOUSE	Isoform M1 of Pyruvate kinase isozymes M1/M2	3
11,6	NDUAA_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mit	3
8,1	TBB2C_MOUSE	Tubulin beta-2C chain	3
9,8	AATM_MOUSE	Aspartate aminotransferase, mit	3
13,9	CY1_MOUSE	Cytochrome c1, heme protein, mit	3
17,3	ALDOA_MOUSE	Fructose-bisphosphate aldolase A	3
8,8	ACADM_MOUSE	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	3
12,3	IDH3A_MOUSE	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mit	3
10,8	DECR_MOUSE	2,4-dienoyl-CoA reductase, mit	3
7,4	ATPG_MOUSE	ATP synthase subunit gamma, mit	3
25,3	MYG_MOUSE	Myoglobin	3
18,7	ECH1_MOUSE	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mit	3
3,8	ODO1_MOUSE	2-oxoglutarate dehydrogenase, mit	3
16,9	ATPO_MOUSE	ATP synthase subunit O, mit	3
4,9	GRP75_MOUSE	Stress-70 protein, mit	3
4,5	NDU51_MOUSE	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mit	2
4,8	IMMT_MOUSE	Mitochondrial inner membrane protein	2
8	AATC_MOUSE	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	2
4,3	CPT2_MOUSE	Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mit	2
1,9	PYGB_MOUSE	Glycogen phosphorylase, brain form	2
6,6	TNNT2_MOUSE	Isoform A3B of Troponin T, cardiac muscle	2
9,2	DHSB_MOUSE	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mit	2

(Continúa en la página siguiente)

TPCN1 M2 wt			
% Cob (95)	Código Uniprot	Nombre	Péptidos (95%)
6,6	TNNT2_MOUSE	Isoform A3B of Troponin T, cardiac muscle	2
4,6	HSP7C_MOUSE	Heat shock cognate 71 kDa protein	2
5,5	ACOT2_MOUSE	Acyl-coenzyme A thioesterase 2, mit	2
8,9	ODPB_MOUSE	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mit	2
4,1	LDB3_MOUSE	LIM domain-binding protein 3	2
7,3	CH60_MOUSE	60 kDa heat shock protein, mit	2
5,4	NDUV1_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mit	2
9,4	NDUS8_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mit	2
6,9	FIBB_MOUSE	Fibrinogen beta chain	2
6,3	ACADS_MOUSE	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	2
13,7	CRYAB_MOUSE	Alpha-crystallin B chain	2
6,9	LDHB_MOUSE	L-lactate dehydrogenase B chain	2
16,5	NDUBA_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	2
6,3	PCCB_MOUSE	Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mit	2
9,2	SUCA_MOUSE	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit alpha, mit	2
29,1	CX6B1_MOUSE	Cytochrome c oxidase subunit 6B1	2
5,5	ODP2_MOUSE	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mit	2
5,6	ODPA_MOUSE	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mit	2
5,8	VIME_MOUSE	Vimentin	2
4,2	EFTU_MOUSE	Elongation factor Tu, mit	2
7,1	COX4_MOUSE	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mit	2
0,9	LONM_MOUSE	Lon protease homolog, mit	1
5,3	APOA1_MOUSE	Apolipoprotein A-I	1
6,7	COQ9_MOUSE	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mit	1
2,9	TBA4A_MOUSE	Tubulin alpha-4A chain	1
4,9	TPM2_MOUSE	Isoform TM-1 of Tropomyosin beta chain	1
4	SCOT1_MOUSE	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1, mit	1
3,7	DLDH_MOUSE	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mit	1
7,2	KAD1_MOUSE	Adenylate kinase isoenzyme 1	1
5,9	AT5F1_MOUSE	ATP synthase subunit b, mit	1
2	TRFE_MOUSE	Serotransferrin	1
3,1	ETFD_MOUSE	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mit	1
5,7	THIL_MOUSE	Acetyl-CoA acetyltransferase, mit	1
6	TPIS_MOUSE	Triosephosphate isomerase	1
4,3	PHB2_MOUSE	Prohibitin-2	1
9	NDUAD_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13	1
11,9	H2B3A_MOUSE	Histone H2B type 3-A	1
3,2	M2OM_MOUSE	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	1
7,2	ECHM_MOUSE	Enoyl-CoA hydratase, mit	1
3,5	HCDH_MOUSE	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mit	1
3,1	TRI72_MOUSE	Tripartite motif-containing protein 72	1
8,1	PRDX5_MOUSE	Peroxioredoxin-5, mit	1
3,5	NDRG2_MOUSE	Protein NDRG2	1
15,6	NDUB9_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 9	1
14,6	NDUA4_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4	1
4,4	PHB_MOUSE	Prohibitin	1
2,4	CACP_MOUSE	Carnitine O-acetyltransferase	1
2,7	ALDH2_MOUSE	Aldehyde dehydrogenase, mit	1
5,4	PRDX3_MOUSE	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mit	1
6,3	SODM_MOUSE	Superoxide dismutase [Mn], mit	1
2,9	MUCM_MOUSE	Ig mu chain C region membrane-bound form	1
1,4	MYPC3_MOUSE	Myosin-binding protein C, cardiac-type	1
4,6	HCD2_MOUSE	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	1
2,7	VDAC2_MOUSE	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	1
5	CAH2_MOUSE	Carbonic anhydrase 2	1
5,5	NDUB6_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 6	1
2,2	SUCB1_MOUSE	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mit	1
9,7	H4_MOUSE	Histone H4	1
2,6	HS90B_MOUSE	Heat shock protein HSP 90-beta	1
1,3	PYGM_MOUSE	Glycogen phosphorylase, muscle form	1

Tabla 12. Proteínas identificadas por LC-MALDI en el ventrículo izquierdo cardíaco del ratón número 2 wt para TPC1. Se representa el porcentaje de cobertura, el código UniProt, el nombre y el número de péptidos encontrados para cada proteína. mit, mitocondrial.

TPCN1 M3 wt			
% Cob (95)	Código Uniprot	Nombre	Péptidos (95%)
44,3	ACTC_MOUSE	Actin, alpha cardiac muscle 1	21
38,2	ATPB_MOUSE	ATP synthase subunit beta, mit	14
33,5	ATPA_MOUSE	ATP synthase subunit alpha, mit	13
19,2	ACTB_MOUSE	Actin, cytoplasmic 1	12
16,5	ECHA_MOUSE	Trifunctional enzyme subunit alpha, mit	11
14	ACTN2_MOUSE	Alpha-actinin-2	10
16,1	ALBU_MOUSE	Serum albumin	10
11,8	PYGM_MOUSE	Glycogen phosphorylase, muscle form	8
14,9	DHSA_MOUSE	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mit	8
28,6	KCRS_MOUSE	Creatine kinase S-type, mitl	8
5,2	MYH6_MOUSE	Myosin-6	8
22,1	QCR1_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mit	6
11,8	ACON_MOUSE	Aconitate hydratase, mit	6
19,6	DESM_MOUSE	Desmin	5
16,2	CISY_MOUSE	Citrate synthase, mit	5
14,9	AATM_MOUSE	Aspartate aminotransferase, mit	5
16,8	QCR2_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mit	5
14,9	NDUA9_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mit	4
10,9	FUMH_MOUSE	Fumarate hydratase, mit	4
19,2	MDHM_MOUSE	Malate dehydrogenase, mit	4
13,9	ECHB_MOUSE	Trifunctional enzyme subunit beta, mit	4
15,2	KCRM_MOUSE	Creatine kinase M-type	4
20,4	THIM_MOUSE	3-ketoacyl-CoA thiolase, mit	4
10,8	ENOB_MOUSE	Beta-enolase	3
8,8	ACADM_MOUSE	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	3
24,6	TNNI3_MOUSE	Troponin I, cardiac muscle	3
19,2	ETFB_MOUSE	Electron transfer flavoprotein subunit beta	3
8,9	HEMO_MOUSE	Hemopexin	3
10,2	ACADS_MOUSE	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	3
4,2	PYGB_MOUSE	Glycogen phosphorylase, brain form	3
9,9	NDUS3_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mit	2
4,4	CMC1_MOUSE	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1	2
7,4	IDH3A_MOUSE	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mit	2
8	TBA4A_MOUSE	Tubulin alpha-4A chain	2
8,7	NDUAA_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mit	2
15	HBB2_MOUSE	Hemoglobin subunit beta-2	2
10	PHB2_MOUSE	Prohibitin-2	2
14,1	HBA_MOUSE	Hemoglobin subunit alpha	2
8,4	G3P_MOUSE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2
6,5	NDUV1_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mit	2
4,5	SUCB1_MOUSE	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mit	2
13,7	CRYAB_MOUSE	Alpha-crystallin B chain	2
6,3	PCCB_MOUSE	Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mit	2
5,1	IMMT_MOUSE	Isoform 5 of Mitochondrial inner membrane protein	2
9,2	LDB3_MOUSE	Isoform Cypher2c of LIM domain-binding protein 3	2
5,6	AATC_MOUSE	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	2
7,5	MDHC_MOUSE	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	2
6,9	LDHB_MOUSE	L-lactate dehydrogenase B chain	2
12	CY1_MOUSE	Cytochrome c1, heme protein, mit	2
9,4	IDH3G_MOUSE	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit gamma, mit	2
13,6	MYG_MOUSE	Myoglobin	2
2,2	TBB3_MOUSE	Tubulin beta-3 chain	2
2,7	SCOT1_MOUSE	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1, mit	2
4,4	CMC2_MOUSE	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2	2
5,3	ACSL1_MOUSE	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1	2

(Continúa en la página siguiente)

TPCN1 M3 wt			
% Cob (95)	Código Uniprot	Nombre	Péptidos(95%)
5,1	KPYM_MOUSE	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	2
8	TBA3_MOUSE	Tubulin alpha-3 chain	2
8,1	ETFA_MOUSE	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mit	1
3,8	ACADV_MOUSE	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	1
8	NDUBA_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	1
2,9	ACOT2_MOUSE	Acyl-coenzyme A thioesterase 2, mit	1
3,5	NDRG2_MOUSE	Protein NDRG2	1
1,3	CO3_MOUSE	Complement C3	1
4,5	ODPB_MOUSE	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mit	1
1,5	SRCA_MOUSE	Sarcalumenin	1
3,7	VDAC1_MOUSE	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	1
6,2	HIBCH_MOUSE	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mit	1
3,1	TRI72_MOUSE	Tripartite motif-containing protein 72	1
6,1	ECH1_MOUSE	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mit	1
15,9	QCR8_MOUSE	Cytochrome b-c 1 complex subunit 8	1
1,7	MCCA_MOUSE	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, mit	1
14,6	NDUA4_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4	1
4,4	PHB_MOUSE	Prohibitin	1
2,4	CACP_MOUSE	Carnitine O-acetyltransferase	1
2,6	HS90B_MOUSE	Heat shock protein HSP 90-beta	1
7,2	KAD1_MOUSE	Adenylate kinase isoenzyme 1	1
9	NDUAD_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13	1
3,1	ETFD_MOUSE	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mit	1
3,5	HCDH_MOUSE	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mit	1
4,8	A1AT5_MOUSE	Alpha-1-antitrypsin 1-5	1
3,9	SGCA_MOUSE	Alpha-sarcoglycan	1
3	ADK_MOUSE	Adenosine kinase	1
7,1	COX41_MOUSE	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mit	1
8,3	D3D2_MOUSE	3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mit	1
4,9	MYOZ2_MOUSE	Myozenin-2	1
1,5	SYIM_MOUSE	Isoleucyl-tRNA synthetase, mit	1
2,8	ODP2_MOUSE	Dihydropolyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mit	1
8	HSPB6_MOUSE	Heat shock protein beta-6	1
2,6	EHD4_MOUSE	EH domain-containing protein 4	1
1,4	LONM_MOUSE	Lon protease homolog, mit	1
3,1	EHD2_MOUSE	EH domain-containing protein 2	1
4,7	AT5F1_MOUSE	ATP synthase subunit b, mit	1
3,1	THIL_MOUSE	Acetyl-CoA acetyltransferase, mit	1
6,3	SODM_MOUSE	Superoxide dismutase [Mn], mit	1
3	VIME_MOUSE	Vimentin	1
14,3	NDUA1_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 1	1
5,3	TNNT2_MOUSE	Troponin T, cardiac muscle	1
3	CH60_MOUSE	60 kDa heat shock protein, mit	1
6,7	COQ9_MOUSE	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mit	1
3,5	EFTU_MOUSE	Elongation factor Tu, mit	1
2,7	ALDH2_MOUSE	Aldehyde dehydrogenase, mit	1
3,3	SPA3N_MOUSE	Serine protease inhibitor A3N	1
1,9	NDUS2_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mit	1

Tabla 13. Proteínas identificadas por LC-MALDI en el ventrículo izquierdo cardíaco del ratón número 3 wt para TPC1. Se representa el porcentaje de cobertura, el código UniProt, el nombre y el número de péptidos encontrados para cada proteína. mit, mitocondrial.

TPCN1 M1 KO			
% Cob (95)	Código Uniprot	Nombre	Péptidos (95%)
13,8	MYH6_MOUSE	Myosin-6	23
45,9	ATPA_MOUSE	ATP synthase subunit alpha, mit	23
32,9	ATPB_MOUSE	ATP synthase subunit beta, mit	15
22,7	ECHA_MOUSE	Trifunctional enzyme subunit alpha, mit	14
43,2	ACTC_MOUSE	Actin, alpha cardiac muscle 1	16
79,6	HBB1_MOUSE	Hemoglobin subunit beta-1	10
17,6	ALBU_MOUSE	Serum albumin	12
22,9	KCRS_MOUSE	Creatine kinase S-type, mit	9
29,6	MDHM_MOUSE	Malate dehydrogenase, mit	7
9,7	ACTN2_MOUSE	Alpha-actinin-2	7
22,4	DESM_MOUSE	Desmin	6
24,5	ADT1_MOUSE	ADP/ATP translocase 1	7
14	CISY_MOUSE	Citrate synthase, mit	5
20,7	NDUA9_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mit	5
9,5	ACON_MOUSE	Aconitate hydratase, mit	4
10,8	ENOB_MOUSE	Beta-enolase	4
12,9	QCR1_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mit	5
15,1	THIM_MOUSE	3-ketoacyl-CoA thiolase, mit	4
13,1	ACADM_MOUSE	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	4
33,1	FABPH_MOUSE	Fatty acid-binding protein, heart	5
15,6	TBA4A_MOUSE	Tubulin alpha-4A chain	4
24,3	ETFA_MOUSE	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mit	4
12,6	KCRM_MOUSE	Creatine kinase M-type	4
52,8	HBA_MOUSE	Hemoglobin subunit alpha	5
12,2	IDHP_MOUSE	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mit	5
6,3	FUMH_MOUSE	Fumarate hydratase, mit	3
13,5	QCR2_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mit	4
4,3	PYGM_MOUSE	Glycogen phosphorylase, muscle form	3
16,5	ETFB_MOUSE	Electron transfer flavoprotein subunit beta	3
7,7	NDUS1_MOUSE	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mit	3
12,9	G3P_MOUSE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	3
7,9	TBB2C_MOUSE	Tubulin beta-2C chain	3
15,2	MYL3_MOUSE	Myosin light chain 3	3
3,2	ACADV_MOUSE	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	2
8,7	NDUS3_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mit	3
5,4	NDUV1_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mit	2
8,7	ATPG_MOUSE	ATP synthase subunit gamma, mit	3
9,1	ECHB_MOUSE	Trifunctional enzyme subunit beta, mit	3
4	IMMT_MOUSE	Mitochondrial inner membrane protein	2
8,7	NDUAA_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mit	2
5,2	SUCB1_MOUSE	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mit	2
17,8	ATPO_MOUSE	ATP synthase subunit O, mit	2
6,7	SCOT1_MOUSE	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1, mit	2
6,3	TNNT2_MOUSE	Troponin T, cardiac muscle	2
7,4	IDH3A_MOUSE	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mit	2
7,4	VDAC1_MOUSE	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	2
10,2	TPM1_MOUSE	Tropomyosin alpha-1 chain	2
4,3	CMC2_MOUSE	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2	2
12,3	CY1_MOUSE	Cytochrome c1, heme protein, mit	2
9,4	NDUS8_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mit	2
8,9	ODPB_MOUSE	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mit	2
12,1	ACADL_MOUSE	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	3
10,9	AATM_MOUSE	Aspartate aminotransferase, mit	3

(Continúa en la página siguiente)

TPCN1 M1 KO			
% Cob (95)	Código Uniprot	Nombre	Péptidos (95%)
4,1	DHSA_MOUSE	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mit	3
4,2	LDHB_MOUSE	L-lactate dehydrogenase B chain	1
11,9	ECH1_MOUSE	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mit	2
4,8	PGK1_MOUSE	Phosphoglycerate kinase 1	2
2,6	KPYM_MOUSE	Isoform M1 of Pyruvate kinase isozymes M1/M2	1
5	NDUS2_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mit	1
8	NDUBA_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	1
3	MDHC_MOUSE	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	1
5,8	VIME_MOUSE	Vimentin	2
4,5	SPA3M_MOUSE	Serine protease inhibitor A3M	1
3,1	PCCB_MOUSE	Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mit	1
7,1	COX41_MOUSE	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mit	3
1,3	CO3_MOUSE	Complement C3	1
1,5	SRCA_MOUSE	Sarcocalumenin	1
3,7	DLDH_MOUSE	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mit	1
2	EHD2_MOUSE	EH domain-containing protein 2	1
3,2	ACADS_MOUSE	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	1
4,8	A1AT5_MOUSE	Alpha-1-antitrypsin 1-5	1
2,6	ACSL1_MOUSE	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1	1
6,3	SODM_MOUSE	Superoxide dismutase [Mn], mit	1
7,2	KAD1_MOUSE	Adenylate kinase isoenzyme 1	1
2,9	ACOT2_MOUSE	Acyl-coenzyme A thioesterase 2, mit	1
3,5	NDRG2_MOUSE	Protein NDRG2	1
4,9	MYOZ2_MOUSE	Myozenin-2	1
3,1	THIL_MOUSE	Acetyl-CoA acetyltransferase, mit	1
3,3	FIBB_MOUSE	Fibrinogen beta chain	1
1,4	LONM_MOUSE	Lon protease homolog, mit	1
3,5	EFTU_MOUSE	Elongation factor Tu, mit	1
3,5	HCDH_MOUSE	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mit	1
4,4	PHB_MOUSE	Prohibitin	1
2,7	ALDH2_MOUSE	Aldehyde dehydrogenase, mit	1
4,3	PHB2_MOUSE	Prohibitin-2	1
7,6	PRDX6_MOUSE	Peroxiredoxin-6	1
14,6	NDUA4_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4	1
5,7	APOA1_MOUSE	Apolipoprotein A-I	1
5,2	NDUV2_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mit	1
6,3	CRYAB_MOUSE	Alpha-crystallin B chain	1
11,8	MYH7_MOUSE	Myosin-7	17
2,8	ODP2_MOUSE	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mit	1
13,3	ACTG_MOUSE	Actin, cytoplasmic 2	6
1,3	PYGB_MOUSE	Glycogen phosphorylase, brain form	1

Tabla 14. Proteínas identificadas por LC-MALDI en el ventrículo izquierdo cardíaco del ratón número 1 KO para TPC1. Se representa el porcentaje de cobertura, el código UniProt, el nombre y el número de péptidos encontrados para cada proteína. mit, mitocondrial.

TPCN1 M2 KO			
% Cob (95)	Código Uniprot	Nombre	Péptidos (95%)
52,4	ATPB_MOUSE	ATP synthase subunit beta, mit	25
44,1	ATPA_MOUSE	ATP synthase subunit alpha, mit	25
12,7	MYH6_MOUSE	Myosin-6	22
28,4	ECHA_MOUSE	Trifunctional enzyme subunit alpha, mit	19
39,8	ACTC_MOUSE	Actin, alpha cardiac muscle 1	18
9,9	MYH7_MOUSE	Myosin-7	17
19,6	ALBU_MOUSE	Serum albumin	12
32,5	MDHM_MOUSE	Malate dehydrogenase, mit	9
18,8	IDHP_MOUSE	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mit	9
18,4	KCRS_MOUSE	Creatine kinase S-type, mit	7
17,7	QCR1_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mit	7
17,2	QCR2_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mit	7
21,8	DESM_MOUSE	Desmin	6
16,4	FUMH_MOUSE	Fumarate hydratase, mit	6
8,9	ACTN2_MOUSE	Alpha-actinin-2	6
20,9	THIM_MOUSE	3-ketoacyl-CoA thiolase, mit	6
16,3	ACTG_MOUSE	Actin, cytoplasmic 2	6
11,4	ACON_MOUSE	Aconitate hydratase, mit	5
20,7	NDUA9_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mit	5
19,5	G3P_MOUSE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	5
13,4	CISY_MOUSE	Citrate synthase, mit	4
16,8	ADT1_MOUSE	ADP/ATP translocase 1	4
9,5	ACADM_MOUSE	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	4
12,6	KCRM_MOUSE	Creatine kinase M-type	4
7,6	NDUS1_MOUSE	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mit	4
7	TBB2C_MOUSE	Tubulin beta-2C chain	4
10,7	IDH3A_MOUSE	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mit	4
11,4	MDHC_MOUSE	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	4
13,5	AATM_MOUSE	Aspartate aminotransferase, mit	4
15,4	ALDOA_MOUSE	Fructose-bisphosphate aldolase A	4
6,7	SCOT1_MOUSE	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1, mit	4
9,3	ECHB_MOUSE	Trifunctional enzyme subunit beta, mit	3
8,7	KPYM_MOUSE	Isoform M1 of Pyruvate kinase isozymes M1/M2	3
4,3	PYGM_MOUSE	Glycogen phosphorylase, muscle form	3
34,5	HBA_MOUSE	Hemoglobin subunit alpha	3
13,9	VDAC1_MOUSE	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	3
27,9	HBB1_MOUSE	Hemoglobin subunit beta-1	3
6,1	ACADV_MOUSE	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	3
8,7	ATPG_MOUSE	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	3
8,7	NDUS3_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mit	3
4,9	SUCA_MOUSE	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit alpha, mit	3
6,3	ACADL_MOUSE	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	3
3	ODO1_MOUSE	2-oxoglutarate dehydrogenase, mit	2
8,7	NDUAA_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mit	2
9,9	AATC_MOUSE	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	2
9,4	THIL_MOUSE	Acetyl-CoA acetyltransferase, mit	2
4	IMMT_MOUSE	Mitochondrial inner membrane protein	2
15,6	TNNI3_MOUSE	Troponin I, cardiac muscle	2
13,2	ETFA_MOUSE	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mit	2
7,6	ENOB_MOUSE	Beta-enolase	2
4,3	CMC2_MOUSE	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2	2
4,1	LDB3_MOUSE	LIM domain-binding protein 3	2

(Continúa en la página siguiente)

TPCN1 M2 KO			
% Cob (95)	Código Uniprot	Nombre	Péptidos (95%)
12,9	ETFB_MOUSE	Electron transfer flavoprotein subunit beta	2
14,2	NDUBA_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	2
6,3	TNNT2_MOUSE	Troponin T, cardiac muscle	2
16,2	MYL3_MOUSE	Myosin light chain 3	2
9,8	MYOZ2_MOUSE	Myozenin-2	2
8,9	ODPB_MOUSE	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mit	2
9,4	NDUS8_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mit	2
8	TBA4A_MOUSE	Tubulin alpha-4A chain	2
5,4	NDUV1_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mit	2
4,3	GRP75_MOUSE	Stress-70 protein, mit	2
3	PYGB_MOUSE	Glycogen phosphorylase, brain form	2
11,9	ECH1_MOUSE	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mit	2
6,9	LDHB_MOUSE	L-lactate dehydrogenase B chain	2
7,7	EFTU_MOUSE	Elongation factor Tu, mit	2
4,8	PGK1_MOUSE	Phosphoglycerate kinase 1	2
4,1	DHSA_MOUSE	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mit	2
17,3	FABPH_MOUSE	Fatty acid-binding protein, heart	2
8,1	ENOA_MOUSE	Alpha-enolase	2
2,4	CACP_MOUSE	Carnitine O-acetyltransferase	1
1,4	MYPC3_MOUSE	Myosin-binding protein C, cardiac-type	1
1,4	LONM_MOUSE	Lon protease homolog, mit	1
2,4	SUCB1_MOUSE	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mit	1
2,9	ACOT2_MOUSE	Acyl-coenzyme A thioesterase 2, mit	1
7,4	CY1_MOUSE	Cytochrome c1, heme protein, mit	1
4,6	PTRF_MOUSE	Polymerase I and transcript release factor	1
4,3	PHB2_MOUSE	Prohibitin-2	1
3,7	DLDH_MOUSE	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mit	1
3,1	PCCB_MOUSE	Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mit	1
2,8	ODP2_MOUSE	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mit	1
3,5	HCDH_MOUSE	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mit	1
3,6	CD36_MOUSE	Platelet glycoprotein 4	1
3,2	ACADS_MOUSE	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	1
4,4	PHB_MOUSE	Prohibitin	1
2,6	CPT2_MOUSE	Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mit	1
2,8	ODPA_MOUSE	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mit	1
5,4	PRDX3_MOUSE	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mit	1
7,1	COX41_MOUSE	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mit	1
6,3	SODM_MOUSE	Superoxide dismutase [Mn], mit	1
1,3	CO3_MOUSE	Complement C3	1
1,5	SRCA_MOUSE	Sarcalumenin	1
2,6	HS90B_MOUSE	Heat shock protein HSP 90-beta	1
2,4	MMSA_MOUSE	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mit	1
1	KCMA1_MOUSE	Calcium-activated potassium channel subunit alpha-1	1
2,7	ALDH2_MOUSE	Aldehyde dehydrogenase, mit	1
3,5	NDRG2_MOUSE	Protein NDRG2	1
2,6	ACSL1_MOUSE	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1	1
8,9	ATPO_MOUSE	ATP synthase subunit O, mit	1
6,2	HIBCH_MOUSE	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mit	1
3,2	M2OM_MOUSE	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	1
4,7	TBA1C_MOUSE	Tubulin alpha-1C chain	1
3,5	NDUS2_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mit	1
1,8	CMC1_MOUSE	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1	1

Tabla 15. Proteínas identificadas por LC-MALDI en el ventrículo izquierdo cardíaco del ratón número 2 KO para TPC1. Se representa el porcentaje de cobertura, el código UniProt, el nombre y el número de péptidos encontrados para cada proteína. mit, mitocondrial.

TPCN1 M3 KO			
% Cob (95)	Código Uniprot	Nombre	Péptidos (95%)
47,8	ACTC_MOUSE	Actin, alpha cardiac muscle 1	21
46,1	ATPB_MOUSE	ATP synthase subunit beta, mit	18
38,3	ATPA_MOUSE	ATP synthase subunit alpha, mit	18
8,8	MYH6_MOUSE	Myosin-6	15
22,4	ECHA_MOUSE	Trifunctional enzyme subunit alpha, mit	14
12,4	ACTN2_MOUSE	Alpha-actinin-2	12
35,1	KCRS_MOUSE	Creatine kinase S-type, mit	12
18,3	ALBU_MOUSE	Serum albumin	11
20,6	DHSA_MOUSE	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mit	11
16,4	PYGM_MOUSE	Glycogen phosphorylase, muscle form	11
25,8	QCR1_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mit	10
19,6	ACON_MOUSE	Aconitate hydratase, mit	10
7,5	MYH7_MOUSE	Myosin-7	10
19,2	ACTG_MOUSE	Actin, cytoplasmic 2	10
16,8	IDHP_MOUSE	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mit	9
38,4	NDUS3_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mit	8
24,9	NDUA9_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mit	7
20,9	CISY_MOUSE	Citrate synthase, mit	7
9	PYGB_MOUSE	Glycogen phosphorylase, brain form	7
26,6	MDHM_MOUSE	Malate dehydrogenase, mit	6
7,9	ODO1_MOUSE	2-oxoglutarate dehydrogenase, mit	6
14,6	ACADV_MOUSE	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	5
19	DESM_MOUSE	Desmin	5
11,4	NDU1_MOUSE	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mit	5
18,1	ECHB_MOUSE	Trifunctional enzyme subunit beta, mit	5
31,3	TNNI3_MOUSE	Troponin I, cardiac muscle	5
17,4	AATM_MOUSE	Aspartate aminotransferase, mit	5
18,3	QCR2_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mit	5
15,7	AATC_MOUSE	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	4
12,1	THIM_MOUSE	3-ketoacyl-CoA thiolase, mit	4
8,7	KPYM_MOUSE	Isoform M1 of Pyruvate kinase isozymes M1/M2	4
24,6	ETFA_MOUSE	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mit	4
9	TBB2A_MOUSE	Tubulin beta-2A chain	4
8,8	ACADM_MOUSE	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	3
13,9	VDAC1_MOUSE	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	3
19,2	ETFB_MOUSE	Electron transfer flavoprotein subunit beta	3
14,7	PHB2_MOUSE	Prohibitin-2	3
10,8	ENOB_MOUSE	Beta-enolase	3
15,8	NDUAA_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mit	3
14,7	MYL3_MOUSE	Myosin light chain 3	3
10,2	ACADS_MOUSE	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	3
29,9	HBB2_MOUSE	Hemoglobin subunit beta-2	3
11,4	G3P_MOUSE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	3
6,7	SCOT1_MOUSE	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1, mit	3
8,3	FUMH_MOUSE	Fumarate hydratase, mit	3
8	TBA1C_MOUSE	Tubulin alpha-1C chain	2
6	DH3A_MOUSE	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mit	2
4,3	CMC2_MOUSE	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2	2
7,9	ACOT2_MOUSE	Acyl-coenzyme A thioesterase 2, mit	2
2,3	LONM_MOUSE	Lon protease homolog, mit	2
4,5	SUCB1_MOUSE	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mit	2

(Continúa en la página siguiente)

TPCN1 M3 KO			
% Cob (95)	Código Uniprot	Nombre	Péptidos (95%)
5,7	TRI72_MOUSE	Tripartite motif-containing protein 72	2
6,3	ACADL_MOUSE	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	2
14,2	NDUBA_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	2
5,4	NDUV1_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mit	2
12,3	CY1_MOUSE	Cytochrome c1, heme protein, mit	2
6,3	PCCB_MOUSE	Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mit	2
14,1	HBA_MOUSE	Hemoglobin subunit alpha	2
9,2	LDB3_MOUSE	Isoform Cypher2c of LIM domain-binding protein 3	2
3,3	IMMT_MOUSE	Isoform 5 of Mitochondrial inner membrane protein	2
22,8	HSPB6_MOUSE	Heat shock protein beta-6	2
4,4	CMC1_MOUSE	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1	2
7,1	COX41_MOUSE	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mit	2
2,6	ODO2_MOUSE	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mit	2
4,5	ODPB_MOUSE	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mit	1
2,1	SAM50_MOUSE	Sorting and assembly machinery component 50 homolog	1
5	NDUS2_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mito	1
15,6	NDUB9_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 9	1
1,5	SRCA_MOUSE	Sarcalumenin	1
1,3	MYPC3_MOUSE	Myosin-binding protein C, cardiac-type	1
3,5	NDRG2_MOUSE	Protein NDRG2	1
2,6	EHD4_MOUSE	EH domain-containing protein 4	1
3,1	THIL_MOUSE	Acetyl-CoA acetyltransferase, mit	1
6,2	HIBCH_MOUSE	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mit	1
3,8	RS4X_MOUSE	40S ribosomal protein S4, X isoform	1
2,2	DHE3_MOUSE	Glutamate dehydrogenase 1, mit	1
8,9	ATPO_MOUSE	ATP synthase subunit O, mit	1
2,6	PGM5_MOUSE	Phosphoglucomutase-like protein 5	1
2,7	VDAC2_MOUSE	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	1
2,4	CACP_MOUSE	Carnitine O-acetyltransferase	1
3,3	DECR_MOUSE	2,4-dienoyl-CoA reductase, mit	1
2	TRFE_MOUSE	Serotransferrin	1
3,1	ETFD_MOUSE	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mit	1
2,8	ODP2_MOUSE	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mit	1
3,9	SGCA_MOUSE	Alpha-sarcoglycan	1
4,4	PHB_MOUSE	Prohibitin	1
5,3	TNNT2_MOUSE	Troponin T, cardiac muscle	1
2,6	HS90B_MOUSE	Heat shock protein HSP 90-beta	1
6,1	ECH1_MOUSE	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mit	1
9	NDUAD_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13	1
6,7	COQ9_MOUSE	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mit	1
3,2	BDH_MOUSE	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mit	1
14,6	NDUA4_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4	1
3,5	HCDH_MOUSE	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mit	1
9,7	H4_MOUSE	Histone H4	1
2,6	CPT2_MOUSE	Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mit	1
3	MDHC_MOUSE	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	1
6,3	SODM_MOUSE	Superoxide dismutase [Mn], mit	1
9,7	MYG_MOUSE	Myoglobin	1
0,8	ACD10_MOUSE	Acyl-CoA dehydrogenase family member 10	1
2,2	CPT1B_MOUSE	Carnitine O-palmitoyltransferase 1, muscle isoform	1
7,1	PGAM2_MOUSE	Phosphoglycerate mutase 2	1
4,2	NDUS8_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mit	1
2,6	ACSL1_MOUSE	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1	1
1,7	HEMO_MOUSE	Hemopexin	1
2,3	PGM1_MOUSE	Phosphoglucomutase-1	1
4,1	ENOA_MOUSE	Alpha-enolase	1

Tabla 16. Proteínas identificadas por LC-MALDI en el ventrículo izquierdo cardíaco del ratón número 3 KO para TPC1. Se representa el porcentaje de cobertura, el código UniProt, el nombre y el número de péptidos encontrados para cada proteína. mit, mitocondrial.

TPCN1/2 M 1 wt			
% Cob (95)	Código Uniprot	Nombre	Péptidos (95%)
20,1	MYH6_MOUSE	Myosin-6	38
16,2	MYH7_MOUSE	Myosin-7	29
50,1	ATPB_MOUSE	ATP synthase subunit beta, mit	23
53,6	ACTC_MOUSE	Actin, alpha cardiac muscle 1	23
36,7	ATPA_MOUSE	ATP synthase subunit alpha, mit	21
21,9	ECHA_MOUSE	Trifunctional enzyme subunit alpha, mit	13
16,2	ACTN2_MOUSE	Alpha-actinin-2	12
29,9	DESM_MOUSE	Desmin	11
35,5	MDHM_MOUSE	Malate dehydrogenase, mit	10
20,4	ALBU_MOUSE	Serum albumin	10
22,4	KCRS_MOUSE	Creatine kinase S-type, mit	9
15,3	ACON_MOUSE	Aconitate hydratase, mit	8
31,5	ADT1_MOUSE	ADP/ATP translocase 1	8
18,6	ACADV_MOUSE	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	7
20,7	ENOB_MOUSE	Beta-enolase	6
14,6	QCR1_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mit	6
8	ODO1_MOUSE	2-oxoglutarate dehydrogenase, mit	6
13,8	FUMH_MOUSE	Fumarate hydratase, mit	5
15,6	THIM_MOUSE	3-ketoacyl-CoA thiolase, mit	5
6,1	PYGB_MOUSE	Glycogen phosphorylase, brain form	4
25	MYL3_MOUSE	Myosin light chain 3	4
11,6	ACADL_MOUSE	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	4
7,4	TBB2C_MOUSE	Tubulin beta-2C chain	4
11,1	LDHB_MOUSE	L-lactate dehydrogenase B chain	4
17,4	MYOZ2_MOUSE	Myozenin-2	3
10,7	ECHB_MOUSE	Trifunctional enzyme subunit beta, mit	3
13,1	AATC_MOUSE	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	3
7,3	NDUS1_MOUSE	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mit	3
23,2	TNNI3_MOUSE	Troponin I, cardiac muscle	3
7,5	MDHC_MOUSE	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	3
13	NDUA9_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mit	3
13,9	VDAC1_MOUSE	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	3
8,7	ATPG_MOUSE	ATP synthase subunit gamma, mit	3
9,2	KCRM_MOUSE	Creatine kinase M-type	3
8,8	ACADM_MOUSE	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	3
6,9	CMC1_MOUSE	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1	3
8,7	NDUS3_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mit	3
4,3	PYGM_MOUSE	Glycogen phosphorylase, muscle form	3
19,2	ETFA_MOUSE	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mit	3
8,3	KPYM_MOUSE	Isoform M1 of Pyruvate kinase isozymes M1/M2	3
25,4	HBA_MOUSE	Hemoglobin subunit alpha	3
6,2	IDHP_MOUSE	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mit	3
10,2	QCR2_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mit	3
5,4	SUCB1_MOUSE	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mit	3
10,7	IDH3A_MOUSE	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mit	3
6,5	AATM_MOUSE	Aspartate aminotransferase, mit	3
5,8	VIME_MOUSE	Vimentin	3
14,1	ENOA_MOUSE	Alpha-enolase	3
8	TBA4A_MOUSE	Tubulin alpha-4A chain	2
6	CISY_MOUSE	Citrate synthase, mit	2
4	IMMT_MOUSE	Mitochondrial inner membrane protein	2
8,9	ODPB_MOUSE	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mit	2
3,4	SRCA_MOUSE	Sarcalumenin	2
4,1	LDB3_MOUSE	LIM domain-binding protein 3	2
11,5	ALDOA_MOUSE	Fructose-bisphosphate aldolase A	2
22,1	MYG_MOUSE	Myoglobin	2
15	HBB2_MOUSE	Hemoglobin subunit beta-2	2

(Continúa en la página siguiente)

TPC1/2 M 1 wt			
% Cob (95)	Código Uniprot	Nombre	Péptidos (95%)
6,9	SCOT1_MOUSE	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1, mit	2
8,7	NDUAA_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mit	2
12,3	CY1_MOUSE	Cytochrome c1, heme protein, mit	2
17,3	FABPH_MOUSE	Fatty acid-binding protein, heart	2
12,9	ETFB_MOUSE	Electron transfer flavoprotein subunit beta	2
4,1	DHSA_MOUSE	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mit	2
7,2	G3P_MOUSE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2
9,2	SUCA_MOUSE	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit alpha, mit	2
4,3	CMC2_MOUSE	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2	2
8	TBA1C_MOUSE	Tubulin alpha-1C chain	2
3,2	NDUV1_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mit	1
5	NDUS2_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mit	1
3,2	MMSA_MOUSE	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mit	1
4,3	DHSB_MOUSE	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mit	1
2,9	MOES_MOUSE	Moesin	1
3,1	TRI72_MOUSE	Tripartite motif-containing protein 72	1
4,6	A1AT4_MOUSE	Alpha-1-antitrypsin 1-4	1
5,6	TNNT2_MOUSE	Isoform A3B of Troponin T, cardiac muscle	1
4,3	PGK1_MOUSE	Phosphoglycerate kinase 1	1
4,5	SPA3K_MOUSE	Serine protease inhibitor A3K	1
1,2	MYPC3_MOUSE	Myosin-binding protein C, cardiac-type	1
1,7	HEMO_MOUSE	Hemopexin	1
5,7	THIL_MOUSE	Acetyl-CoA acetyltransferase, mit	1
4,2	NDUS8_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mit	1
1,4	LONM_MOUSE	Lon protease homolog, mit	1
2,1	SAM50_MOUSE	Sorting and assembly machinery component 50 homolog	1
3,5	HCDH_MOUSE	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mit	1
3,6	CD36_MOUSE	Platelet glycoprotein 4	1
3,2	ACADS_MOUSE	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	1
4,4	PHB_MOUSE	Prohibitin	1
3	CH60_MOUSE	60 kDa heat shock protein, mit	1
2,6	ACSL1_MOUSE	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 1	1
6,3	SODM_MOUSE	Superoxide dismutase [Mn], mit	1
4,3	PHB2_MOUSE	Prohibitin-2	1
2,9	ACOT2_MOUSE	Acyl-coenzyme A thioesterase 2, mit	1
3,5	NDRG2_MOUSE	Protein NDRG2	1
3,1	PCCB_MOUSE	Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mit	1
2,3	ARHL1_MOUSE	[Protein ADP-ribosylarginine] hydrolase-like protein 1	1
14,9	CRYAB_MOUSE	Alpha-crystallin B chain	1
5,4	PRDX3_MOUSE	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mit	1
7,1	COX41_MOUSE	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mit	1
8,9	ATPO_MOUSE	ATP synthase subunit O, mit	1
2,6	EHD4_MOUSE	EH domain-containing protein 4	1
9,7	H4_MOUSE	Histone H4	1
4,2	DECR_MOUSE	2,4-dienoyl-CoA reductase, mit	1
1,5	HSP7C_MOUSE	Heat shock cognate 71 kDa protein	1
3,2	M20M_MOUSE	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	1
3,1	ETFD_MOUSE	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mit	1
0,7	DOC11_MOUSE	Dedicator of cytokinesis protein 11	1
4,3	GDIB_MOUSE	Rab GDP dissociation inhibitor beta	1
3,6	PGES2_MOUSE	Prostaglandin E synthase 2	1
6,2	HIBCH_MOUSE	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mit	1
4	NIT2_MOUSE	Omega-amidase NIT2	1
0,9	RBM20_MOUSE	Probable RNA-binding protein 20	1
10	HCD2_MOUSE	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	1

Tabla 17. Proteínas identificadas por LC-MALDI en el ventrículo izquierdo cardíaco del ratón número 1 wt para TPC1/2. Se representa el porcentaje de cobertura, el código UniProt, el nombre y el número de péptidos encontrados para cada proteína. mit, mitocondrial.

TPCN1/2 M2 wt			
% Cob (95)	Código Uniprot	Nombre	Péptidos (95%)
28,5	MYH6_MOUSE	Myosin-6	62
21,9	MYH7_MOUSE	Myosin-7	46
57	ACTC_MOUSE	Actin, alpha cardiac muscle 1	27
42,3	ATPB_MOUSE	ATP synthase subunit beta, mit	20
35,6	ATPA_MOUSE	ATP synthase subunit alpha, mito	20
25,5	ACON_MOUSE	Aconitate hydratase, mito	15
47	ADT1_MOUSE	ADP/ATP translocase 1	15
18	ECHA_MOUSE	Trifunctional enzyme subunit alpha, mi	12
19,4	ALBU_MOUSE	Serum albumin	9
17,9	IDHP_MOUSE	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mit	9
11	ACTN2_MOUSE	Alpha-actinin-2	8
25,2	DESM_MOUSE	Desmin	8
22,9	KCRS_MOUSE	Creatine kinase S-type, mit	7
30,6	G3P_MOUSE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	7
19,2	ACTG_MOUSE	Actin, cytoplasmic 2	7
28,7	MDHM_MOUSE	Malate dehydrogenase, mit	6
17,9	QCR1_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mit	6
7,5	ODO1_MOUSE	2-oxoglutarate dehydrogenase, mit	5
6,3	MYPC3_MOUSE	Myosin-binding protein C, cardiac-type	5
14,4	ACADL_MOUSE	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	5
25	MYL3_MOUSE	Myosin light chain 3	5
22,2	ADT2_MOUSE	ADP/ATP translocase 2	5
15,2	KCRM_MOUSE	Creatine kinase M-type	4
5,9	PYGM_MOUSE	Glycogen phosphorylase, muscle form	4
18,6	THIM_MOUSE	3-ketoacyl-CoA thiolase, mito	4
12	ACADV_MOUSE	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	4
17,4	MYOZ2_MOUSE	Myozenin-2	4
35,7	MYG_MOUSE	Myoglobin	4
23,4	ETFA_MOUSE	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mit	4
20,3	VDAC1_MOUSE	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	4
17,7	AATC_MOUSE	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	4
18,2	ENOB_MOUSE	Beta-enolase	4
33,5	ATP5H_MOUSE	ATP synthase subunit d, mit	4
13,4	ODPB_MOUSE	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mit	4
12,3	MDHC_MOUSE	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	4
35,5	MLRV_MOUSE	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	4
9,5	ECHB_MOUSE	Trifunctional enzyme subunit beta, mit	3
11,4	NDUA9_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mit	3
7	TBB2C_MOUSE	Tubulin beta-2C chain	3
12,3	IDH3A_MOUSE	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mit	3
15,7	ALDOA_MOUSE	Fructose-bisphosphate aldolase A	3
8,4	CISY_MOUSE	Citrate synthase, mit	3
25,9	HBB1_MOUSE	Hemoglobin subunit beta-1	3
13,7	NDUS3_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mit	3
10,8	DECR_MOUSE	2,4-dienoyl-CoA reductase, mit	3
12,7	PGK1_MOUSE	Phosphoglycerate kinase 1	3
9	SCOT_MOUSE	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1, mit	3
9,5	FUMH_MOUSE	Fumarate hydratase, mit	3
9,8	CY1_MOUSE	Cytochrome c1, heme protein, mit	3
14,1	ENOA_MOUSE	Alpha-enolase	3

(Continúa en la página siguiente)

TPCN1/2 M2 wt			
% Cob (95)	Código Uniprot	Nombre	Péptidos (95%)
5,7	KPYM_MOUSE	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	2
4	IMMT_MOUSE	Mitochondrial inner membrane protein	2
5,2	ACADM_MOUSE	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mi	2
5	ATPG_MOUSE	ATP synthase subunit gamma, mit	2
1,9	PYGB_MOUSE	Glycogen phosphorylase, brain form	2
3,9	TRFE_MOUSE	Serotransferrin	2
10	TNNT2_MOUSE	Troponin T, cardiac muscle	2
4,1	LDB3_MOUSE	LIM domain-binding protein 3	2
9,2	DHSB_MOUSE	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mit	2
5,4	NDUV1_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mit	2
4,4	NDUS1_MOUSE	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mit	2
2,8	AT2A2_MOUSE	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	2
6,5	CH60_MOUSE	60 kDa heat shock protein, mit	2
9,3	ODO2_MOUSE	Dihydropyridyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mit	2
10,2	A1AT5_MOUSE	Alpha-1-antitrypsin 1-5	2
15,6	TNNI3_MOUSE	Troponin I, cardiac muscle	2
6,5	CASQ2_MOUSE	Calsequestrin-2	2
4,9	CPT2_MOUSE	Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mit	2
5	GRP75_MOUSE	Stress-70 protein, mit	2
12,9	HSPB1_MOUSE	Heat shock protein beta-1	2
6,9	LDHB_MOUSE	L-lactate dehydrogenase B chain	2
5,8	AATM_MOUSE	Aspartate aminotransferase, mit	2
5,8	VIME_MOUSE	Vimentin	2
4,3	SUCA_MOUSE	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit alpha, mit	2
4	QCR2_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mit	2
7,1	COX41_MOUSE	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mit	2
2,2	HSP7C_MOUSE	Heat shock cognate 71 kDa protein	1
3,3	BA1C_MOUSE	Tubulin alpha-1C chain	1
1,7	MOES_MOUSE	Moesin	1
4,7	PGAM2_MOUSE	Phosphoglycerate mutase 2	1
4,5	SPA3M_MOUSE	Serine protease inhibitor A3M	1
2,1	DHSA_MOUSE	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mit	1
8	NDUBA_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	1
2,1	TERA_MOUSE	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	1
1,7	ACSL6_MOUSE	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 6	1
8,9	ATPO_MOUSE	ATP synthase subunit O, mit	1
1,4	LONM_MOUSE	Lon protease homolog, mit	1
2,8	ODP2_MOUSE	Dihydropyridyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mit	1
2,8	PGS2_MOUSE	Decorin	1
4,3	PHB2_MOUSE	Prohibitin-2	1
2,4	SUCB1_MOUSE	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mit	1
2,4	MMSA_MOUSE	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mit	1
8,2	ETFB_MOUSE	Electron transfer flavoprotein subunit beta	1
5,9	AT5F1_MOUSE	ATP synthase subunit b, mit	1
3,1	ETFD_MOUSE	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mit	1
1,7	HEMO_MOUSE	Hemopexin	1
5,8	BDH_MOUSE	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mit	1
3,5	HCDH_MOUSE	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mit	1
3,6	CD36_MOUSE	Platelet glycoprotein 4	1

(Continúa en la página siguiente)

TPCN1/2 M2 wt			
% Cob (95)	Código UniProt	Nombre	Péptidos (95%)
8,1	PRDX5_MOUSE	Peroxiredoxin-5, mit	1
5,4	RDX3_MOUSE	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mit	1
10,6	HBA_MOUSE	Hemoglobin subunit alpha	1
3,5	NDRG2_MOUSE	Protein NDRG2	1
8,1	NDUV2_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mit	1
9,8	ES1_MOUSE	ES1 protein homolog, mit	1
5,7	THIL_MOUSE	Acetyl-CoA acetyltransferase, mit	1
2,9	HIBCH_MOUSE	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mit	1
6,7	COQ9_MOUSE	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mit	1
7,2	ECHM_MOUSE	Enoyl-CoA hydratase, mit	1
4,2	EFTU_MOUSE	Elongation factor Tu, mit	1
14,6	NDUA4_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4	1
3,1	TRI72_MOUSE	Tripartite motif-containing protein 72	1
3,2	ACADS_MOUSE	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	1
5,3	APOA1_MOUSE	Apolipoprotein A-I	1
2,5	SMYD1_MOUSE	SET and MYND domain-containing protein 1	1
9,7	H4_MOUSE	Histone H4	1
2,8	ODPA_MOUSE	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mit	1
3,9	BASI_MOUSE	Basigin	1
6,3	SODM_MOUSE	Superoxide dismutase [Mn], mit	1
4,4	COX2_MOUSE	Cytochrome c oxidase subunit 2	1
6,1	ECH1_MOUSE	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mit	1
4,5	MPCP_MOUSE	Phosphate carrier protein, mit	1
4,3	GDIB_MOUSE	Rab GDP dissociation inhibitor beta	1
3,1	PCCB_MOUSE	Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mit	1
7,6	PRDX6_MOUSE	Peroxiredoxin-6	1
3,1	EHD2_MOUSE	EH domain-containing protein 2	1
0,8	ACD10_MOUSE	Acyl-CoA dehydrogenase family member 10	1
2,9	MUCM_MOUSE	Ig mu chain C region membrane-bound form	1
1,2	TGM2_MOUSE	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	1
4,6	HPT_MOUSE	Haptoglobin	1
6,2	NDUAA_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mit	1
0,7	B3A2_MOUSE	Isoform C2 of Anion exchange protein 2	1
4,2	NDUS8_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mit	1
2,5	CMC2_MOUSE	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2	1
1,6	COOA1_MOUSE	Collagen alpha-1(XIV) chain	1

Tabla 18. Proteínas identificadas por LC-MALDI en el ventrículo izquierdo cardíaco del ratón número 2 wt para TPC1/2. Se representa el porcentaje de cobertura, el código UniProt, el nombre y el número de péptidos encontrados para cada proteína. mit, mitocondrial.

TPCN1/2 M3 wt			
% Cob (95)	Código Uniprot	Nombre	Péptidos (95%)
44,3	ATPA_MOUSE	ATP synthase subunit alpha, mit	27
48,8	ACTC_MOUSE	Actin, alpha cardiac muscle 1	23
42,5	ATPB_MOUSE	ATP synthase subunit beta, mit	17
26,9	ACON_MOUSE	Aconitate hydratase, mit	15
7,1	MYH6_MOUSE	Myosin-6	13
14,9	ECHA_MOUSE	Trifunctional enzyme subunit alpha, mit	10
19,7	ALBU_MOUSE	Serum albumin	9
20,5	KCRS_MOUSE	Creatine kinase S-type, mit	7
18,5	QCRI_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mit	7
29,9	MDHM_MOUSE	Malate dehydrogenase, mit	7
25,5	DT1_MOUSE	ADP/ATP translocase 1	7
11,3	IDHP_MOUSE	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mit	7
8,5	ODO1_MOUSE	2-oxoglutarate dehydrogenase, mit	6
24	NDUS3_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mit	6
8,6	ACTN2_MOUSE	Alpha-actinin-2	6
14,1	DESM_MOUSE	Desmin	5
24,5	ALDOA_MOUSE	Fructose-bisphosphate aldolase A	5
13,2	NDUS1_MOUSE	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mit	5
11,7	ACADV_MOUSE	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	4
4,9	PYGM_MOUSE	Glycogen phosphorylase, muscle form	4
6,9	SRCA_MOUSE	Sarcalumenin	4
17,7	AATC_MOUSE	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	4
11,4	ACADM_MOUSE	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	4
12,1	ACADL_MOUSE	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	4
14,7	G3P_MOUSE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	3
10,9	TBA4A_MOUSE	Tubulin alpha-4A chain	3
18	ETFA_MOUSE	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mit	3
4,1	LDB3_MOUSE	LIM domain-binding protein 3	3
8,9	ODPB_MOUSE	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mit	3
10,9	TBA1B_MOUSE	Tubulin alpha-1B chain	3
5,3	IMMT_MOUSE	Mitochondrial inner membrane protein	2
4,6	CPT2_MOUSE	Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mit	2
6	IDH3A_MOUSE	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mit	2
8	NDUA9_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mit	2
5	HEMO_MOUSE	Hemopexin	2
5	CMC1_MOUSE	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1	2
5	CISY_MOUSE	Citrate synthase, mit	2
12,5	MYOZ2_MOUSE	Myozenin-2	2
8,2	QCR2_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mit	2
4,3	GRP75_MOUSE	Stress-70 protein, mit	2
5,2	TBB4_MOUSE	Tubulin beta-4 chain	2
5,7	PHB2_MOUSE	Prohibitin-2	2
5,7	DHSA_MOUSE	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mit	2
7,6	THIM_MOUSE	3-ketoacyl-CoA thiolase, mit	2
7,4	MYL3_MOUSE	Myosin light chain 3	2
12,9	ETFB_MOUSE	Electron transfer flavoprotein subunit beta	2
12,3	CY1_MOUSE	Cytochrome c1, heme protein, mit	2
9,4	IDH3G_MOUSE	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit gamma, mit	2
8,1	ENOA_MOUSE	Alpha-enolase	2
3,1	PYGB_MOUSE	Glycogen phosphorylase, brain form	2

(Continúa en la página siguiente)

TPC1/2 M3 wt			
% Cob (95)	Código UniProt	Nombre	Péptidos (95%)
3,4	KCRM_MOUSE	Creatine kinase M-type	1
4	SCOT1_MOUSE	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1, mit	1
3,4	ECHB_MOUSE	Trifunctional enzyme subunit beta, mit	1
2,6	KPYM_MOUSE	Isoform M1 of Pyruvate kinase isozymes M1/M2	1
4,2	EFTU_MOUSE	Elongation factor Tu, mit	1
3,6	MDHC_MOUSE	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	1
2,4	MMSA_MOUSE	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mit	1
5,9	AT5F1_MOUSE	ATP synthase subunit b, mit	1
2	TRFE_MOUSE	Serotransferrin	1
5,7	THIL_MOUSE	Acetyl-CoA acetyltransferase, mit	1
2,6	FUMH_MOUSE	Fumarate hydratase, mit	1
11,7	MYG_MOUSE	Myoglobin	1
8	NDUBA_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	1
7,2	ECHM_MOUSE	Enoyl-CoA hydratase, mit	1
3,5	HCDH_MOUSE	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mit	1
3,6	CD36_MOUSE	Platelet glycoprotein 4	1
4,5	SPA3M_MOUSE	Serine protease inhibitor A3M	1
6,3	SODM_MOUSE	Superoxide dismutase [Mn], mit	1
6,8	HBE_MOUSE	Hemoglobin subunit epsilon-Y2	1
3,5	NDRG2_MOUSE	Protein NDRG2	1
3,1	ETFD_MOUSE	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mit	1
2,8	ODP2_MOUSE	Dihydropyridyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mit	1
4,7	PGAM2_MOUSE	Phosphoglycerate mutase 2	1
3,1	PCCB_MOUSE	Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mit	1
2,6	ACS2L_MOUSE	Acetyl-coenzyme A synthetase 2-like, mit	1
2,4	CACP_MOUSE	Carnitine O-acetyltransferase	1
1,7	SBP2_MOUSE	Selenium-binding protein 2	1
5,5	NDUB6_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 6	1
4	IGG2B_MOUSE	Ig gamma-2B chain C region	1
2,9	MOES_MOUSE	Moesin	1
5,1	ACOT2_MOUSE	Acyl-coenzyme A thioesterase 2, mit	1
5,6	AATM_MOUSE	Aspartate aminotransferase, mit	1

Tabla 19. Proteínas identificadas por LC-MALDI en el ventrículo izquierdo cardíaco del ratón número 3 wt para TPC1/2. Se representa el porcentaje de cobertura, el código UniProt, el nombre y el número de péptidos encontrados para cada proteína. mit, mitocondrial.

TPCN1/2 M1 KO			
% Cob (95)	Código Uniprot	Nombre	Péptidos (95%)
26,8	MYH6_MOUSE	Myosin-6	52
20	MYH7_MOUSE	Myosin-7	38
50,9	ATPB_MOUSE	ATP synthase subunit beta, mit	29
56,8	ACTC_MOUSE	Actin, alpha cardiac muscle 1	28
34,9	ATPA_MOUSE	ATP synthase subunit alpha, mit	21
27,8	ECHA_MOUSE	Trifunctional enzyme subunit alpha, mit	14
23,2	ACON_MOUSE	Aconitate hydratase, mit	14
29,9	ADT1_MOUSE	ADP/ATP translocase 1	14
23,7	ACTG_MOUSE	Actin, cytoplasmic 2	13
19,1	ACTN2_MOUSE	Alpha-actinin-2	11
18,8	ALBU_MOUSE	Serum albumin	10
41,9	VDAC1_MOUSE	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	9
19,6	KCRS_MOUSE	Creatine kinase S-type, mit	8
61,9	HBB1_MOUSE	Hemoglobin subunit beta-1	8
19,6	HEMO_MOUSE	Hemopexin	8
47	MLRV_MOUSE	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	8
31,4	MDHM_MOUSE	Malate dehydrogenase, mit	7
15	IDHP_MOUSE	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mit	7
20,8	QCRI_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mit	7
6,3	MYPC3_MOUSE	Myosin-binding protein C, cardiac-type	6
26,7	THIM_MOUSE	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	6
21,8	DESM_MOUSE	Desmin	6
20	KCRM_MOUSE	Creatine kinase M-type	6
24,7	NDUS3_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mit	6
21,7	ECHB_MOUSE	Trifunctional enzyme subunit beta, mit	6
33,8	MYL3_MOUSE	Myosin light chain 3	6
12,1	HSP7C_MOUSE	Heat shock cognate 71 kDa protein	6
12,1	ACADL_MOUSE	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	6
7,2	ODO1_MOUSE	2-oxoglutarate dehydrogenase, mit	6
21,8	AATC_MOUSE	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	6
19,5	FIBG_MOUSE	Fibrinogen gamma chain	6
18,5	FUMH_MOUSE	Fumarate hydratase, mit	6
21,9	MDHC_MOUSE	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	6
19,7	ACADM_MOUSE	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	5
15,9	ACADV_MOUSE	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	5
7,7	AT2A2_MOUSE	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	5
27,9	G3P_MOUSE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	5
16	TBB2C_MOUSE	Tubulin beta-2C chain	5
19,8	ALDOA_MOUSE	Fructose-bisphosphate aldolase A	5
17,3	TNNT2_MOUSE	Troponin T, cardiac muscle	5
42,2	ATP5H_MOUSE	ATP synthase subunit d, mit	5
23,1	ETFA_MOUSE	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mit	4
15,6	FIBB_MOUSE	Fibrinogen beta chain	4
17,5	ENOB_MOUSE	Beta-enolase	4
45,8	HBA_MOUSE	Hemoglobin subunit alpha	4
7,1	GRP75_MOUSE	Stress-70 protein, mit	4
10	KPYM_MOUSE	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	4
12,1	QCR2_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mit	4
5,2	PYGB_MOUSE	Glycogen phosphorylase, brain form	4
4,7	ACTN4_MOUSE	Alpha-actinin-4	4
24,6	TNNI3_MOUSE	Troponin I, cardiac muscle	3
16,9	CY1_MOUSE	Cytochrome c1, heme protein, mit	3
8,4	CISY_MOUSE	Citrate synthase, mit	3
5,8	SRCA_MOUSE	Sarcalumenin	3
11,4	NDUA9_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mit	3
9,9	M2OM_MOUSE	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	3
20,9	TPIS_MOUSE	Triosephosphate isomerase	3
10,8	DECR_MOUSE	2,4-dienoyl-CoA reductase, mit	3

(Continúa en la página siguiente)

TPCN1/2 M1 KO			
% Cob (95)	Código Uniprot	Nombre	Péptidos (95%)
15,5	A1AT3_MOUSE	Alpha-1-antitrypsin 1-3	3
13,7	IDH3A_MOUSE	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mit	3
11,5	PGK1_MOUSE	Phosphoglycerate kinase 1	3
4,1	LDB3_MOUSE	LIM domain-binding protein 3	3
22,1	MYG_MOUSE	Myoglobin	3
17,7	MLRA_MOUSE	Myosin regulatory light chain 2, atrial isoform	3
6,5	CASQ2_MOUSE	Calsequestrin-2	2
4,1	NDUS1_MOUSE	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mit	2
13,3	MYOZ2_MOUSE	Myozenin-2	2
6,5	DHSA_MOUSE	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mit	2
9,2	DHSB_MOUSE	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mit	2
10,6	TPM1_MOUSE	Tropomyosin alpha-1 chain	2
9,3	ODO2_MOUSE	Dihydropyridyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mit	2
19,2	ES1_MOUSE	ES1 protein homolog, mit	2
8,9	ODPB_MOUSE	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mit	2
9,2	THIL_MOUSE	Acetyl-CoA acetyltransferase, mit	2
11,6	A1AG1_MOUSE	Alpha-1-acid glycoprotein 1	2
6,8	CD36_MOUSE	Platelet glycoprotein 4	2
8	UCRI_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mit	2
9,3	BDH_MOUSE	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mit	2
9,2	HPT_MOUSE	Haptoglobin	2
6,8	HS90B_MOUSE	Heat shock protein HSP 90-beta	2
4,8	IMMT_MOUSE	Mitochondrial inner membrane protein	2
5	MMSA_MOUSE	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mit	2
9,2	SUCA_MOUSE	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit alpha, mit	2
6,9	SCOT1_MOUSE	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1, mit	2
5,8	VIME_MOUSE	Vimentin	2
5	CMC1_MOUSE	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1	2
7,7	ATPG_MOUSE	ATP synthase subunit gamma, mit	2
18,7	MYL4_MOUSE	Myosin light chain 4	2
0,9	LONM_MOUSE	Lon protease homolog, mit	1
4,7	BA1C_MOUSE	Tubulin alpha-1C chain	1
2,1	CH60_MOUSE	60 kDa heat shock protein, mit	1
5,8	NDUV1_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mit	1
2,6	ODPA_MOUSE	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mit	1
1,2	MYOM1_MOUSE	Myomesin-1	1
2,9	MOES_MOUSE	Moesin	1
3,1	EHD2_MOUSE	EH domain-containing protein 2	1
6,1	ECH1_MOUSE	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mit	1
2,4	CACP_MOUSE	Carnitine O-acetyltransferase	1
2	VINC_MOUSE	Vinculin	1
3,2	ACADS_MOUSE	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	1
3,5	HCDH_MOUSE	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mit	1
1,1	CO6A1_MOUSE	Collagen alpha-1(VI) chain	1
2,1	TERA_MOUSE	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	1
2,7	CALX_MOUSE	Calnexin	1
2,2	ANXA6_MOUSE	Annexin A6	1
4,3	PHB2_MOUSE	Prohibitin-2	1
2,9	ACOT2_MOUSE	Acyl-coenzyme A thioesterase 2, mit	1
8,2	ETFB_MOUSE	Electron transfer flavoprotein subunit beta	1
5,9	AT5F1_MOUSE	ATP synthase subunit b, mit	1
2	TRFE_MOUSE	Serotransferrin	1
3,1	ETFD_MOUSE	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mit	1
2,9	HIBCH_MOUSE	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mit	1
3,4	AL4A1_MOUSE	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, mit	1
7,8	GSTM7_MOUSE	Glutathione S-transferase Mu 7	1

(Continúa en la página siguiente)

TPCN1/2 M1 KO			
% Cob (95)	Código Uniprot	Nombre	Péptidos (95%)
5,3	APOA1_MOUSE	Apolipoprotein A-I	1
3,9	1433E_MOUSE	14-3-3 protein epsilon	1
2,8	PGS2_MOUSE	Decorin	1
3,9	BASI_MOUSE	Basigin	1
3,3	AATM_MOUSE	Aspartate aminotransferase, mit	1
9	TAGL2_MOUSE	Transgelin-2	1
3,5	NDRG2_MOUSE	Protein NDRG2	1
8	NDUBA_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	1
8,9	ATPO_MOUSE	ATP synthase subunit O, mit	1
11,9	H2B3A_MOUSE	Histone H2B type 3-A	1
4,5	MPCP_MOUSE	Phosphate carrier protein, mit	1
6,7	COQ9_MOUSE	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mit	1
2,8	ODP2_MOUSE	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mit	1
7,2	ECHM_MOUSE	Enoyl-CoA hydratase, mit	1
4,2	EFTU_MOUSE	Elongation factor Tu, mit	1
4,3	GDIB_MOUSE	Rab GDP dissociation inhibitor beta	1
8,1	PRDX5_MOUSE	Peroxiredoxin-5, mit	1
2,7	ALDH2_MOUSE	Aldehyde dehydrogenase, mit	1
2,6	ACSL1_MOUSE	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1	1
2,7	HYES_MOUSE	Epoxide hydrolase 2	1
3,8	VTNC_MOUSE	Vitronectin	1
8,1	HSPB1_MOUSE	Heat shock protein beta-1	1
3,6	AT1B1_MOUSE	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1	1
6,3	SODM_MOUSE	Superoxide dismutase [Mn], mit	1
4,1	ANXA2_MOUSE	Annexin A2	1
8,8	COX2_MOUSE	Cytochrome c oxidase subunit 2	1
3,9	LGMN_MOUSE	Legumain	1
4,6	PTRF_MOUSE	Polymerase I and transcript release factor	1
6,8	FABPH_MOUSE	Fatty acid-binding protein, heart	1
4,5	SPA3M_MOUSE	Serine protease inhibitor A3M	1
4,2	NDUS8_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mit	1
3,7	DLDH_MOUSE	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mi	1
6,8	VDAC2_MOUSE	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	1
4,6	PURA1_MOUSE	Adenylosuccinate synthetase isozyme 1	1
0	TITIN_MOUSE	Titin	1
3,3	CPT2_MOUSE	Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mit	1
4,6	VTDB_MOUSE	Vitamin D-binding protein	1
16,3	CX6B1_MOUSE	Cytochrome c oxidase subunit 6B1	1
7,1	PGAM2_MOUSE	Phosphoglycerate mutase 2	1
6	EF1A2_MOUSE	Elongation factor 1-alpha 2	1
3	GABT_MOUSE	4-aminobutyrate aminotransferase, mit	1
1,3	AF1L2_MOUSE	Actin filament-associated protein 1-like 2	1
2,5	CMC2_MOUSE	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2	1

Tabla 20. Proteínas identificadas por LC-MALDI en el ventrículo izquierdo cardíaco del ratón número 1 KO para TPC1/2. Se representa el porcentaje de cobertura, el código UniProt, el nombre y el número de péptidos encontrados para cada proteína. mit, mitocondrial.

TPCN1/2 M2 KO			
% Cob (95)	Código Uniprot	Nombre	Péptidos (95%)
29,3	MYH6_MOUSE	Myosin-6	50
55,2	ACTC_MOUSE	Actin, alpha cardiac muscle 1	37
19	MYH7_MOUSE	Myosin-7	32
53,7	ATPB_MOUSE	ATP synthase subunit beta, mit	29
35,3	ATPA_MOUSE	ATP synthase subunit alpha, mit	25
38,6	ADT1_MOUSE	ADP/ATP translocase 1	17
22,4	ACON_MOUSE	Aconitate hydratase, mit	15
26,7	ECHA_MOUSE	Trifunctional enzyme subunit alpha, mit	14
19,4	ACTN2_MOUSE	Alpha-actinin-2	14
28,9	KCRS_MOUSE	Creatine kinase S-type, mit	12
13,7	MYPC3_MOUSE	Myosin-binding protein C, cardiac-type	11
48,7	VDAC1_MOUSE	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	11
21,2	ALBU_MOUSE	Serum albumin	10
15,2	ACTG_MOUSE	Actin, cytoplasmic 2	10
19,5	ACADL_MOUSE	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	9
35,3	THIM_MOUSE	3-ketoacyl-CoA thiolase, mit	9
34	MDHM_MOUSE	Malate dehydrogenase, mit	8
33,6	G3P_MOUSE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	8
29,7	ENOB_MOUSE	Beta-enolase	7
11,8	PYGM_MOUSE	Glycogen phosphorylase, muscle form	7
18,5	ACADV_MOUSE	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	7
23,7	DESM_MOUSE	Desmin	7
21,7	ECHB_MOUSE	Trifunctional enzyme subunit beta, mit	7
25,8	MDHC_MOUSE	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	7
20,5	FUMH_MOUSE	Fumarate hydratase, mit	7
20,6	QCRI_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mit	7
54,7	ATP5H_MOUSE	ATP synthase subunit d, mit	7
41,2	MYL3_MOUSE	Myosin light chain 3	6
13,5	IDHP_MOUSE	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mit	6
33	ETFA_MOUSE	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mit	6
27,1	AATC_MOUSE	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	6
0,3	TITIN_MOUSE	Titin	6
17,9	TNNT2_MOUSE	Troponin T, cardiac muscle	6
16	TBB2C_MOUSE	Tubulin beta-2C chain	6
17,2	CISY_MOUSE	Citrate synthase, mit	6
19,8	SCOT1_MOUSE	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1, mit	6
8,5	ODO1_MOUSE	2-oxoglutarate dehydrogenase, mit	5
19,9	NDUA9_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mit	5
16,8	A1AT3_MOUSE	Alpha-1-antitrypsin 1-3	5
14,5	KPYM_MOUSE	Isoform M1 of Pyruvate kinase isozymes M1/M2	5
16,3	KCRM_MOUSE	Creatine kinase M-type	5
19,8	NDUS3_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mit	5
16,3	AATM_MOUSE	Aspartate aminotransferase, mit	5
47	MLRV_MOUSE	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform	5
14	ACADM_MOUSE	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	5
29,2	CY1_MOUSE	Cytochrome c1, heme protein, mit	5
27,9	HBB1_MOUSE	Hemoglobin subunit beta-1	5
15,8	DECR_MOUSE	2,4-dienoyl-CoA reductase, mit	4
20,4	TPM1_MOUSE	Tropomyosin alpha-1 chain	4
8,3	NDUS1_MOUSE	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mit	4
7,3	SRCA_MOUSE	Sarcalumenin	4
13,7	EFTU_MOUSE	Elongation factor Tu, mit	4
10,4	HSP7C_MOUSE	Heat shock cognate 71 kDa protein	4
7,4	GRP75_MOUSE	Stress-70 protein, mit	4

(Continúa en la página siguiente)

TPCN1/2 M2 KO			
% Cob (95)	Código Uniprot	Nombre	Péptidos (95%)
12,7	PGK1_MOUSE	Phosphoglycerate kinase 1	4
12,1	QCR2_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mit	4
12,5	NDUV1_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mit	3
14,4	THIL_MOUSE	Acetyl-CoA acetyltransferase, mit	3
15,7	ALDOA_MOUSE	Fructose-bisphosphate aldolase A	3
5,7	AT2A2_MOUSE	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	3
6,2	IMMT_MOUSE	Mitochondrial inner membrane protein	3
7,2	CACP_MOUSE	Carnitine O-acetyltransferase	3
42,3	HBA_MOUSE	Hemoglobin subunit alpha	3
18,2	MYOZ2_MOUSE	Myozenin-2	3
14,6	SPA3K_MOUSE	Serine protease inhibitor A3K	3
9,9	M2OM_MOUSE	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	3
8,2	CPT2_MOUSE	Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mit	3
3,9	PYGB_MOUSE	Glycogen phosphorylase, brain form	3
9,2	LDB3_MOUSE	Isoform Cypher2c of LIM domain-binding protein 3	3
8,9	ODPB_MOUSE	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mit	3
11,3	ENOA_MOUSE	Alpha-enolase	3
6,5	DHSA_MOUSE	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mit	2
9,2	DHSB_MOUSE	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mit	2
4,8	HS90B_MOUSE	Heat shock protein HSP 90-beta	2
15,6	TNNI3_MOUSE	Troponin I, cardiac muscle	2
6,4	ECH1_MOUSE	Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mit	2
5,2	ALDH2_MOUSE	Aldehyde dehydrogenase, mit	2
8	SUCB1_MOUSE	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mit	2
6,6	ACOT2_MOUSE	Acyl-coenzyme A thioesterase 2, mit	2
10	NDRG2_MOUSE	Protein NDRG2	2
9	IDH3A_MOUSE	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mit	2
22,1	MYG_MOUSE	Myoglobin	2
6,5	CASQ2_MOUSE	Calsequestrin-2	2
19,2	ES1_MOUSE	ES1 protein homolog, mit	2
5,2	EHD2_MOUSE	EH domain-containing protein 2	2
17,7	TPIS_MOUSE	Triosephosphate isomerase	2
13,2	COX2_MOUSE	Cytochrome c oxidase subunit 2	2
6,8	CD36_MOUSE	Platelet glycoprotein 4	2
4,8	TERA_MOUSE	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	2
7,2	LDHB_MOUSE	L-lactate dehydrogenase B chain	2
2,3	LONM_MOUSE	Lon protease homolog, mit	2
16,9	ATPO_MOUSE	ATP synthase subunit O, mit	2
8	TBA1C_MOUSE	Tubulin alpha-1C chain	2
13,5	FABPH_MOUSE	Fatty acid-binding protein, heart	2
8,7	ATPG_MOUSE	ATP synthase subunit gamma, mit	2
4,9	GRP78_MOUSE	78 kDa glucose-regulated protein	2
14,2	NDUBA_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	2
4,3	SUCA_MOUSE	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit alpha, mit	2
7,1	COX41_MOUSE	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mit	2
8	TBA4A_MOUSE	Tubulin alpha-4A chain	2
2,1	CH60_MOUSE	60 kDa heat shock protein, mit	1
2,8	CMC2_MOUSE	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2	1
5,8	BDH_MOUSE	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mit	1
8,1	NDUV2_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mit	1
7,2	ECHM_MOUSE	Enoyl-CoA hydratase, mit	1
8,1	HSPB1_MOUSE	Heat shock protein beta-1	1
8,2	ETFB_MOUSE	Electron transfer flavoprotein subunit beta	1

(Continúa en la página siguiente)

TPCN1/2 M2 KO			
% Cob (95)	Código Uniprot	Nombre	Péptidos (95%)
1,4	CPT1B_MOUSE	Carnitine O-palmitoyltransferase 1, muscle isoform	1
3,4	AL4A1_MOUSE	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, mit	1
2,7	CMC1_MOUSE	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1	1
7,8	GSTM2_MOUSE	Glutathione S-transferase Mu 2	1
3,7	DLDH_MOUSE	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mit	1
4,7	APOO_MOUSE	Apolipoprotein	1
5,9	AT5F1_MOUSE	ATP synthase subunit b, mir	1
3,1	ETFD_MOUSE	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mit	1
4,3	GDIB_MOUSE	Rab GDP dissociation inhibitor beta	1
8,1	PRDX5_MOUSE	Peroxisredoxin-5, mit	1
4,4	PHB_MOUSE	Prohibitin	1
5,4	PRDX3_MOUSE	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mit	1
3,9	JBAS1_MOUSE	Basigin	1
3,6	AT1B1_MOUSE	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1	1
6,3	SODM_MOUSE	Superoxide dismutase [Mn], mit	1
4,3	PHB2_MOUSE	Prohibitin-2	1
6,9	NQO2_MOUSE	Ribosyldihyronicotinamide dehydrogenase [quinone]	1
2,4	MMSA_MOUSE	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mit	1
4,6	ODO2_MOUSE	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mit	1
4,5	MPCP_MOUSE	Phosphate carrier protein, mit	1
1,7	ACD10_MOUSE	Acyl-CoA dehydrogenase family member 10	1
2,8	ODP2_MOUSE	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mit	1
14,6	NDUA4_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4	1
3,5	HCDH_MOUSE	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mit	1
3,2	ACADS_MOUSE	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	1
5,3	APOA1_MOUSE	Apolipoprotein A-I	1
2,5	SMYD1_MOUSE	SET and MYND domain-containing protein 1	1
5,9	IDH3G_MOUSE	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit gamma, mit	1
2,6	ACSL1_MOUSE	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1	1
2,8	NP1L1_MOUSE	Nucleosome assembly protein 1-like 1	1
2,9	MOES_MOUSE	Moesin	1
4,1	G6PI_MOUSE	Glucose-6-phosphate isomerase	1
7,1	PGAM2_MOUSE	Phosphoglycerate mutase 2	1
7,7	HCD2_MOUSE	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	1
1,7	HEMO_MOUSE	Hemopexin	1
9	NDUAD_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13	1
2,9	HIBCH_MOUSE	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mit	1
5,1	UCRI_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mit	1
2,3	ARHL1_MOUSE	[Protein ADP-ribosylarginine] hydrolase-like protein 1	1
3,1	TRI72_MOUSE	Tripartite motif-containing protein 72	1
3,1	PCCB_MOUSE	Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mit	1
1,9	EF2_MOUSE	Elongation factor 2	1
9,3	KAD1_MOUSE	Adenylate kinase isoenzyme 1	1
4,7	C1QBP_MOUSE	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mit	1
3,4	JPH2_MOUSE	Junctophilin-2	1
3	VIME_MOUSE	Vimentin	1
15,4	CRIP2_MOUSE	Cysteine-rich protein 2	1
0,8	FLNC_MOUSE	Filamin-C	1

Tabla 21. Proteínas identificadas por LC-MALDI en el ventrículo izquierdo cardíaco del ratón número 2 KO para TPC1/2. Se representa el porcentaje de cobertura, el código UniProt, el nombre y el número de péptidos encontrados para cada proteína. mit, mitocondrial.

TPCN1/2 M3 KO			
% Cob (95)	Código Uniprot	Nombre	Péptidos (95%)
71,9	ACTC_MOUSE	Actin, alpha cardiac muscle 1	50
21,7	MYH6_MOUSE	Myosin-6	39
47,2	ATPA_MOUSE	ATP synthase subunit alpha, mit	35
54,3	ATPB_MOUSE	ATP synthase subunit beta, mit	34
43,9	ACON_MOUSE	Aconitate hydratase, mit	30
25,7	ACTN2_MOUSE	Alpha-actinin-2	22
32,4	ECHA_MOUSE	Trifunctional enzyme subunit alpha, mit	22
40,6	KCRS_MOUSE	Creatine kinase S-type, mit	14
16,6	IDHP_MOUSE	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mit	14
30,1	ALBU_MOUSE	Serum albumin	13
13,2	ODO1_MOUSE	2-oxoglutarate dehydrogenase, mit	10
26,3	QCR1_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mit	10
13,3	PYGM_MOUSE	Glycogen phosphorylase, muscle form	9
7,7	ACTN1_MOUSE	Alpha-actinin-1	9
21,5	ACADV_MOUSE	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	8
8,3	MYPC3_MOUSE	Myosin-binding protein C, cardiac-type	8
24,5	DESM_MOUSE	Desmin	8
20	ECHB_MOUSE	Trifunctional enzyme subunit beta, mit	8
32,5	MDHM_MOUSE	Malate dehydrogenase, mit	7
18,8	ADT1_MOUSE	ADP/ATP translocase 1	7
31,7	THIM_MOUSE	3-ketoacyl-CoA thiolase, mit	7
26,4	AATC_MOUSE	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	7
20,1	QCR2_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mit	7
15,1	ACADL_MOUSE	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	7
13,5	TRFE_MOUSE	Serotransferrin	6
13,3	NDUS1_MOUSE	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mit	6
13,2	CPT2_MOUSE	Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mit	6
20,5	NDUS3_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mit	5
9,1	SRCA_MOUSE	Sarcalumenin	5
27,5	MYL3_MOUSE	Myosin light chain 3	5
8,4	LDB3_MOUSE	LIM domain-binding protein 3	5
13,9	DHSA_MOUSE	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mit	5
7,1	GRP75_MOUSE	Stress-70 protein, mit	5
10,6	CISY_MOUSE	Citrate synthase, mit	4
6,8	HSP7C_MOUSE	Heat shock cognate 71 kDa protein	4
17	ALDOA_MOUSE	Fructose-bisphosphate aldolase A	4
23,1	ETFA_MOUSE	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mit	4
9,6	ALDH2_MOUSE	Aldehyde dehydrogenase, mit	4
10,9	TBA1B_MOUSE	Tubulin alpha-1B chain	4
12,8	FUMH_MOUSE	Fumarate hydratase, mit	4
16,9	CY1_MOUSE	Cytochrome c1, heme protein, mit	4
12,6	G3P_MOUSE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	4
10,5	MDHC_MOUSE	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	4
12,3	IDH3A_MOUSE	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mit	3
11,6	KCRM_MOUSE	Creatine kinase M-type	3
4,8	CPT1B_MOUSE	Carnitine O-palmitoyltransferase 1, muscle isoform	3
4,1	ACSL1_MOUSE	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1	3
14,1	ENOB_MOUSE	Beta-enolase	3
13,3	MYOZ2_MOUSE	Myozenin-2	3

(Continúa en la página siguiente)

TPCN1/2 M3 KO			
% Cob (95)	Código Uniprot	Nombre	Péptidos (95%)
11,4	NDUA9_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mit	3
10,2	HEMO_MOUSE	Hemopexin	3
22,3	TNNI3_MOUSE	Troponin I, cardiac muscle	3
5	CMC1_MOUSE	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1	3
8,2	CH60_MOUSE	60 kDa heat shock protein, mit	3
19,6	ETFB_MOUSE	Electron transfer flavoprotein subunit beta	3
13	THIL_MOUSE	Acetyl-CoA acetyltransferase, mit	3
9,7	ODO2_MOUSE	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mit	3
7,2	KPYM_MOUSE	Isoform M1 of Pyruvate kinase isozymes M1/M2	3
8,9	ODPB_MOUSE	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mit	3
15	HBB2_MOUSE	Hemoglobin subunit beta-2	3
3,7	PYGB_MOUSE	Glycogen phosphorylase, brain form	3
4,2	CACP_MOUSE	Carnitine O-acetyltransferase	2
5,2	ACADM_MOUSE	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mit	2
3,1	AT2A2_MOUSE	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	2
8	NDUV1_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mit	2
5,3	IMMT_MOUSE	Mitochondrial inner membrane protein	2
5,9	TRI72_MOUSE	Tripartite motif-containing protein 72	2
4,5	MOES_MOUSE	Moesin	2
7,3	EFTU_MOUSE	Elongation factor Tu, mit	2
10	TNNT2_MOUSE	Troponin T, cardiac muscle	2
10,8	DECR_MOUSE	2,4-dienoyl-CoA reductase, mit	2
4,2	TERA_MOUSE	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	2
11,7	IDH3G_MOUSE	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit gamma, mit	2
8,6	AATM_MOUSE	Aspartate aminotransferase, mit	2
6,5	DLDH_MOUSE	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mit	2
5,8	MMSA_MOUSE	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mit	2
4,6	PDLI5_MOUSE	PDZ and LIM domain protein 5	2
7,3	HCDH_MOUSE	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mit	2
21,8	HBA_MOUSE	Hemoglobin subunit alpha	2
5,4	SMYD1_MOUSE	SET and MYND domain-containing protein 1	2
4,9	ETFD_MOUSE	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mit	2
5,5	PCCB_MOUSE	Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mit	2
5,4	TBB4_MOUSE	Tubulin beta-4 chain	2
8,7	LDHB_MOUSE	L-lactate dehydrogenase B chain	2
4,9	SUCA_MOUSE	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit alpha, mit	2
5,2	SCOT1_MOUSE	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1, mit	1
2,6	EF1A2_MOUSE	Elongation factor 1-alpha 2	1
2,7	HYES_MOUSE	Epoxide hydrolase 2	1
5,6	UCB1_MOUSE	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mit	1
0,9	LONM_MOUSE	Lon protease homolog, mit	1
4,1	PGK1_MOUSE	Phosphoglycerate kinase 1	1
5	DHSB_MOUSE	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mit	1
3	VIME_MOUSE	Vimentin	1
5,9	AT5F1_MOUSE	ATP synthase subunit b, mit	1
2,8	NDUAA_MOUSE	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mit	1
2,8	ODP2_MOUSE	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mit	1
2,2	ANXA6_MOUSE	Annexin A6	1
3,5	NDRG2_MOUSE	Protein NDRG2	1

(Continúa en la página siguiente)

TPCN1/2 M3 KO			
% Cob (95)	Código Uniprot	Nombre	Péptidos (95%)
4	NDUS7_MOUSE	NADH dehidrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 7, mit	1
2.4	NDUS2_MOUSE	NADH dehidrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mit	1
7.2	ECHM_MOUSE	Enoyl-CoA hidratase, mit	1
6.3	ACOT6_MOUSE	Isoform 2 of Acyl-coenzyme A thioesterase 6	1
5.3	A1AT5_MOUSE	Alpha-1-antitrypsin 1-5	1
4.4	ALDR_MOUSE	Aldose reductase	1
2.1	HS90B_MOUSE	Heat shock protein HSP 90-beta	1
4.3	PHB2_MOUSE	Prohibitin-2	1
8	NDUBA_MOUSE	NADH dehidrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	1
6.7	COQ9_MOUSE	Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mit	1
14.6	NDUA4_MOUSE	NADH dehidrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4	1
3.7	VDAC1_MOUSE	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	1
3.6	CD36_MOUSE	Platelet glycoprotein 4	1
3.2	ACADS_MOUSE	Short-chain specific acyl-CoA dehidrogenase, mit	1
2.8	ODPA_MOUSE	Pyruvate dehidrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mit	1
3.9	BASI_MOUSE	Basigin	1
2.2	CATD_MOUSE	Cathepsin D	1
3.6	AT1B1_MOUSE	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1	1
6.3	SODM_MOUSE	Superoxide dismutase [Mn], mit	1
2	VINC_MOUSE	Vinculin	1
5.5	NDUB6_MOUSE	NADH dehidrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 6	1
1.8	HSP74_MOUSE	Heat shock 70 kDa protein 4	1
4.5	SPA3M_MOUSE	Serine protease inhibitor A3M	1
2.8	PGS2_MOUSE	Decorin	1
1.8	FIBG_MOUSE	Fibrinogen gamma chain	1
1.7	SBP2_MOUSE	Selenium-binding protein 2	1
4.2	NDUS8_MOUSE	NADH dehidrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mit	1
2.3	TGM2_MOUSE	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	1

Tabla 22. Proteínas identificadas por LC-MALDI en el ventrículo izquierdo cardíaco del ratón número 3 KO para TPC1/2. Se representa el porcentaje de cobertura, el código UniProt, el nombre y el número de péptidos encontrados para cada proteína. mit, mitocondrial.





BIBLIOGRAFÍA



1. Ishibashi, K., Suzuki, M. & Imai, M. Molecular cloning of a novel form (two-repeat) protein related to voltage-gated sodium and calcium channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**, 370–6 (2000).
2. Furuichi, T., Cunningham, K. W. & Muto, S. A putative two pore channel AtTPC1 mediates Ca(2+) flux in Arabidopsis leaf cells. *Plant Cell Physiol.* **42**, 900–5 (2001).
3. Calcraft, P. J., Ruas, M., Pan, Z., Cheng, X., Arredouani, A., Hao, X., Tang, J., Rietdorf, K., Teboul, L., Chuang, K.-T., Lin, P., Xiao, R., Wang, C., Zhu, Y., Lin, Y., Wyatt, C. N., Parrington, J., Ma, J., Evans, a M., Galione, A. & Zhu, M. X. NAADP mobilizes calcium from acidic organelles through two-pore channels. *Nature* **459**, 596–600 (2009).
4. Patel, S., Ramakrishnan, L., Rahman, T., Hamdoun, A., Marchant, J. S., Taylor, C. W. & Brailoiu, E. The endo-lysosomal system as an NAADP-sensitive acidic Ca(2+) store: role for the two-pore channels. *Cell Calcium* **50**, 157–67 (2011).
5. Brailoiu, E., Hooper, R., Cai, X., Brailoiu, G. C., Keebler, M. V, Dun, N. J., Marchant, J. S. & Patel, S. An ancestral deuterostome family of two-pore channels mediates nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate-dependent calcium release from acidic organelles. *J. Biol. Chem.* **285**, 2897–901 (2010).
6. Scherer, S. E., Muzny, D. M., Buhay, C. J., Chen, R., Cree, A., Ding, Y., Dugan-Rocha, S., Gill, R., Gunaratne, P., Harris, R. A., Hawes, A. C., Hernandez, J., Hodgson, A. V, Hume, J., Jackson, A., Khan, Z. M., Kovar-Smith, C., Lewis, L. R., Lozado, R. J., Metzker, M. L., Milosavljevic, A., Miner, G. R., Montgomery, K. T., Morgan, M. B., Nazareth, L. V, Scott, G., Sodergren, E., Song, X.-Z., Steffen, D., Lovering, R. C., Wheeler, D. A., Worley, K. C., Yuan, Y., Zhang, Z., Adams, C. Q., Ansari-Lari, M. A., Ayele, M., Brown, M. J., Chen, G., Chen, Z., Clerc-Blankenburg, K. P., Davis, C., Delgado, O., Dinh, H. H., Draper, H., Gonzalez-Garay, M. L., Havlak, P., Jackson, L. R., *et al.* The finished DNA sequence of human chromosome 12. *Nature* **440**, 346–51 (2006).
7. Ruas, M., Chuang, K.-T., Davis, L. C., Al-Douri, A., Tynan, P. W., Tunn, R., Teboul, L., Galione, A. & Parrington, J. TPC1 Has Two Variant Isoforms, and Their Removal Has Different Effects on Endo-Lysosomal Functions Compared to Loss of TPC2. *Mol. Cell. Biol.* **34**, 3981–92 (2014).
8. Taylor, T. D., Noguchi, H., Totoki, Y., Toyoda, A., Kuroki, Y., Dewar, K., Lloyd, C., Itoh, T., Takeda, T., Kim, D.-W., She, X., Barlow, K. F., Bloom, T., Bruford, E., Chang, J. L., Cuomo, C. A., Eichler, E., FitzGerald, M. G., Jaffe, D. B., LaButti, K., Nicol, R., Park, H.-S., Seaman, C., Sougnez, C., Yang, X., Zimmer, A. R., Zody, M. C., Birren, B. W., Nusbaum, C., Fujiyama, A., Hattori, M., Rogers, J., Lander, E. S. & Sakaki, Y. Human chromosome 11 DNA sequence and analysis including novel gene identification. *Nature* **440**, 497–500 (2006).

9. Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S., Gough, J., Frith, M. C., Maeda, N., Oyama, R., Ravasi, T., Lenhard, B., Wells, C., Kodzius, R., Shimokawa, K., Bajic, V. B., Brenner, S. E., Batalov, S., Forrest, A. R. R., Zavolan, M., Davis, M. J., Wilming, L. G., Aidinis, V., Allen, J. E., Ambesi-Impiombato, A., Apweiler, R., Aturaliya, R. N., Bailey, T. L., Bansal, M., Baxter, L., Beisel, K. W., Bersano, T., Bono, H., Chalk, A. M., Chiu, K. P., Choudhary, V., Christoffels, A., Clutterbuck, D. R., Crowe, M. L., Dalla, E., Dalrymple, B. P., de Bono, B., Della Gatta, G., di Bernardo, D., Down, T., Engstrom, P., Fagiolini, M., Faulkner, G., Fletcher, C. F., Fukushima, T., Furuno, M., Futaki, S., Gariboldi, M., *et al.* The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* **309**, 1559–63 (2005).
10. Morgan, A. J. & Galione, A. Two-pore channels (TPCs): current controversies. *Bioessays* **36**, 173–83 (2014).
11. Clapham, D. E. & Garbers, D. L. International Union of Pharmacology. L. Nomenclature and structure-function relationships of CatSper and two-pore channels. *Pharmacol. Rev.* **57**, 451–4 (2005).
12. Galione, A., Evans, a. M., Ma, J., Parrington, J., Arredouani, A., Cheng, X. & Zhu, M. X. The acid test: The discovery of two-pore channels (TPCs) as NAADP-gated endolysosomal Ca²⁺ release channels. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **458**, 869–876 (2009).
13. Rietdorf, K., Funnell, T. M., Ruas, M., Heinemann, J., Parrington, J. & Galione, a. Two-pore Channels Form Homo- and Heterodimers. *J. Biol. Chem.* **286**, 37058–37062 (2011).
14. Hooper, R., Churamani, D., Brailoiu, E., Taylor, C. W. & Patel, S. Membrane topology of NAADP-sensitive two-pore channels and their regulation by N-linked glycosylation. *J. Biol. Chem.* **286**, 9141–9149 (2011).
15. Ohtsubo, K. & Marth, J. D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* **126**, 855–67 (2006).
16. Helenius, A. & Aebi, M. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 1019–49 (2004).
17. Brailoiu, E., Rahman, T., Churamani, D., Prole, D. L., Brailoiu, G. C., Hooper, R., Taylor, C. W. & Patel, S. An NAADP-gated two-pore channel targeted to the plasma membrane uncouples triggering from amplifying Ca²⁺ signals. *J. Biol. Chem.* **285**, 38511–38516 (2010).
18. Brailoiu, E., Churamani, D., Cai, X., Schrlau, M. G., Brailoiu, G. C., Gao, X., Hooper, R., Boulware, M. J., Dun, N. J., Marchant, J. S. & Patel, S. Essential requirement for two-pore channel 1 in NAADP-mediated calcium signaling. *J. Cell Biol.* **186**, 201–209 (2009).

19. Schieder, M., Rötzer, K., Brüggemann, A., Biel, M. & Wahl-Schott, C. A. Characterization of two-pore channel 2 (TPCN2)-mediated Ca²⁺ currents in isolated lysosomes. *J. Biol. Chem.* **285**, 21219–22 (2010).
20. Kilpatrick, B. S., Eden, E. R., Schapira, A. H., Futter, C. E. & Patel, S. Direct mobilisation of lysosomal Ca²⁺ triggers complex Ca²⁺ signals. *J. Cell Sci.* **126**, 60–6 (2013).
21. Zong, X., Schieder, M., Cuny, H., Fenske, S., Gruner, C., Rötzer, K., Griesbeck, O., Harz, H., Biel, M. & Wahl-Schott, C. The two-pore channel TPCN2 mediates NAADP-dependent Ca²⁺-release from lysosomal stores. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **458**, 891–899 (2009).
22. Ruas, M., Rietdorf, K., Arredouani, A., Davis, L. C., Lloyd-Evans, E., Koegel, H., Funnell, T. M., Morgan, A. J., Ward, J. A., Watanabe, K., Cheng, X., Churchill, G. C., Zhu, M. X., Platt, F. M., Wessel, G. M., Parrington, J. & Galione, A. Purified TPC isoforms form NAADP receptors with distinct roles for Ca(2+) signaling and endolysosomal trafficking. *Curr. Biol.* **20**, 703–9 (2010).
23. Pfeffer, S. R. Rab GTPase regulation of membrane identity. *Curr. Opin. Cell Biol.* **25**, 414–9 (2013).
24. Amandio, V. Endocytic Transport and Some of its Implications for Physiology, Metabolism, and Disease. *J. Physiobiochemical Metab.* **1:2**, (2012).
25. Yang, G.-Z., Yang, M., Lim, Y., Lu, J.-J., Wang, T.-H., Qi, J.-G., Zhong, J.-H. & Zhou, X.-F. Huntingtin associated protein 1 regulates trafficking of the amyloid precursor protein and modulates amyloid beta levels in neurons. *J. Neurochem.* **122**, 1010–22 (2012).
26. Crosetto, N., Tikkanen, R. & Dikic, I. Oncogenic breakdowns in endocytic adaptor proteins. *FEBS Lett.* **579**, 3231–8 (2005).
27. Nixon, R. A. Endosome function and dysfunction in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Aging* **26**, 373–82 (2005).
28. Cheng, J. & Vieira, A. Oxidative stress disrupts internalization and endocytic trafficking of transferrin in a human malignant keratinocyte line. *Cell Biochem. Biophys.* **45**, 177–84 (2006).
29. Gutiérrez, M., Isa, P., Sánchez-San Martín, C., Pérez-Vargas, J., Espinosa, R., Arias, C. F. & López, S. Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* **84**, 9161–9 (2010).
30. Garaiova, Z., Strand, S. P., Reitan, N. K., Lélou, S., Størset, S. Ø., Berg, K., Malmo, J., Folasire, O., Bjørkøy, A. & Davies, C. de L. Cellular uptake of DNA-

- chitosan nanoparticles: the role of clathrin- and caveolae-mediated pathways. *Int. J. Biol. Macromol.* **51**, 1043–51 (2012).
31. Mayor, S., Presley, J. F. & Maxfield, F. R. Sorting of membrane components from endosomes and subsequent recycling to the cell surface occurs by a bulk flow process. *J. Cell Biol.* **121**, 1257–69 (1993).
 32. Gruenberg, J. The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 721–30 (2001).
 33. Mellman, I. Endocytosis and molecular sorting. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 575–625 (1996).
 34. Jovic, M., Sharma, M., Rahajeng, J. & Caplan, S. The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histol. Histopathol.* **25**, 99–112 (2010).
 35. Sonnichsen, B. Distinct Membrane Domains on Endosomes in the Recycling Pathway Visualized by Multicolor Imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J. Cell Biol.* **149**, 901–914 (2000).
 36. Taguchi, T. Emerging roles of recycling endosomes. *J. Biochem.* **153**, 505–10 (2013).
 37. Li, X., Garrity, A. G. & Xu, H. Regulation of membrane trafficking by signalling on endosomal and lysosomal membranes. *J. Physiol.* **591**, 4389–401 (2013).
 38. Cullen, P. J. & Korswagen, H. C. Sorting nexins provide diversity for retromer-dependent trafficking events. *Nat. Cell Biol.* **14**, 29–37 (2012).
 39. Murphy, R. F. Maturation models for endosome and lysosome biogenesis. *Trends Cell Biol.* **1**, 77–82 (1991).
 40. Storrie, B. & Desjardins, M. The biogenesis of lysosomes: is it a kiss and run, continuous fusion and fission process? *Bioessays* **18**, 895–903 (1996).
 41. Mullock, B. M., Bright, N. A., Fearon, C. W., Gray, S. R. & Luzio, J. P. Fusion of lysosomes with late endosomes produces a hybrid organelle of intermediate density and is NSF dependent. *J. Cell Biol.* **140**, 591–601 (1998).
 42. Mullins, C. & Bonifacino, J. S. The molecular machinery for lysosome biogenesis. *Bioessays* **23**, 333–43 (2001).
 43. Blümer, J., Rey, J., Dehmelt, L., Mazel, T., Wu, Y.-W., Bastiaens, P., Goody, R. S. & Itzen, A. RabGEFs are a major determinant for specific Rab membrane targeting. *J. Cell Biol.* **200**, 287–300 (2013).
-

44. Mizuno-Yamasaki, E., Rivera-Molina, F. & Novick, P. GTPase networks in membrane traffic. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 637–59 (2012).
45. Rojas, A. M., Fuentes, G., Rausell, A. & Valencia, A. The Ras protein superfamily: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *J. Cell Biol.* **196**, 189–201 (2012).
46. Poteryaev, D., Datta, S., Ackema, K., Zerial, M. & Spang, A. Identification of the switch in early-to-late endosome transition. *Cell* **141**, 497–508 (2010).
47. Yu, I.-M. & Hughson, F. M. Tethering factors as organizers of intracellular vesicular traffic. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **26**, 137–56 (2010).
48. Wu, H., Rossi, G. & Brennwald, P. The ghost in the machine: small GTPases as spatial regulators of exocytosis. *Trends Cell Biol.* **18**, 397–404 (2008).
49. Chi, X., Wang, S., Huang, Y., Stamnes, M. & Chen, J.-L. Roles of rho GTPases in intracellular transport and cellular transformation. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 7089–108 (2013).
50. Di Paolo, G. & De Camilli, P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* **443**, 651–7 (2006).
51. Poccia, D. & Larijani, B. Phosphatidylinositol metabolism and membrane fusion. *Biochem. J.* **418**, 233–246 (2009).
52. Santiago-Tirado, F. H. & Bretscher, A. Membrane-trafficking sorting hubs: cooperation between PI4P and small GTPases at the trans-Golgi network. *Trends Cell Biol.* **21**, 515–25 (2011).
53. Mayinger, P. Phosphoinositides and vesicular membrane traffic. *Biochim. Biophys. Acta* **1821**, 1104–13 (2012).
54. Falkenburger, B. H., Jensen, J. B., Dickson, E. J., Suh, B.-C. & Hille, B. Phosphoinositides: lipid regulators of membrane proteins. *J. Physiol.* **588**, 3179–85 (2010).
55. Zolov, S. N., Bridges, D., Zhang, Y., Lee, W.-W., Riehle, E., Verma, R., Lenk, G. M., Converso-Baran, K., Weide, T., Albin, R. L., Saltiel, A. R., Meisler, M. H., Russell, M. W. & Weisman, L. S. In vivo, Pikfyve generates PI(3,5)P₂, which serves as both a signaling lipid and the major precursor for PI5P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 17472–7 (2012).
56. Zhang, Y., McCartney, A. J., Zolov, S. N., Ferguson, C. J., Meisler, M. H., Sutton, M. A. & Weisman, L. S. Modulation of synaptic function by VAC14, a protein that regulates the phosphoinositides PI(3,5)P₂ and PI5P. *EMBO J.* **31**, 3442–56 (2012).

57. Dong, X., Wang, X., Shen, D., Chen, S., Liu, M., Wang, Y., Mills, E., Cheng, X., Delling, M. & Xu, H. Activating mutations of the TRPML1 channel revealed by proline-scanning mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **284**, 32040–52 (2009).
58. Wang, X., Zhang, X., Dong, X.-P., Samie, M., Li, X., Cheng, X., Goschka, A., Shen, D., Zhou, Y., Harlow, J., Zhu, M. X., Clapham, D. E., Ren, D. & Xu, H. TPC proteins are phosphoinositide- activated sodium-selective ion channels in endosomes and lysosomes. *Cell* **151**, 372–83 (2012).
59. Domínguez, D. C., Guragain, M. & Patrauchan, M. Calcium binding proteins and calcium signaling in prokaryotes. *Cell Calcium* **57**, 151–65 (2015).
60. Zampese, E. & Pizzo, P. Intracellular organelles in the saga of Ca²⁺ homeostasis: different molecules for different purposes? *Cell. Mol. Life Sci.* **69**, 1077–104 (2012).
61. Smaili, S. S., Pereira, G. J. S., Costa, M. M., Rocha, K. K., Rodrigues, L., do Carmo, L. G., Hirata, H. & Hsu, Y.-T. The role of calcium stores in apoptosis and autophagy. *Curr. Mol. Med.* **13**, 252–65 (2013).
62. Morgan, A. J., Davis, L. C., Wagner, S. K. T. Y., Lewis, A. M., Parrington, J., Churchill, G. C. & Galione, A. Bidirectional Ca²⁺ signaling occurs between the endoplasmic reticulum and acidic organelles. *J. Cell Biol.* **200**, 789–805 (2013).
63. Gerasimenko, J. V, Gerasimenko, O. V & Petersen, O. H. Membrane repair: Ca²⁺-elicited lysosomal exocytosis. *Curr. Biol.* **11**, R971–R974 (2001).
64. Christensen, K. A., Myers, J. T. & Swanson, J. A. pH-dependent regulation of lysosomal calcium in macrophages. *J. Cell Sci.* **115**, 599–607 (2002).
65. Aballay, A., Sarrouf, M. N., Colombo, M. I., Stahl, P. D. & Mayorga, L. S. Zn²⁺ depletion blocks endosome fusion. *Biochem. J.* **312**, 919–923 (1995).
66. APPELMANS, F., WATTIAUX, R. & DE DUVE, C. Tissue fractionation studies. 5. The association of acid phosphatase with a special class of cytoplasmic granules in rat liver. *Biochem. J.* **59**, 438–45 (1955).
67. Hunziker, W. & Geuze, H. J. Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins. *Bioessays* **18**, 379–89 (1996).
68. Rossi, A., Deveraux, Q., Turk, B. & Sali, A. Comprehensive search for cysteine cathepsins in the human genome. *Biol. Chem.* **385**, 363–72 (2004).
69. Winchester, B. G. Lysosomal membrane proteins. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* **5 Suppl A**, 11–9 (2001).
70. Kolter, T. & Sandhoff, K. Lysosomal degradation of membrane lipids. *FEBS Lett.* **584**, 1700–12 (2010).

71. DELL'ANGELICA, E. C. Lysosome-related organelles. *FASEB J.* **14**, 1265–1278 (2000).
72. Braulke, T. & Bonifacino, J. S. Sorting of lysosomal proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1793**, 605–14 (2009).
73. Sardiello, M., Palmieri, M., di Ronza, A., Medina, D. L., Valenza, M., Gennarino, V. A., Di Malta, C., Donaudy, F., Embrione, V., Polishchuk, R. S., Banfi, S., Parenti, G., Cattaneo, E. & Ballabio, A. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science* **325**, 473–7 (2009).
74. Settembre, C., Di Malta, C., Polito, V. A., Garcia Arencibia, M., Vetrini, F., Erdin, S. S. U., Erdin, S. S. U., Huynh, T., Medina, D., Colella, P., Sardiello, M., Rubinsztein, D. C. & Ballabio, A. TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science* **332**, 1429–33 (2011).
75. Platt, F. M., Boland, B. & van der Spoel, A. C. The cell biology of disease: lysosomal storage disorders: the cellular impact of lysosomal dysfunction. *J. Cell Biol.* **199**, 723–34 (2012).
76. Coutinho, M. F., Prata, M. J. & Alves, S. A shortcut to the lysosome: the mannose-6-phosphate-independent pathway. *Mol. Genet. Metab.* **107**, 257–66 (2012).
77. Poupetová, H., Ledvinová, J., Berná, L., Dvůráková, L., Kozich, V. & Elleder, M. The birth prevalence of lysosomal storage disorders in the Czech Republic: comparison with data in different populations. *J. Inherit. Metab. Dis.* **33**, 387–96 (2010).
78. Prinetti, A., Prioni, S., Chiricozzi, E., Schuchman, E. H., Chigorno, V. & Sonnino, S. Secondary alterations of sphingolipid metabolism in lysosomal storage diseases. *Neurochem. Res.* **36**, 1654–68 (2011).
79. Lloyd-Evans, E. & Platt, F. M. Lysosomal Ca(2+) homeostasis: role in pathogenesis of lysosomal storage diseases. *Cell Calcium* **50**, 200–5 (2011).
80. Appelqvist, H., Wäster, P., Kågedal, K. & Öllinger, K. The lysosome: from waste bag to potential therapeutic target. *J. Mol. Cell Biol.* **5**, 214–26 (2013).
81. Seglen, P. O. & Bohley, P. Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms. *Experientia* **48**, 158–72 (1992).
82. Berg, T. O., Fengsrud, M., Strømhaug, P. E., Berg, T. & Seglen, P. O. Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes. *J. Biol. Chem.* **273**, 21883–92 (1998).

83. Wolf, D. H. & Hilt, W. The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim. Biophys. Acta* **1695**, 19–31 (2004).
84. Feng, Y., He, D., Yao, Z. & Klionsky, D. J. The machinery of macroautophagy. *Cell Res.* **24**, 24–41 (2014).
85. Walinda, E., Morimoto, D., Sugase, K., Konuma, T., Tochio, H. & Shirakawa, M. Solution structure of the ubiquitin-associated (UBA) domain of human autophagy receptor NBR1 and its interaction with ubiquitin and polyubiquitin. *J. Biol. Chem.* **289**, 13890–902 (2014).
86. Martins-Marques, T., Ribeiro-Rodrigues, T., Pereira, P., Codogno, P. & Girao, H. Autophagy and Ubiquitination in Cardiovascular Diseases. *DNA Cell Biol.* (2015). doi:10.1089/dna.2014.2765
87. Xu, C., Feng, K., Zhao, X., Huang, S., Cheng, Y., Qian, L., Wang, Y., Sun, H., Jin, M., Chuang, T.-H. & Zhang, Y. Regulation of autophagy by E3 ubiquitin ligase RNF216 through BECN1 ubiquitination. *Autophagy* **10**, 2239–50 (2014).
88. Klionsky, D. J. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 931–7 (2007).
89. Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M. & Klionsky, D. J. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* **451**, 1069–75 (2008).
90. Kroemer, G. & Levine, B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 1004–10 (2008).
91. Singh, R. & Cuervo, A. M. Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell Metab.* **13**, 495–504 (2011).
92. Deretic, V. & Levine, B. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host Microbe* **5**, 527–49 (2009).
93. Arias, E. & Cuervo, A. M. Chaperone-mediated autophagy in protein quality control. *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**, 184–9 (2011).
94. Mijaljica, D., Prescott, M. & Devenish, R. J. Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy* **7**, 673–82 (2011).
95. Sahu, R., Kaushik, S., Clement, C. C., Cannizzo, E. S., Scharf, B., Follenzi, A., Potalicchio, I., Nieves, E., Cuervo, A. M. & Santambrogio, L. Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Dev. Cell* **20**, 131–9 (2011).
96. Peña-Sanoja, M. J. & De Sanctis, J. B. Autofagia y respuesta inmunitaria. *Invest. Clin.* **54**, 325–337 (2013).

97. Klionsky, D. J., Cuervo, A. M., Dunn, W. A., Levine, B., Van Der Klei, I. & Seglen, P. O. How shall i eat thee? *Autophagy* **3**, 413–416 (2007).
98. Mari, M., Tooze, S. A. & Reggiori, F. The puzzling origin of the autophagosomal membrane. *F1000 Biol. Rep.* **3**, 25 (2011).
99. Hailey, D. W., Rambold, A. S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P. K. & Lippincott-Schwartz, J. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* **141**, 656–67 (2010).
100. Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C. & Rubinsztein, D. C. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat. Cell Biol.* **12**, 747–57 (2010).
101. Lamb, C. A., Dooley, H. C. & Tooze, S. A. Endocytosis and autophagy: Shared machinery for degradation. *Bioessays* **35**, 34–45 (2013).
102. Efeyan, A. & Sabatini, D. M. mTOR and cancer: many loops in one pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 169–76 (2010).
103. Kroemer, G., Mariño, G. & Levine, B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol. Cell* **40**, 280–93 (2010).
104. Behrends, C., Sowa, M. E., Gygi, S. P. & Harper, J. W. Network organization of the human autophagy system. *Nature* **466**, 68–76 (2010).
105. He, C. & Levine, B. The Beclin 1 interactome. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 140–9 (2010).
106. Ktistakis, N. T., Andrews, S. & Long, J. What is the advantage of a transient precursor in autophagosome biogenesis? *Autophagy* **7**, 118–22 (2011).
107. Polson, H. E. J., de Lartigue, J., Rigden, D. J., Reedijk, M., Urbé, S., Clague, M. J. & Tooze, S. A. Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy* **6**, 506–22 (2010).
108. Fogel, A. I., Dlouhy, B. J., Wang, C., Ryu, S.-W., Neutzner, A., Hasson, S. A., Sideris, D. P., Abeliovich, H. & Youle, R. J. Role of membrane association and Atg14-dependent phosphorylation in beclin-1-mediated autophagy. *Mol. Cell Biol.* **33**, 3675–88 (2013).
109. He, S., Ni, D., Ma, B., Lee, J.-H., Zhang, T., Ghosalli, I., Pirooz, S. D., Zhao, Z., Bharatham, N., Li, B., Oh, S., Lee, W.-H., Takahashi, Y., Wang, H.-G., Minassian, A., Feng, P., Deretic, V., Pepperkok, R., Tagaya, M., Yoon, H. S. & Liang, C. PtdIns(3)P-bound UVRAG coordinates Golgi-ER retrograde and Atg9 transport by differential interactions with the ER tether and the beclin 1 complex. *Nat. Cell Biol.* **15**, 1206–19 (2013).

110. Takahashi, Y., Meyerkord, C. L., Hori, T., Runkle, K., Fox, T. E., Kester, M., Loughran, T. P. & Wang, H.-G. Bif-1 regulates Atg9 trafficking by mediating the fission of Golgi membranes during autophagy. *Autophagy* **7**, 61–73 (2011).
111. Kang, R., Zeh, H. J., Lotze, M. T. & Tang, D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ.* **18**, 571–80 (2011).
112. Maiuri, M. C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J.-C., Gautier, F., Juin, P., Tasdemir, E., Pierron, G., Troulinaki, K., Tavernarakis, N., Hickman, J. A., Geneste, O. & Kroemer, G. Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J.* **26**, 2527–39 (2007).
113. Jin, M. & Klionsky, D. J. Regulation of autophagy: modulation of the size and number of autophagosomes. *FEBS Lett.* **588**, 2457–63 (2014).
114. Molejon, M. I., Ropolo, A., Re, A. Lo, Boggio, V. & Vaccaro, M. I. The VMP1-Beclin 1 interaction regulates autophagy induction. *Sci. Rep.* **3**, 1055 (2013).
115. Nakatogawa, H. Two ubiquitin-like conjugation systems that mediate membrane formation during autophagy. *Essays Biochem.* **55**, 39–50 (2013).
116. Yang, Z. & Klionsky, D. J. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 124–31 (2010).
117. Xia, H.-G., Zhang, L., Chen, G., Zhang, T., Liu, J., Jin, M., Ma, X., Ma, D. & Yuan, J. Control of basal autophagy by calpain1 mediated cleavage of ATG5. *Autophagy* **6**, 61–6 (2010).
118. Mizushima, N. & Yoshimori, T. How to Interpret LC3 Immunoblotting. *Autophagy* **3**, 542–545 (2014).
119. Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.-A., Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G. & Johansen, T. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem.* **282**, 24131–45 (2007).
120. Komatsu, M. & Ichimura, Y. Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy. *FEBS Lett.* **584**, 1374–8 (2010).
121. Klionsky, D. J., Abdalla, F. C., Abeliovich, H., Abraham, R. T., Acevedo-Arozena, A., Adeli, K., Agholme, L., Agnello, M., Agostinis, P., Aguirre-Ghiso, J. A., Ahn, H. J., Ait-Mohamed, O., Ait-Si-Ali, S., Akematsu, T., Akira, S., Al-Younes, H. M., Al-Zeer, M. A., Albert, M. L., Albin, R. L., Alegre-Abarrategui, J., Aleo, M. F., Alirezai, M., Almasan, A., Almonte-Becerril, M., Amano, A., Amaravadi, R., Amarnath, S., Amer, A. O., Andrieu-Abadie, N., Anantharam, V., Ann, D. K., Anoopkumar-Dukie, S., Aoki, H., Apostolova, N., Arancia, G., Aris, J. P., Asanuma, K., Asare, N. Y. O., Ashida, H., Askanas, V., Askew, D. S., Auberger, P., Baba, M., Backues, S. K., Baehrecke, E. H., Bahr, B. A., Bai, X.-

- Y., Bailly, Y., *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* **8**, 445–544 (2012).
122. Lippai, M. & Lőw, P. The role of the selective adaptor p62 and ubiquitin-like proteins in autophagy. *Biomed Res. Int.* **2014**, 832704 (2014).
123. Jiang, P., Nishimura, T., Sakamaki, Y., Itakura, E., Hatta, T., Natsume, T. & Mizushima, N. The HOPS complex mediates autophagosome-lysosome fusion through interaction with syntaxin 17. *Mol. Biol. Cell* **25**, 1327–37 (2014).
124. Chen, Y. & Klionsky, D. J. The regulation of autophagy - unanswered questions. *J. Cell Sci.* **124**, 161–70 (2011).
125. Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y. & Yoshimori, T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J.* **19**, 5720–8 (2000).
126. Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T. & Ohsumi, Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosomal marker. *Mol. Biol. Cell* **15**, 1101–11 (2004).
127. Esteban-Martínez, L. & Boya, P. Autophagic flux determination in vivo and ex vivo. *Methods* **75**, 79–86 (2015).
128. Mizushima, N., Yoshimori, T. & Levine, B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* **140**, 313–26 (2010).
129. Tanida, I., Minematsu-Ikeguchi, N., Ueno, T. & Kominami, E. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy* **1**, 84–91 (2005).
130. Ni, H.-M., Bockus, A., Wozniak, A. L., Jones, K., Weinman, S., Yin, X.-M. & Ding, W.-X. Dissecting the dynamic turnover of GFP-LC3 in the autolysosome. *Autophagy* **7**, 188–204 (2011).
131. Gurney, M. A., Huang, C., Ramil, J. M., Ravindran, N., Andres, A. M., Sin, J., Linton, P.-J. & Gottlieb, R. A. Measuring cardiac autophagic flux in vitro and in vivo. *Methods Mol. Biol.* **1219**, 187–97 (2015).
132. Las, G., Serada, S. B., Wikstrom, J. D., Twig, G. & Shirihai, O. S. Fatty acids suppress autophagic turnover in β -cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 42534–44 (2011).
133. Klionsky, D. J., Elazar, Z., Seglen, P. O. & Rubinsztein, D. C. Does bafilomycin A1 block the fusion of autophagosomes with lysosomes? *Autophagy* **4**, 849–50 (2008).

134. Ciani, B., Layfield, R., Cavey, J. R., Sheppard, P. W. & Searle, M. S. Structure of the ubiquitin-associated domain of p62 (SQSTM1) and implications for mutations that cause Paget's disease of bone. *J. Biol. Chem.* **278**, 37409–12 (2003).
135. Moscat, J. & Diaz-Meco, M. T. The atypical protein kinase Cs. Functional specificity mediated by specific protein adapters. *EMBO Rep.* **1**, 399–403 (2000).
136. Rodriguez, A., Durán, A., Selloum, M., Champy, M.-F., Diez-Guerra, F. J., Flores, J. M., Serrano, M., Auwerx, J., Diaz-Meco, M. T. & Moscat, J. Mature-onset obesity and insulin resistance in mice deficient in the signaling adapter p62. *Cell Metab.* **3**, 211–22 (2006).
137. Wooten, M. W., Hu, X., Babu, J. R., Seibenhener, M. L., Geetha, T., Paine, M. G. & Wooten, M. C. Signaling, polyubiquitination, trafficking, and inclusions: sequestosome 1/p62's role in neurodegenerative disease. *J. Biomed. Biotechnol.* **2006**, 62079 (2006).
138. Seibenhener, M. L., Geetha, T. & Wooten, M. W. Sequestosome 1/p62--more than just a scaffold. *FEBS Lett.* **581**, 175–9 (2007).
139. Itakura, E. & Mizushima, N. p62 Targeting to the autophagosome formation site requires self-oligomerization but not LC3 binding. *J. Cell Biol.* **192**, 17–27 (2011).
140. Bjørkøy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, A., Stenmark, H. & Johansen, T. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell Biol.* **171**, 603–14 (2005).
141. Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y.-S., Ueno, T., Hara, T., Mizushima, N., Iwata, J.-I., Ezaki, J., Murata, S., Hamazaki, J., Nishito, Y., Iemura, S.-I., Natsume, T., Yanagawa, T., Uwayama, J., Warabi, E., Yoshida, H., Ishii, T., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Yue, Z., Uchiyama, Y., Kominami, E. & Tanaka, K. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* **131**, 1149–63 (2007).
142. White, E., Karp, C., Strohecker, A. M., Guo, Y. & Mathew, R. Role of autophagy in suppression of inflammation and cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 212–7 (2010).
143. Lau, A., Wang, X.-J., Zhao, F., Villeneuve, N. F., Wu, T., Jiang, T., Sun, Z., White, E. & Zhang, D. D. A noncanonical mechanism of Nrf2 activation by autophagy deficiency: direct interaction between Keap1 and p62. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 3275–85 (2010).
144. Ichimura, Y., Kumanomidou, T., Sou, Y., Mizushima, T., Ezaki, J., Ueno, T., Kominami, E., Yamane, T., Tanaka, K. & Komatsu, M. Structural basis for

- sorting mechanism of p62 in selective autophagy. *J. Biol. Chem.* **283**, 22847–57 (2008).
145. Rogov, V., Dötsch, V., Johansen, T. & Kirkin, V. Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. *Mol. Cell* **53**, 167–78 (2014).
146. Duran, A., Amanchy, R., Linares, J. F., Joshi, J., Abu-Baker, S., Porollo, A., Hansen, M., Moscat, J. & Diaz-Meco, M. T. p62 is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway. *Mol. Cell* **44**, 134–46 (2011).
147. Zhou, L., Wang, H., Ren, H., Chen, D., Gao, F., Hu, Q., Fu, C., Xu, R., Ying, Z. & Wang, G. Bcl-2-dependent upregulation of autophagy by sequestosome 1/p62 in vitro. *Acta Pharmacol. Sin.* **34**, 651–656 (2013).
148. Terman, A., Kurz, T., Navratil, M., Arriaga, E. A. & Brunk, U. T. Mitochondrial turnover and aging of long-lived postmitotic cells: the mitochondrial-lysosomal axis theory of aging. *Antioxid. Redox Signal.* **12**, 503–35 (2010).
149. Loos, B., Engelbrecht, A.-M., Lockshin, R. A., Klionsky, D. J. & Zakeri, Z. The variability of autophagy and cell death susceptibility: Unanswered questions. *Autophagy* **9**, 1270–85 (2013).
150. Nakai, A., Yamaguchi, O., Takeda, T., Higuchi, Y., Hikoso, S., Taniike, M., Omiya, S., Mizote, I., Matsumura, Y., Asahi, M., Nishida, K., Hori, M., Mizushima, N. & Otsu, K. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat. Med.* **13**, 619–24 (2007).
151. Taneike, M., Yamaguchi, O., Nakai, A., Hikoso, S., Takeda, T., Mizote, I., Oka, T., Tamai, T., Oyabu, J., Murakawa, T., Nishida, K., Shimizu, T., Hori, M., Komuro, I., Takuji Shirasawa, T. S., Mizushima, N. & Otsu, K. Inhibition of autophagy in the heart induces age-related cardiomyopathy. *Autophagy* **6**, 600–6 (2010).
152. Maron, B. J., Roberts, W. C., Arad, M., Haas, T. S., Spirito, P., Wright, G. B., Almquist, A. K., Baffa, J. M., Saul, J. P., Ho, C. Y., Seidman, J. & Seidman, C. E. Clinical outcome and phenotypic expression in LAMP2 cardiomyopathy. *JAMA* **301**, 1253–9 (2009).
153. Wang, Z. V, Ferdous, A. & Hill, J. A. Cardiomyocyte autophagy: metabolic profit and loss. *Heart Fail. Rev.* **18**, 585–94 (2013).
154. Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhisa, T. & Mizushima, N. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* **432**, 1032–6 (2004).
155. Kanamori, H., Takemura, G., Maruyama, R., Goto, K., Tsujimoto, A., Ogino, A., Li, L., Kawamura, I., Takeyama, T., Kawaguchi, T., Nagashima, K., Fujiwara,

- T., Fujiwara, H., Seishima, M. & Minatoguchi, S. Functional significance and morphological characterization of starvation-induced autophagy in the adult heart. *Am. J. Pathol.* **174**, 1705–14 (2009).
156. Marambio, P., Toro, B., Sanhueza, C., Troncoso, R., Parra, V., Verdejo, H., García, L., Quiroga, C., Munafo, D., Díaz-Elizondo, J., Bravo, R., González, M.-J., Diaz-Araya, G., Pedrozo, Z., Chiong, M., Colombo, M. I. & Lavandero, S. Glucose deprivation causes oxidative stress and stimulates aggresome formation and autophagy in cultured cardiac myocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1802**, 509–18 (2010).
157. Troncoso, R., Vicencio, J. M., Parra, V., Nemchenko, A., Kawashima, Y., Del Campo, A., Toro, B., Battiprolu, P. K., Aranguiz, P., Chiong, M., Yakar, S., Gillette, T. G., Hill, J. A., Abel, E. D., Leroith, D. & Lavandero, S. Energy-preserving effects of IGF-1 antagonize starvation-induced cardiac autophagy. *Cardiovasc. Res.* **93**, 320–9 (2012).
158. Gustafsson, A. B. & Gottlieb, R. A. Recycle or die: the role of autophagy in cardioprotection. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **44**, 654–61 (2008).
159. Kim, J., Kundu, M., Viollet, B. & Guan, K.-L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* **13**, 132–41 (2011).
160. Zhang, D., Contu, R., Latronico, M. V. G., Zhang, J., Zhang, J. L., Rizzi, R., Catalucci, D., Miyamoto, S., Huang, K., Ceci, M., Gu, Y., Dalton, N. D., Peterson, K. L., Guan, K.-L., Brown, J. H., Chen, J., Sonenberg, N. & Condorelli, G. MTORC1 regulates cardiac function and myocyte survival through 4E-BP1 inhibition in mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 2805–16 (2010).
161. Inoki, K., Zhu, T. & Guan, K.-L. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* **115**, 577–90 (2003).
162. Shaw, R. J. LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth. *Acta Physiol. (Oxf)*. **196**, 65–80 (2009).
163. Matsui, Y., Takagi, H., Qu, X., Abdellatif, M., Sakoda, H., Asano, T., Levine, B. & Sadoshima, J. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circ. Res.* **100**, 914–22 (2007).
164. Wong, A., Grubb, D. R., Cooley, N., Luo, J. & Woodcock, E. A. Regulation of autophagy in cardiomyocytes by Ins(1,4,5)P(3) and IP(3)-receptors. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **54**, 19–24 (2013).
165. Hoshino, A., Matoba, S., Iwai-Kanai, E., Nakamura, H., Kimata, M., Nakaoka, M., Katamura, M., Okawa, Y., Ariyoshi, M., Mita, Y., Ikeda, K., Ueyama, T., Okigaki, M. & Matsubara, H. p53-TIGAR axis attenuates mitophagy to

- exacerbate cardiac damage after ischemia. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **52**, 175–84 (2012).
166. Enns, L. C., Pettan-Brewer, C. & Ladiges, W. Protein kinase A is a target for aging and the aging heart. *Aging (Albany, NY)*. **2**, 238–43 (2010).
167. Graef, M. & Nunnari, J. Mitochondria regulate autophagy by conserved signalling pathways. *EMBO J.* **30**, 2101–14 (2011).
168. Zhai, P., Sciarretta, S., Galeotti, J., Volpe, M. & Sadoshima, J. Differential roles of GSK-3 β during myocardial ischemia and ischemia/reperfusion. *Circ. Res.* **109**, 502–11 (2011).
169. Pillai, V. B., Sundaresan, N. R., Kim, G., Gupta, M., Rajamohan, S. B., Pillai, J. B., Samant, S., Ravindra, P. V., Isbatan, A. & Gupta, M. P. Exogenous NAD blocks cardiac hypertrophic response via activation of the SIRT3-LKB1-AMP-activated kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **285**, 3133–44 (2010).
170. Mei, Y., Thompson, M. D., Cohen, R. A. & Tong, X. Autophagy and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1852**, 243–251 (2014).
171. Ouimet, M. Autophagy in obesity and atherosclerosis: Interrelationships between cholesterol homeostasis, lipoprotein metabolism and autophagy in macrophages and other systems. *Biochim. Biophys. Acta* **1831**, 1124–33 (2013).
172. Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A. M. & Czaja, M. J. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* **458**, 1131–5 (2009).
173. Gozuacik, D. & Kimchi, A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* **23**, 2891–906 (2004).
174. Razani, B., Feng, C., Coleman, T., Emanuel, R., Wen, H., Hwang, S., Ting, J. P., Virgin, H. W., Kastan, M. B. & Semenkovich, C. F. Autophagy links inflammasomes to atherosclerotic progression. *Cell Metab.* **15**, 534–44 (2012).
175. Crişan, T. O., Plantinga, T. S., van de Veerdonk, F. L., Farcaş, M. F., Stoffels, M., Kullberg, B.-J., van der Meer, J. W. M., Joosten, L. A. B. & Netea, M. G. Inflammasome-independent modulation of cytokine response by autophagy in human cells. *PLoS One* **6**, e18666 (2011).
176. Ma, X., Liu, H., Foyil, S. R., Godar, R. J., Weinheimer, C. J., Hill, J. A. & Diwan, A. Impaired autophagosome clearance contributes to cardiomyocyte death in ischemia/reperfusion injury. *Circulation* **125**, 3170–81 (2012).
177. Hamacher-Brady, A., Brady, N. R. & Gottlieb, R. A. Enhancing macroautophagy protects against ischemia/reperfusion injury in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **281**, 29776–87 (2006).

178. Choi, J. C., Wu, W., Muchir, A., Iwata, S., Homma, S. & Worman, H. J. Dual specificity phosphatase 4 mediates cardiomyopathy caused by lamin A/C (LMNA) gene mutation. *J. Biol. Chem.* **287**, 40513–24 (2012).
179. Choi, J. C. & Worman, H. J. Reactivation of autophagy ameliorates LMNA cardiomyopathy. *Autophagy* **9**, 110–1 (2013).
180. Maejima, Y., Kyoji, S., Zhai, P., Liu, T., Li, H., Ivessa, A., Sciarretta, S., Del Re, D. P., Zablocki, D. K., Hsu, C.-P., Lim, D.-S., Isobe, M. & Sadoshima, J. Mst1 inhibits autophagy by promoting the interaction between Beclin1 and Bcl-2. *Nat. Med.* **19**, 1478–88 (2013).
181. Tannous, P., Zhu, H., Johnstone, J. L., Shelton, J. M., Rajasekaran, N. S., Benjamin, I. J., Nguyen, L., Gerard, R. D., Levine, B., Rothermel, B. A. & Hill, J. A. Autophagy is an adaptive response in desmin-related cardiomyopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 9745–50 (2008).
182. Pattison, J. S., Osinska, H. & Robbins, J. Atg7 induces basal autophagy and rescues autophagic deficiency in CryABR120G cardiomyocytes. *Circ. Res.* **109**, 151–60 (2011).
183. Cao, D. J., Wang, Z. V., Battiprolu, P. K., Jiang, N., Morales, C. R., Kong, Y., Rothermel, B. A., Gillette, T. G. & Hill, J. A. Histone deacetylase (HDAC) inhibitors attenuate cardiac hypertrophy by suppressing autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 4123–8 (2011).
184. Ward, M.-L. & Crossman, D. J. Mechanisms underlying the impaired contractility of diabetic cardiomyopathy. *World J. Cardiol.* **6**, 577–84 (2014).
185. Zou, M.-H. & Xie, Z. Regulation of interplay between autophagy and apoptosis in the diabetic heart: new role of AMPK. *Autophagy* **9**, 624–5 (2013).
186. Russo, S. B., Baicu, C. F., Van Laer, A., Geng, T., Kasiganesan, H., Zile, M. R. & Cowart, L. A. Ceramide synthase 5 mediates lipid-induced autophagy and hypertrophy in cardiomyocytes. *J. Clin. Invest.* **122**, 3919–30 (2012).
187. Lloyd-Jones, D., Adams, R. J., Brown, T. M., Carnethon, M., Dai, S., De Simone, G., Ferguson, T. B., Ford, E., Furie, K., Gillespie, C., Go, A., Greenlund, K., Haase, N., Hailpern, S., Ho, P. M., Howard, V., Kissela, B., Kittner, S., Lackland, D., Lisabeth, L., Marelli, A., McDermott, M. M., Meigs, J., Mozaffarian, D., Mussolino, M., Nichol, G., Roger, V. L., Rosamond, W., Sacco, R., Sorlie, P., Stafford, R., Thom, T., Wasserthiel-Smoller, S., Wong, N. D. & Wylie-Rosett, J. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* **121**, 948–54 (2010).

188. Bhuiyan, M. S., Pattison, J. S., Osinska, H., James, J., Gulick, J., McLendon, P. M., Hill, J. A., Sadoshima, J. & Robbins, J. Enhanced autophagy ameliorates cardiac proteinopathy. *J. Clin. Invest.* **123**, 5284–97 (2013).
189. Kassiotis, C., Ballal, K., Wellnitz, K., Vela, D., Gong, M., Salazar, R., Frazier, O. H. & Taegtmeyer, H. Markers of autophagy are downregulated in failing human heart after mechanical unloading. *Circulation* **120**, S191–7 (2009).
190. Zhu, H., Tannous, P., Johnstone, J. L., Kong, Y., Shelton, J. M., Richardson, J. A., Le, V., Levine, B., Rothermel, B. A. & Hill, J. A. Cardiac autophagy is a maladaptive response to hemodynamic stress. *J. Clin. Invest.* **117**, 1782–93 (2007).
191. Pitt, S. J., Funnell, T. M., Sitsapesan, M., Venturi, E., Rietdorf, K., Ruas, M., Ganesan, A., Gosain, R., Churchill, G. C., Zhu, M. X., Parrington, J., Galione, A. & Sitsapesan, R. TPC2 is a novel NAADP-sensitive Ca²⁺ release channel, operating as a dual sensor of luminal pH and Ca²⁺. *J. Biol. Chem.* **285**, 35039–46 (2010).
192. Rybalchenko, V., Ahuja, M., Coblenz, J., Churamani, D., Patel, S., Kiselyov, K. & Muallem, S. Membrane Potential Regulates Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate (NAADP) Dependence of the pH- and Ca²⁺-sensitive Organellar Two-pore Channel TPC1. *J. Biol. Chem.* **287**, 20407–20416 (2012).
193. Cang, C., Zhou, Y., Navarro, B., Seo, Y.-J., Aranda, K., Shi, L., Battaglia-Hsu, S., Nissim, I., Clapham, D. E. & Ren, D. mTOR regulates lysosomal ATP-sensitive two-pore Na⁽⁺⁾ channels to adapt to metabolic state. *Cell* **152**, 778–90 (2013).
194. Vais, H., Foskett, J. K., Ullah, G., Pearson, J. E. & Mak, D.-O. D. Permeant calcium ion feed-through regulation of single inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channel gating. *J. Gen. Physiol.* **140**, 697–716 (2012).
195. Gillespie, D. & Fill, M. Intracellular calcium release channels mediate their own countercurrent: the ryanodine receptor case study. *Biophys. J.* **95**, 3706–14 (2008).
196. Mayer, M. L. & Westbrook, G. L. Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. *J. Physiol.* **394**, 501–27 (1987).
197. Hedrich, R. & Marten, I. TPC1-SV channels gain shape. *Mol. Plant* **4**, 428–41 (2011).
198. Walseth, T. F., Lin-Moshier, Y., Jain, P., Ruas, M., Parrington, J., Galione, A., Marchant, J. S. & Slama, J. T. Photoaffinity labeling of high affinity nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP)-binding proteins in sea urchin egg. *J. Biol. Chem.* **287**, 2308–15 (2012).

199. Jha, A., Ahuja, M., Patel, S., Brailoiu, E. & Muallem, S. Convergent regulation of the lysosomal two-pore protein kinases. **33**, 501–511 (2014).
200. Pollak, N., Dölle, C. & Ziegler, M. The power to reduce: pyridine nucleotides--small molecules with a multitude of functions. *Biochem. J.* **402**, 205–18 (2007).
201. Guse, A. H. Calcium mobilizing second messengers derived from NAD. *Biochim. Biophys. Acta* **1854**, 1132–1137 (2015).
202. Brailoiu, E., Churamani, D., Pandey, V., Brailoiu, G. C., Tuluc, F., Patel, S. & Dun, N. J. Messenger-specific role for nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate in neuronal differentiation. *J. Biol. Chem.* **281**, 15923–8 (2006).
203. Zhang, Z.-H., Lu, Y.-Y. & Yue, J. Two pore channel 2 differentially modulates neural differentiation of mouse embryonic stem cells. *PLoS One* **8**, e66077 (2013).
204. Aley, P. K., Mikolajczyk, A. M., Munz, B., Churchill, G. C., Galione, A. & Berger, F. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate regulates skeletal muscle differentiation via action at two-pore channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 19927–19932 (2010).
205. Notomi, T., Ezura, Y. & Noda, M. Identification of Two-pore Channel 2 as a Novel Regulator of Osteoclastogenesis. *J. Biol. Chem.* **287**, 35057–35064 (2012).
206. Brailoiu, G. C., Gurzu, B., Gao, X., Parkesh, R., Aley, P. K., Trifa, D. I., Galione, A., Dun, N. J., Madesh, M., Patel, S., Churchill, G. C. & Brailoiu, E. Acidic NAADP-sensitive calcium stores in the endothelium: agonist-specific recruitment and role in regulating blood pressure. *J. Biol. Chem.* **285**, 37133–7 (2010).
207. Esposito, B., Gambarà, G., Lewis, a. M., Palombi, F., D'Alessio, a., Taylor, L. X., Genazzani, a. a., Ziparo, E., Galione, a., Churchill, G. C. & Filippini, a. NAADP links histamine H1 receptors to secretion of von Willebrand factor in human endothelial cells. *Blood* **117**, 4968–4977 (2011).
208. Olsson, A.-K., Dimberg, A., Kreuger, J. & Claesson-Welsh, L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 359–71 (2006).
209. Favia, A., Desideri, M., Gambarà, G., D'Alessio, A., Ruas, M., Esposito, B., Del Bufalo, D., Parrington, J., Ziparo, E., Palombi, F., Galione, A. & Filippini, A. VEGF-induced neoangiogenesis is mediated by NAADP and two-pore channel-2-dependent Ca²⁺ signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, E4706–15 (2014).
210. Tugba Durlu-Kandilci, N., Ruas, M., Chuang, K.-T., Brading, A., Parrington, J. & Galione, A. TPC2 proteins mediate nicotinic acid adenine dinucleotide

- phosphate (NAADP)- and agonist-evoked contractions of smooth muscle. *J. Biol. Chem.* **285**, 24925–32 (2010).
211. Pereira, G. J. S., Hirata, H., do Carmo, L. G., Stilhano, R. S., Ureshino, R. P., Medaglia, N. C., Han, S. W., Churchill, G., Bincoletto, C., Patel, S. & Smaili, S. S. NAADP-sensitive two-pore channels are present and functional in gastric smooth muscle cells. *Cell Calcium* **56**, 51–8 (2014).
212. Mayle, K. M., Le, A. M. & Kamei, D. T. The intracellular trafficking pathway of transferrin. *Biochim. Biophys. Acta* **1820**, 264–81 (2012).
213. Bissig, C. & Gruenberg, J. Lipid sorting and multivesicular endosome biogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a016816 (2013).
214. Grimm, C., Holdt, L. M., Chen, C.-C., Hassan, S., Müller, C., Jörs, S., Cuny, H., Kissing, S., Schröder, B., Butz, E., Northoff, B., Castonguay, J., Lubber, C. A., Moser, M., Spahn, S., Lüllmann-Rauch, R., Fendel, C., Klugbauer, N., Griesbeck, O., Haas, A., Mann, M., Bracher, F., Teupser, D., Saftig, P., Biel, M. & Wahl-Schott, C. High susceptibility to fatty liver disease in two-pore channel 2-deficient mice. *Nat. Commun.* **5**, 4699 (2014).
215. Lear, P. V., González-Touceda, D., Porteiro Couto, B., Viaño, P., Guymer, V., Remzova, E., Tunn, R., Chalasani, A., García-Caballero, T., Hargreaves, I. P., Tynan, P. W., Christian, H. C., Nogueiras, R., Parrington, J. & Diéguez, C. Absence of Intracellular Ion Channels TPC1 and TPC2 Leads to Mature-Onset Obesity in Male Mice, Due to Impaired Lipid Availability for Thermogenesis in Brown Adipose Tissue. *Endocrinology* **156**, 975–986 (2015).
216. Pereira, G. J. S., Hirata, H., Fimia, G. M., do Carmo, L. G., Bincoletto, C., Han, S. W., Stilhano, R. S., Ureshino, R. P., Bloor-Young, D., Churchill, G., Piacentini, M., Patel, S. & Smaili, S. S. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) regulates autophagy in cultured astrocytes. *J. Biol. Chem.* **286**, 27875–81 (2011).
217. Neely Kayala, K. M., Dickinson, G. D., Minassian, A., Walls, K. C., Green, K. N. & Laferla, F. M. Presenilin-null cells have altered two-pore calcium channel expression and lysosomal calcium: implications for lysosomal function. *Brain Res.* **1489**, 8–16 (2012).
218. Lu, Y., Hao, B.-X., Graeff, R., Wong, C. W. M., Wu, W.-T. & Yue, J. Two pore channel 2 (TPC2) inhibits autophagosomal-lysosomal fusion by alkalizing lysosomal pH. *J. Biol. Chem.* **288**, 24247–63 (2013).
219. Lin, P.-H., Duann, P., Komazaki, S., Park, K. H., Li, H., Sun, M., Sermersheim, M., Gumper, K., Parrington, J., Galione, A., Evans, A. M., Zhu, M. X. & Ma, J. Lysosomal two-pore channel subtype 2 (TPC2) regulates skeletal muscle autophagic signaling. *J. Biol. Chem.* **290**, 3377–89 (2014).

220. Lam, A. K. M., Galione, A., Lai, F. A. & Zissimopoulos, S. Hax-1 identified as a two-pore channel (TPC)-binding protein. *FEBS Lett.* **587**, 3782–6 (2013).
221. Feldmann, H. & Geisbert, T. W. Ebola haemorrhagic fever. *Lancet* **377**, 849–62 (2011).
222. Dolnik, O., Kolesnikova, L. & Becker, S. Filoviruses: Interactions with the host cell. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 756–76 (2008).
223. Nanbo, A., Imai, M., Watanabe, S., Noda, T., Takahashi, K., Neumann, G., Halfmann, P. & Kawaoka, Y. Ebolavirus is internalized into host cells via macropinocytosis in a viral glycoprotein-dependent manner. *PLoS Pathog.* **6**, e1001121 (2010).
224. Saeed, M. F., Kolokoltsov, A. A., Albrecht, T. & Davey, R. A. Cellular entry of ebola virus involves uptake by a macropinocytosis-like mechanism and subsequent trafficking through early and late endosomes. *PLoS Pathog.* **6**, e1001110 (2010).
225. Sakurai, Y., Kolokoltsov, A. A., Chen, C.-C., Tidwell, M. W., Bauta, W. E., Klugbauer, N., Grimm, C., Wahl-Schott, C., Biel, M. & Davey, R. A. Two-pore channels control Ebola virus host cell entry and are drug targets for disease treatment. *Science (80-.)*. **347**, 995–998 (2015).
226. Shen, D., Wang, X. & Xu, H. Pairing phosphoinositides with calcium ions in endolysosomal dynamics: phosphoinositides control the direction and specificity of membrane trafficking by regulating the activity of calcium channels in the endolysosomes. *Bioessays* **33**, 448–57 (2011).
227. Dong, X., Shen, D., Wang, X., Dawson, T., Li, X., Zhang, Q., Cheng, X., Zhang, Y., Weisman, L. S., Delling, M. & Xu, H. PI(3,5)P(2) controls membrane trafficking by direct activation of mucolipin Ca(2+) release channels in the endolysosome. *Nat. Commun.* **1**, 38 (2010).
228. Settembre, C., Fraldi, A., Medina, D. L. & Ballabio, A. Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 283–96 (2013).
229. Betz, C. & Hall, M. N. Where is mTOR and what is it doing there? *J. Cell Biol.* **203**, 563–74 (2013).
230. Laplante, M. & Sabatini, D. M. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* **149**, 274–93 (2012).
231. Puertollano, R. mTOR and lysosome regulation. *F1000Prime Rep.* **6**, 52 (2014).

232. Aarhus, R., Graeff, R. M., Dickey, D. M., Walseth, T. F. & Lee, H. C. ADP-ribose cyclase and CD38 catalyze the synthesis of a calcium-mobilizing metabolite from NADP. *J. Biol. Chem.* **270**, 30327–33 (1995).
233. Higashida, H., Egorova, A., Higashida, C., Zhong, Z. G., Yokoyama, S., Noda, M. & Zhang, J. S. Sympathetic potentiation of cyclic ADP-ribose formation in rat cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **274**, 33348–54 (1999).
234. Macgregor, A., Yamasaki, M., Rakovic, S., Sanders, L., Parkesh, R., Churchill, G. C., Galione, A. & Terrar, D. A. NAADP controls cross-talk between distinct Ca²⁺ stores in the heart. *J. Biol. Chem.* **282**, 15302–11 (2007).
235. Touchberry, C. D., Bales, I. K., Stone, J. K., Rohrberg, T. J., Parelkar, N. K., Nguyen, T., Fuentes, O., Liu, X., Qu, C.-K., Andresen, J. J., Valdivia, H. H., Brotto, M. & Wacker, M. J. Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate (PI(3,5)P₂) potentiates cardiac contractility via activation of the ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.* **285**, 40312–21 (2010).
236. Amin, A. S., Tan, H. L. & Wilde, A. A. M. Cardiac ion channels in health and disease. *Heart Rhythm* **7**, 117–26 (2010).
237. Burr, A. R., Millay, D. P., Goonasekera, S. A., Park, K. H., Sargent, M. A., Collins, J., Altamirano, F., Philipson, K. D., Allen, P. D., Ma, J., López, J. R. & Molkenin, J. D. Na⁺ dysregulation coupled with Ca²⁺ entry through NCX1 promotes muscular dystrophy in mice. *Mol. Cell. Biol.* **34**, 1991–2002 (2014).
238. Levi, A. J., Dalton, G. R., Hancox, J. C., Mitcheson, J. S., Issberner, J., Bates, J. A., Evans, S. J., Howarth, F. C., Hobai, I. A. & Jones, J. V. Role of intracellular sodium overload in the genesis of cardiac arrhythmias. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **8**, 700–21 (1997).
239. Armstrong, M. T., Lee, D. Y. & Armstrong, P. B. Regulation of proliferation of the fetal myocardium. *Dev. Dyn.* **219**, 226–36 (2000).
240. Claycomb, W. C., Lanson, N. A., Stallworth, B. S., Egeland, D. B., Delcarpio, J. B., Bahinski, A. & Izzo, N. J. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 2979–84 (1998).
241. López, J. L. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **849**, 190–202 (2007).
242. Tuli, L. & Ransom, H. W. LC-MS Based Detection of Differential Protein Expression. *J. Proteomics Bioinform.* **2**, 416–438 (2009).
243. Zhang, X., Fang, A., Riley, C. P., Wang, M., Regnier, F. E. & Buck, C. Multi-dimensional liquid chromatography in proteomics—a review. *Anal. Chim. Acta* **664**, 101–13 (2010).

244. Bonzon-Kulichenko, E., Pérez-Hernández, D., Núñez, E., Martínez-Acedo, P., Navarro, P., Trevisan-Herraz, M., Ramos, M. del C., Sierra, S., Martínez-Martínez, S., Ruiz-Meana, M., Miró-Casas, E., García-Dorado, D., Redondo, J. M., Burgos, J. S. & Vázquez, J. A robust method for quantitative high-throughput analysis of proteomes by ¹⁸O labeling. *Mol. Cell. Proteomics* **10**, M110.003335 (2011).
245. Perez-Hernandez, D., Gutiérrez-Vázquez, C., Jorge, I., López-Martín, S., Ursa, A., Sánchez-Madrid, F., Vázquez, J. & Yáñez-Mó, M. The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes. *J. Biol. Chem.* **288**, 11649–61 (2013).
246. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. & Mann, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* **68**, 850–8 (1996).
247. ImageJ. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>
248. Zhong, X. Y., Holzgreve, W. & Huang, D. J. Isolation of cell-free RNA from maternal plasma. *Methods Mol. Biol.* **444**, 269–73 (2008).
249. Kararigas, G., Fliegner, D., Forler, S., Klein, O., Schubert, C., Gustafsson, J.-Å., Klose, J. & Regitz-Zagrosek, V. Comparative proteomic analysis reveals sex and estrogen receptor β effects in the pressure overloaded heart. *J. Proteome Res.* **13**, 5829–36 (2014).
250. Chiou, S.-H. & Wu, C.-Y. Clinical proteomics: current status, challenges, and future perspectives. *Kaohsiung J. Med. Sci.* **27**, 1–14 (2011).
251. Chevalier, F. Highlights on the capacities of ‘Gel-based’ proteomics. *Proteome Sci.* **8**, 23 (2010).
252. Alonso-Orgaz, S., Moreno-Luna, R., López, J. A., Gil-Dones, F., Padial, L. R., Moreu, J., de la Cuesta, F. & Barderas, M. G. Proteomic characterization of human coronary thrombus in patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction. *J. Proteomics* **109C**, 368–381 (2014).
253. Bollineni, R. C., Fedorova, M., Blüher, M. & Hoffmann, R. Carbonylated plasma proteins as potential biomarkers of obesity induced type 2 diabetes mellitus. *J. Proteome Res.* **13**, 5081–93 (2014).
254. Bergamini, S., Bellei, E., Reggiani Bonetti, L., Monari, E., Cuoghi, A., Borelli, F., Sighinolfi, M. C., Bianchi, G., Ozben, T. & Tomasi, A. Inflammation: an important parameter in the search of prostate cancer biomarkers. *Proteome Sci.* **12**, 32 (2014).
255. Shevchenko, V. E., Kovalev, S. V, Arnotskaya, N. E., Zborovskaya, I. B., Akhmedov, B. B., Polotskii, B. E., Kostin, A. U., Moukeria, A. F., Zaridze, D. G.

- & Davidov, M. I. Human blood plasma proteome mapping for search of potential markers of the lung squamous cell carcinoma. *Eur. J. Mass Spectrom. (Chichester, Eng)*. **19**, 123–33 (2013).
256. Comunian, C., Rusconi, F., De Palma, A., Brunetti, P., Catalucci, D. & Mauri, P. L. A comparative MudPIT analysis identifies different expression profiles in heart compartments. *Proteomics* **11**, 2320–8 (2011).
257. Keller, A., Peltzer, J., Carpentier, G., Horváth, I., Oláh, J., Duchesnay, A., Orosz, F. & Ovádi, J. Interactions of enolase isoforms with tubulin and microtubules during myogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1770**, 919–26 (2007).
258. Hong, M., Kefaloyianni, E., Bao, L., Malester, B., Delaroche, D., Neubert, T. A. & Coetzee, W. A. Cardiac ATP-sensitive K⁺ channel associates with the glycolytic enzyme complex. *FASEB J.* **25**, 2456–67 (2011).
259. Mizukami, Y., Iwamatsu, A., Aki, T., Kimura, M., Nakamura, K., Nao, T., Okusa, T., Matsuzaki, M., Yoshida, K.-I. & Kobayashi, S. ERK1/2 regulates intracellular ATP levels through alpha-enolase expression in cardiomyocytes exposed to ischemic hypoxia and reoxygenation. *J. Biol. Chem.* **279**, 50120–31 (2004).
260. Zhou, S.-G., Zhou, S.-F., Huang, H.-Q., Chen, J.-W., Huang, M. & Liu, P.-Q. Proteomic analysis of hypertrophied myocardial protein patterns in renovascularly hypertensive and spontaneously hypertensive rats. *J. Proteome Res.* **5**, 2901–8 (2006).
261. Lay, A. J., Jiang, X. M., Kisker, O., Flynn, E., Underwood, A., Condron, R. & Hogg, P. J. Phosphoglycerate kinase acts in tumour angiogenesis as a disulphide reductase. *Nature* **408**, 869–73 (2000).
262. Wang, R., Liang, J., Jiang, H., Qin, L.-J. & Yang, H.-T. Promoter-dependent EGFP expression during embryonic stem cell propagation and differentiation. *Stem Cells Dev.* **17**, 279–89 (2008).
263. Abdel, S. *Cardiac Metabolism in Health and Disease*. (Springer Science & Business Media, 2012). at <<https://books.google.com/books?id=iFHABwAAQBAJ&pgis=1>>
264. Abel, E. D. Glucose transport in the heart. *Front. Biosci.* **9**, 201–15 (2004).
265. Oliván, S., Calvo, A. C., Manzano, R., Zaragoza, P. & Osta, R. Sex differences in constitutive autophagy. *Biomed Res. Int.* **2014**, 652817 (2014).
266. Despa, S. & Bers, D. M. Na⁺ transport in the normal and failing heart - remember the balance. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **61**, 2–10 (2013).

267. Bay, J., Kohlhaas, M. & Maack, C. Intracellular Na⁺ and cardiac metabolism. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **61**, 20–7 (2013).
268. Cruz-Topete, D., List, E. O., Okada, S., Kelder, B. & Kopchick, J. J. Proteomic changes in the heart of diet-induced pre-diabetic mice. *J. Proteomics* **74**, 716–27 (2011).
269. Higa, L. M., Curi, B. M., Aguiar, R. S., Cardoso, C. C., De Lorenzi, A. G., Sena, S. L. F., Zingali, R. B. & Da Poian, A. T. Modulation of α -enolase post-translational modifications by dengue virus: increased secretion of the basic isoforms in infected hepatic cells. *PLoS One* **9**, e88314 (2014).
270. Zhou, W., Capello, M., Fredolini, C., Piemonti, L., Liotta, L. A., Novelli, F. & Petricoin, E. F. Mass spectrometry analysis of the post-translational modifications of alpha-enolase from pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *J. Proteome Res.* **9**, 2929–36 (2010).
271. Rikova, K., Guo, A., Zeng, Q., Possemato, A., Yu, J., Haack, H., Nardone, J., Lee, K., Reeves, C., Li, Y., Hu, Y., Tan, Z., Stokes, M., Sullivan, L., Mitchell, J., Wetzel, R., Macneill, J., Ren, J. M., Yuan, J., Bakalarski, C. E., Villen, J., Kornhauser, J. M., Smith, B., Li, D., Zhou, X., Gygi, S. P., Gu, T.-L., Polakiewicz, R. D., Rush, J. & Comb, M. J. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* **131**, 1190–203 (2007).
272. Yu, L.-R., Zhu, Z., Chan, K. C., Issaq, H. J., Dimitrov, D. S. & Veenstra, T. D. Improved titanium dioxide enrichment of phosphopeptides from HeLa cells and high confident phosphopeptide identification by cross-validation of MS/MS and MS/MS/MS spectra. *J. Proteome Res.* **6**, 4150–62 (2007).
273. Perluigi, M., Poon, H. F., Maragos, W., Pierce, W. M., Klein, J. B., Calabrese, V., Cini, C., De Marco, C. & Butterfield, D. A. Proteomic analysis of protein expression and oxidative modification in r6/2 transgenic mice: a model of Huntington disease. *Mol. Cell. Proteomics* **4**, 1849–61 (2005).
274. Castegna, A., Thongboonkerd, V., Klein, J. B., Lynn, B., Markesbery, W. R. & Butterfield, D. A. Proteomic identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain. *J. Neurochem.* **85**, 1394–401 (2003).
275. Newman, S. F., Sultana, R., Perluigi, M., Coccia, R., Cai, J., Pierce, W. M., Klein, J. B., Turner, D. M. & Butterfield, D. A. An increase in S-glutathionylated proteins in the Alzheimer's disease inferior parietal lobule, a proteomics approach. *J. Neurosci. Res.* **85**, 1506–14 (2007).
276. Peng, C., Lu, Z., Xie, Z., Cheng, Z., Chen, Y., Tan, M., Luo, H., Zhang, Y., He, W., Yang, K., Zwaans, B. M. M., Tishkoff, D., Ho, L., Lombard, D., He, T.-C., Dai, J., Verdin, E., Ye, Y. & Zhao, Y. The first identification of lysine malonylation substrates and its regulatory enzyme. *Mol. Cell. Proteomics* **10**, M111.012658 (2011).

277. Lu, N., Zhang, Y., Li, H. & Gao, Z. Oxidative and nitrative modifications of alpha-enolase in cardiac proteins from diabetic rats. *Free Radic. Biol. Med.* **48**, 873–81 (2010).
278. Burniston, J. G. & Hoffman, E. P. Proteomic responses of skeletal and cardiac muscle to exercise. *Expert Rev. Proteomics* **8**, 361–77 (2011).
279. Gallego-Delgado, J., Lazaro, A., Osende, J. I., Barderas, M. G., Duran, M. C., Vivanco, F. & Egido, J. Comparison of the protein profile of established and regressed hypertension-induced left ventricular hypertrophy. *J. Proteome Res.* **5**, 404–13 (2006).
280. Junhong, W., Jing, Y., Jizheng, M., Shushu, Z., Xiangjian, C., Hengfang, W., Di, Y. & Jinan, Z. Proteomic analysis of left ventricular diastolic dysfunction hearts in renovascular hypertensive rats. *Int. J. Cardiol.* **127**, 198–207 (2008).
281. Keller, A., Rouzeau, J. D., Farhadian, F., Wisnewsky, C., Marotte, F., Lamandé, N., Samuel, J. L., Schwartz, K., Lazar, M. & Lucas, M. Differential expression of alpha- and beta-enolase genes during rat heart development and hypertrophy. *Am. J. Physiol.* **269**, H1843–51 (1995).
282. Chosa, E., Sekimoto, T., Sonoda, N., Yamamoto, K., Matsuda, H., Takahama, K. & Tajima, N. Evaluation of human beta-enolase as a serum marker for exercise-induced muscle damage. *Clin. J. Sport Med.* **13**, 209–12 (2003).
283. Sweet, S. M. M., Bailey, C. M., Cunningham, D. L., Heath, J. K. & Cooper, H. J. Large scale localization of protein phosphorylation by use of electron capture dissociation mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* **8**, 904–12 (2009).
284. Chung, S., Arrell, D. K., Faustino, R. S., Terzic, A. & Dzeja, P. P. Glycolytic network restructuring integral to the energetics of embryonic stem cell cardiac differentiation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **48**, 725–34 (2010).
285. Steinbusch, L. K. M., Wijnen, W., Schwenk, R. W., Coumans, W. A., Hoebers, N. T. H., Ouwens, D. M., Diamant, M., Bonen, A., Glatz, J. F. C. & Luiken, J. J. F. P. Differential regulation of cardiac glucose and fatty acid uptake by endosomal pH and actin filaments. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **298**, C1549–59 (2010).
286. Lopaschuk, G. D., Ussher, J. R., Folmes, C. D. L., Jaswal, J. S. & Stanley, W. C. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol. Rev.* **90**, 207–58 (2010).
287. Kolwicz, S. C., Purohit, S. & Tian, R. Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes. *Circ. Res.* **113**, 603–16 (2013).

288. Sen, S., Kundu, B. K., Wu, H. C.-J., Hashmi, S. S., Guthrie, P., Locke, L. W., Roy, R. J., Matherne, G. P., Berr, S. S., Terwelp, M., Scott, B., Carranza, S., Frazier, O. H., Glover, D. K., Dillmann, W. H., Gambello, M. J., Entman, M. L. & Taegtmeier, H. Glucose regulation of load-induced mTOR signaling and ER stress in mammalian heart. *J. Am. Heart Assoc.* **2**, e004796 (2013).
289. Wasserman, D. H., Kang, L., Ayala, J. E., Fueger, P. T. & Lee-Young, R. S. The physiological regulation of glucose flux into muscle in vivo. *J. Exp. Biol.* **214**, 254–62 (2011).
290. Xu, K. Y., Zweier, J. L. & Becker, L. C. Functional Coupling Between Glycolysis and Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Transport. *Circ. Res.* **77**, 88–97 (1995).
291. Kawase, Y. & Hajjar, R. J. The cardiac sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase: a potent target for cardiovascular diseases. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* **5**, 554–65 (2008).
292. Rawat, D. K., Hecker, P., Watanabe, M., Chettimada, S., Levy, R. J., Okada, T., Edwards, J. G. & Gupte, S. A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and NADPH redox regulates cardiac myocyte L-type calcium channel activity and myocardial contractile function. *PLoS One* **7**, e45365 (2012).
293. Contreras-Ferrat, A. E., Toro, B., Bravo, R., Parra, V., Vásquez, C., Ibarra, C., Mears, D., Chiong, M., Jaimovich, E., Klip, A. & Lavandero, S. An inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃)-IP₃ receptor pathway is required for insulin-stimulated glucose transporter 4 translocation and glucose uptake in cardiomyocytes. *Endocrinology* **151**, 4665–77 (2010).
294. Zeng, Z., Zhang, H., Lin, N., Kang, M., Zheng, Y., Li, C., Xu, P., Wu, Y. & Luo, D. Role of inositol-1,4,5-trisphosphate receptor in the regulation of calcium transients in neonatal rat ventricular myocytes. *J. Pharmacol. Sci.* **126**, 37–46 (2014).
295. Zhang, Z., Zhang, W., Jung, D. Y., Ko, H. J., Lee, Y., Friedline, R. H., Lee, E., Jun, J., Ma, Z., Kim, F., Tsitsilianos, N., Chapman, K., Morrison, A., Cooper, M. P., Miller, B. A. & Kim, J. K. TRPM2 Ca²⁺ channel regulates energy balance and glucose metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **302**, E807–16 (2012).
296. Pérez-Sanz, T. M. & de Luis, D. A. Fatty Acid Binding Proteins and Cardiovascular Risk. *Curr. Cardiovasc. Risk Rep.* **7**, 17–24 (2012).
297. Binas, B., Danneberg, H., McWhir, J., Mullins, L. & Clark, A. J. Requirement for the heart-type fatty acid binding protein in cardiac fatty acid utilization. *FASEB J.* **13**, 805–12 (1999).

298. Kusudo, T., Kontani, Y., Kataoka, N., Ando, F., Shimokata, H. & Yamashita, H. Fatty acid-binding protein 3 stimulates glucose uptake by facilitating AS160 phosphorylation in mouse muscle cells. *Genes Cells* **16**, 681–91 (2011).
299. Barba, I., Chavarria, L., Ruiz-Meana, M., Mirabet, M., Agulló, E. & Garcia-Dorado, D. Effect of intracellular lipid droplets on cytosolic Ca²⁺ and cell death during ischaemia-reperfusion injury in cardiomyocytes. *J. Physiol.* **587**, 1331–41 (2009).
300. Osellame, L. D., Blacker, T. S. & Duchen, M. R. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **26**, 711–23 (2012).
301. Papa, I., Astier, C., Kwiatek, O., Raynaud, F., Bonnal, C., Lebart, M.-C., Roustan, C. & Benyamin, Y. Alpha actinin–CapZ, an anchoring complex for thin filaments in Z-line. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **20**, 187–197
302. Lehman, W., Hatch, V., Korman, V., Rosol, M., Thomas, L., Maytum, R., Geeves, M. A., Van Eyk, J. E., Tobacman, L. S. & Craig, R. Tropomyosin and actin isoforms modulate the localization of tropomyosin strands on actin filaments. *J. Mol. Biol.* **302**, 593–606 (2000).
303. Sequeira, V., Nijenkamp, L. L. A. M., Regan, J. A. & van der Velden, J. The physiological role of cardiac cytoskeleton and its alterations in heart failure. *Biochim. Biophys. Acta* **1838**, 700–22 (2014).
304. Willis, M. S., Schisler, J. C., Portbury, A. L. & Patterson, C. Build it up–Tear it down: protein quality control in the cardiac sarcomere. *Cardiovasc. Res.* **81**, 439–48 (2009).
305. Zhu, M. X., Ma, J., Parrington, J., Calcrafft, P. J., Galione, A. & Evans, a M. Calcium signaling via two-pore channels: local or global, that is the question. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **298**, C430–41 (2010).
306. Gandini, M. A. & Felix, R. Molecular and functional interplay of voltage-gated Ca²⁺ channels with the cytoskeleton. *Curr. Mol. Pharmacol.* (2015). at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25966702>>
307. Stutzmann, G. E. & Mattson, M. P. Endoplasmic reticulum Ca(2+) handling in excitable cells in health and disease. *Pharmacol. Rev.* **63**, 700–27 (2011).
308. Ding, W., Li, Z., Shen, X., Martin, J., King, S. B., Sivakumaran, V., Paolocci, N. & Gao, W. D. Reversal of isoflurane-induced depression of myocardial contraction by nitroxyl via myofilament sensitization to Ca²⁺. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **339**, 825–31 (2011).

309. Lavandero, S., Troncoso, R., Rothermel, B. A., Martinet, W., Sadoshima, J. & Hill, J. A. Cardiovascular autophagy: concepts, controversies, and perspectives. *Autophagy* **9**, 1455–66 (2013).
310. Roberts, D. J., Tan-Sah, V. P., Ding, E. Y., Smith, J. M. & Miyamoto, S. Hexokinase-II positively regulates glucose starvation-induced autophagy through TORC1 inhibition. *Mol. Cell* **53**, 521–33 (2014).
311. Kundu, M. Too sweet for autophagy: hexokinase inhibition of mTORC1 activates autophagy. *Mol. Cell* **53**, 517–8 (2014).
312. Nemchenko, A., Chiong, M., Turer, A., Lavandero, S. & Hill, J. A. Autophagy as a therapeutic target in cardiovascular disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **51**, 584–93 (2011).
313. Lu, Y., Hao, B., Graeff, R. & Yue, J. NAADP/TPC2/Ca(2+) Signaling Inhibits Autophagy. *Commun. Integr. Biol.* **6**, e27595 (2013).
314. Sciarretta, S., Yee, D., Shenoy, V., Nagarajan, N. & Sadoshima, J. The importance of autophagy in cardioprotection. *High Blood Press. Cardiovasc. Prev.* **21**, 21–8 (2014).
315. Jimenez, R. E., Kubli, D. A. & Gustafsson, Å. B. Autophagy and mitophagy in the myocardium: therapeutic potential and concerns. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 1907–16 (2014).
316. Liu, C., Xue, R., Wu, D., Wu, L., Chen, C., Tan, W., Chen, Y. & Dong, Y. REDD1 attenuates cardiac hypertrophy via enhancing autophagy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **454**, 215–20 (2014).
317. Sahani, M. H., Itakura, E. & Mizushima, N. Expression of the autophagy substrate SQSTM1/p62 is restored during prolonged starvation depending on transcriptional upregulation and autophagy-derived amino acids. *Autophagy* **10**, 431–41 (2014).
318. Guha, S. & Padh, H. Cathepsins: fundamental effectors of endolysosomal proteolysis. *Indian J. Biochem. Biophys.* **45**, 75–90 (2008).
319. Lin-Moshier, Y., Keebler, M. V, Hooper, R., Boulware, M. J., Liu, X., Churamani, D., Abood, M. E., Walseth, T. F., Brailoiu, E., Patel, S. & Marchant, J. S. The Two-pore channel (TPC) interactome unmasks isoform-specific roles for TPCs in endolysosomal morphology and cell pigmentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 13087–92 (2014).
320. Hockey, L. N., Kilpatrick, B. S., Eden, E. R., Lin-Moshier, Y., Brailoiu, G. C., Brailoiu, E., Futter, C. E., Schapira, A. H., Marchant, J. S. & Patel, S. Dysregulation of lysosomal morphology by pathogenic LRRK2 is corrected by TPC2 inhibition. *J. Cell Sci.* **128**, 232–8 (2015).

321. Iwai-Kanai, E., Yuan, H., Huang, C., Sayen, M. R., Perry-Garza, C. N., Kim, L. & Gottlieb, R. A. A method to measure cardiac autophagic flux in vivo. *Autophagy* **4**, 322–9 (2008).
322. Haspel, J., Shaik, R. S., Ifedigbo, E., Nakahira, K., Dolinay, T., Englert, J. A. & Choi, A. M. K. Characterization of macroautophagic flux in vivo using a leupeptin-based assay. *Autophagy* **7**, 629–42 (2011).
323. Xie, M., Kong, Y., Tan, W., May, H., Battiprolu, P. K., Pedrozo, Z., Wang, Z. V., Morales, C., Luo, X., Cho, G., Jiang, N., Jessen, M. E., Warner, J. J., Lavandero, S., Gillette, T. G., Turer, A. T. & Hill, J. A. Histone deacetylase inhibition blunts ischemia/reperfusion injury by inducing cardiomyocyte autophagy. *Circulation* **129**, 1139–51 (2014).
324. Hariharan, N., Ikeda, Y., Hong, C., Alcendor, R. R., Usui, S., Gao, S., Maejima, Y. & Sadoshima, J. Autophagy plays an essential role in mediating regression of hypertrophy during unloading of the heart. *PLoS One* **8**, e51632 (2013).
325. Ren, S. Y. & Xu, X. Role of autophagy in metabolic syndrome-associated heart disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1852**, 225–231 (2015).
326. Xu, X., Hua, Y., Nair, S., Zhang, Y. & Ren, J. Akt2 knockout preserves cardiac function in high-fat diet-induced obesity by rescuing cardiac autophagosome maturation. *J. Mol. Cell Biol.* **5**, 212–212 (2013).
327. Li, Z.-L., Woollard, J. R., Ebrahimi, B., Crane, J. A., Jordan, K. L., Lerman, A., Wang, S.-M. & Lerman, L. O. Transition from obesity to metabolic syndrome is associated with altered myocardial autophagy and apoptosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 1132–41 (2012).
328. Ceylan-Isik, A. F., Kandadi, M. R., Xu, X., Hua, Y., Chicco, A. J., Ren, J. & Nair, S. Apelin administration ameliorates high fat diet-induced cardiac hypertrophy and contractile dysfunction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **63**, 4–13 (2013).
329. Hua, Y., Zhang, Y., Dolence, J., Shi, G.-P., Ren, J. & Nair, S. Cathepsin K knockout mitigates high-fat diet-induced cardiac hypertrophy and contractile dysfunction. *Diabetes* **62**, 498–509 (2013).
330. Mahajan, R., Lau, D. H. & Sanders, P. Impact of obesity on cardiac metabolism, fibrosis, and function. *Trends Cardiovasc. Med.* **25**, 119–126 (2015).
331. Campbell, T. L., Mitchell, A. S., McMillan, E. M., Bloemberg, D., Pavlov, D., Messa, I., Mielke, J. G. & Quadriatero, J. High-fat feeding does not induce an autophagic or apoptotic phenotype in female rat skeletal muscle. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. **240**, 657–68 (2015).
332. Lancel, S., Montaigne, D., Marechal, X., Marciniak, C., Hassoun, S. M., Decoster, B., Ballot, C., Blazejewski, C., Corseaux, D., Lescure, B., Motterlini,

- R. & Nevieri, R. Carbon monoxide improves cardiac function and mitochondrial population quality in a mouse model of metabolic syndrome. *PLoS One* **7**, e41836 (2012).
333. Cui, M., Yu, H., Wang, J., Gao, J. & Li, J. Chronic caloric restriction and exercise improve metabolic conditions of dietary-induced obese mice in autophagy correlated manner without involving AMPK. *J. Diabetes Res.* **2013**, 852754 (2013).
334. Reichelt, M. E., Mellor, K. M., Curl, C. L., Stapleton, D. & Delbridge, L. M. D. Myocardial glycophagy - a specific glycogen handling response to metabolic stress is accentuated in the female heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **65**, 67–75 (2013).
335. Koenig, A., Sateriale, A., Budd, R. C., Huber, S. A. & Buskiewicz, I. A. The role of sex differences in autophagy in the heart during coxsackievirus B3-induced myocarditis. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* **7**, 182–91 (2014).
336. Renfree, M. B., Chew, K. Y. & Shaw, G. Hormone-independent pathways of sexual differentiation. *Sex Dev.* **8**, 327–36 (2014).
337. Gottlieb, R. A. & Mentzer, R. M. Autophagy: an affair of the heart. *Heart Fail. Rev.* **18**, 575–84 (2013).
338. Yano, M., Ikeda, Y. & Matsuzaki, M. Altered intracellular Ca²⁺ handling in heart failure. *J. Clin. Invest.* **115**, 556–64 (2005).
339. Dulhunty, A. F., Casarotto, M. G. & Beard, N. A. The ryanodine receptor: a pivotal Ca²⁺ regulatory protein and potential therapeutic drug target. *Curr. Drug Targets* **12**, 709–23 (2011).
340. Harzheim, D., Movassagh, M., Foo, R. S.-Y., Ritter, O., Tashfeen, A., Conway, S. J., Bootman, M. D. & Roderick, H. L. Increased InsP3Rs in the junctional sarcoplasmic reticulum augment Ca²⁺ transients and arrhythmias associated with cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 11406–11411 (2009).



ANEXO

**Artículos ya publicados que continen datos
perteneientes a este trabajo de tesis.**



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3368932/>



