

2010 Diciembre, 2(2): 1-1

IDENTIFICACIÓN DE FOSFORILACIONES CaMKII-dependientes EN MITOCONDRIAS AISLADAS DE CORAZÓN DE RATA

Valverde CA, Pellon M, Landoni M, Couto A, Mattiazzi A

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas – UNLP. CCT-CONICET, La Plata

e-mail: valverdeca@med.unlp.edu.ar

Introducción

La participación de CaMKII en la apoptosis ha sido demostrada hace varios años. En nuestro laboratorio hemos descrito que la muerte por apoptosis/necrosis inducida por isquemia/reperfusión (IR) es mediada por CaMKII a nivel del retículo sarcoplasmático (RS), y que además, en este proceso participan las mitocondrias. Aún no se sabe si la fosforilación dependiente de CaMKII de proteínas mitocondriales es responsable de parte del este efecto deletéreo en la IR. La hipótesis es que el aumento del Ca^{2+} citosólico y posterior activación de CaMKII en la IR, podría fosforilar proteínas no sólo del RS (ya demostrado) sino además de las mitocondrias, por un aumento en la concentración local de Ca^{2+} y transferencia en el microdominio mitocondrias-RS. Esto permitiría una activación de CaMKII localmente y la fosforilación de proteínas, afectando la función mitocondrial y contribuyendo al efecto deletéreo de la CaMKII en la IR.

Objetivo

Se propone estudiar la presencia e identificar proteínas blanco de CaMKII a nivel mitocondrial o de su interacción con el RS.

Materiales y métodos

Se realizó el aislamiento y purificación de mitocondrias de corazón de rata. Luego, se purificaron las mitocondrias por centrifugación diferencial, se aislaron las membranas asociadas a mitocondrias (MAM), y finalmente se realizó el subfraccionamiento (membrana interna, externa de mitocondrias, y sitios de contacto de mitocondrias/RS). El correcto aislamiento y purificación de mitocondrias y membranas asociadas a mitocondrias se caracterizó por Western Blot. Luego se sometieron las diferentes fracciones de mitocondrias de corazón de rata a fosforilación *in vitro* con CaMKII exógena en presencia de ATP marcado radiactivamente.

Resultados

La fosforilación *in vitro* con ^{32}P -ATP de mitocondrias puras y la autorradiografía de geles SDS-PAGE indicó la fosforilación de al menos 5 proteínas blanco de CaMKII. La fosforilación *in vitro* en presencia de un inhibidor específico de CaMKII, aún en presencia de Ca^{2+} y CaM, señala la especificidad de la fosforilación por CaMKII de 3 proteínas de las cuales resulta de interés una banda de ~20 KDa. Por estudio del subfraccionamiento esta banda correspondería a una localización en membrana externa. Se están realizando estudios por espectrometría de masa para identificar dicha proteína.

Conclusiones

Estos resultados demuestran la presencia de proteínas con localización mitocondrial capaces de ser fosforiladas *in vitro* por CaMKII en el corazón de rata. Cabe aún evaluar el rol de esta fosforilación mitocondrial por CaMKII en corazones sometidos a IR.