



---

**Universidad de Valladolid**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO de BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y FISIOLÓGIA**

**INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y GENÉTICA MOLECULAR (IBGM)**

**TESIS DOCTORAL:**

**EL PAPEL DEL CALCIO INTRAVESICULAR EN LA  
SECRECIÓN CELULAR DE LÍNEAS NEUROENDOCRINAS**

Presentada por D. **PABLO MONTENEGRO ESCUDERO** para optar al  
grado de doctor por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Dr. Javier Álvarez Martín

Dr. Alfredo Moreno Díaz-Calderón

Dra. M<sup>a</sup> Carmen Domínguez Lobatón

Valladolid, 2016









# ÍNDICE

---

---

	Pág.
LISTADO DE ABREVIATURAS	
<b>INTRODUCCION</b> .....	<b>1</b>
<b>1. EL CALCIO Y SU PAPEL COMO SEGUNDO MENSAJERO</b> .....	<b>3</b>
<i>Apoptosis</i> .....	3
<i>Contracción muscular</i> .....	4
<i>Expresión génica</i> .....	5
<i>Fertilización</i> .....	6
<i>Metabolismo mitocondrial</i> .....	6
<i>Proliferación celular</i> .....	7
<i>Regulación de exocitosis</i> .....	8
<b>2. ORGANIZACIÓN ESPACIO-TEMPORAL DE LA SEÑAL DE CALCIO</b> .....	<b>9</b>
<b>3. HOMEOSTASIS DEL CALCIO CELULAR</b> .....	<b>10</b>
3.1 Amortiguadores intracelulares de calcio .....	12
3.2 Sistemas de entrada de calcio al citosol .....	13
3.2.1 Canales de calcio de la membrana plasmática .....	13
3.2.1.1 Canales de calcio operados por voltaje (VOCC) .....	14
3.2.1.2 Canales de calcio operador por receptor (ROCC) .....	17
3.2.1.3 Canales de calcio operados por depósitos (SOCC) .....	18
3.2.1.4 Canales de calcio operados de segundos mensajeros (SMOCC) .....	21
3.2.2 Superfamilia de canales de calcio TRP .....	22
3.2.3 Canales de calcio de los depósitos intracelulares .....	24
3.2.3.1 Receptores de IP <sub>3</sub> (IP <sub>3</sub> R) .....	25
3.2.3.2 Receptores de Rianodina (RyR) .....	28
3.2.3.3 Canales de dos poros (TPC) .....	31
3.2.4 Otros segundos mensajeros iniciadores de la señal de calcio .....	31
3.2.4.1 ADP ribosa cíclica (cADPr) .....	32

# ÍNDICE

---

---

	<b>Pág.</b>
3.2.4.2 Acido nicotínico-adenin-dinucleótido fosfato (NAADP).....	33
3.3 Sistemas de recuperación del calcio basal citosólico.....	34
3.3.1 Bombas de Calcio.....	35
3.3.1.1 ATPasa de calcio de la membrana plasmática (PMCA).....	35
3.3.1.2 ATPasa de calcio del retículo sarco/endoplásmico (SERCA).....	37
3.3.1.3 ATPasa de calcio de las vías de secreción (SPCA).....	40
3.3.2 Intercambiador Sodio/Calcio de la membrana plasmática (NCX).....	41
3.3.3 Uniportador de calcio mitocondrial (MCU) .....	43
3.4 Depósitos intracelulares de calcio.....	45
3.4.1 Retículo Endoplásmico/Sarcoplásmico.....	45
3.4.2 Mitocondria.....	46
3.4.3 Complejo de Golgi.....	48
3.4.4 Compartimentos acídicos.....	50
3.4.4.1 Lisosomas.....	50
3.4.4.2 Endosomas.....	51
3.4.4.3 Orgánulos relacionados con lisosomas.....	51
<b>4. <u>PAPEL DEL CALCIO EN LOS GRÁNULOS DE SECRECIÓN DE</u></b>	
<b><u>CÉLULAS NEUROENDOCRINAS</u></b> .....	<b>52</b>
4.1 Estructura y composición de los gránulos de secreción.....	52
4.2 Biogénesis y tráfico de los gránulos de secreción.....	54
4.3 El fenómeno de la exocitosis.....	56
4.4 Homeostasis del calcio en gránulos de secreción.....	58
4.4.1 Sistemas de liberación de calcio en los gránulos de secreción.....	60
4.4.2 Sistemas de captación de calcio en los gránulos de secreción.....	62
4.4.3 Controversia sobre el papel del calcio en los gránulos de secreción.....	64

# ÍNDICE

---

---

	Pág.
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>65</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>69</b>
<b>1. <u>CULTIVOS CELULARES</u></b> .....	<b>71</b>
1.1 Líneas celulares. Tipos y mantenimiento.....	71
1.1.1 Línea celular PC12.....	71
1.1.2 Línea celular INS-1.....	71
1.1.3 Clon celular INS-1E.....	71
1.1.4 Línea celular HeLa.....	72
1.2 Protocolos de siembra y transfección de las células.....	72
<b>2. <u>MATERIALES Y REACTIVOS</u></b> .....	<b>73</b>
<b>3. <u>GENERACIÓN DE LAS NUEVAS SONDAS DE CALCIO</u></b> .....	<b>74</b>
3.1 Generación de constructos bioluminiscentes y fluorescentes.....	74
3.2 Mutagénesis dirigida.....	78
<b>4. <u>MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO EN POBLACIÓN CELULAR. SONDAS DE AEQUORINA</u></b> .....	<b>80</b>
4.1 Descripción de la sonda de calcio Aequorina.....	80
4.2 Equipo y sistema de medida.....	84
4.3 Procedimiento experimental.....	86
4.4 Cálculo de la concentración de calcio a partir de los datos de luminiscencia.....	89
<b>5. <u>MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO EN CÉLULA ÚNICA. SONDAS DE PERICAM Y GECO</u></b> .....	<b>91</b>

# ÍNDICE

---

---

	<b>Pág.</b>
5.1 Descripción de las sondas de calcio Pericam y GECO.....	91
5.2 Protocolo de imagen por microscopía confocal.....	94
5.3 Procedimiento experimental de los registros de fluorescencia.....	96
5.4 Representación de datos de los registros de fluorescencia.....	98
6. <u>ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS</u> .....	99
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>101</b>
1. <u>OBTENCIÓN Y DISTRIBUCIÓN CELULAR DE LAS SONDAS BIOLUMINISCENTES Y FLUORESCENTES</u> .....	103
1.1 Distribución celular de las sondas de aequorina CgA-mAEQ y VAMP-mAEQ en las líneas neurosecretoras PC12, INS-1 e INS-1E.....	103
1.2 Distribución celular de las sondas de rtPericam y GECO dirigidas a gránulos de secreción en las líneas neurosecretoras PC12 e INS-1.....	108
1.3 Distribución celular de sondas luminiscentes y fluorescentes con la señal de localización del Neuropeptido Y (NPY).....	113
2. <u>DINÁMICA DEL CALCIO EN GRÁNULOS DE SECRECIÓN EN LAS LINEAS NEUROENDOCRINAS PC12, INS-1 E INS-1E. REGISTROS EN POBLACIÓN CELULAR</u> .....	118
2.1 Mecanismos que participan en la captación de calcio en los gránulos de secreción.....	118
2.2 Mecanismos que participan en la liberación de calcio en los gránulos de secreción.....	126
2.3 Acoplamiento de los gránulos de secreción a canales de calcio voltaje-dependientes (VOCC) en células INS-1E.....	135

# ÍNDICE

---

---

	Pág.
3. <u>DINÁMICA DEL CALCIO EN GRÁNULOS DE SECRECIÓN EN LAS LINEAS NEUROENDOCRINAS PC12 E INS-1. REGISTROS EN CÉLULA ÚNICA</u> .....	144
3.1 Registros de calcio en gránulos de secreción efectuados con la sonda VAMP-RGECO1 .....	144
3.2 Registros de calcio en gránulos de secreción efectuados con las sondas VAMP-GEMGECO1 y VAMP-GEXGECO1 .....	146
3.3 Registros de calcio en gránulos de secreción efectuados con la sonda NPY-GEMGECO1 .....	156
<b><i>DISCUSIÓN</i></b> .....	<b>163</b>
1. <u>LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS SONDAS BIOLUMINISCENTES Y FLUORESCENTES</u> .....	165
2. <u>DINÁMICA DEL CALCIO VESICULAR EN POBLACIÓN CELULAR DE LAS LINEAS NEUROENDOCRINAS PC12, INS-1 E INS-1E</u> .....	170
3. <u>ESTUDIO DEL CALCIO VESICULAR EN CÉLULA ÚNICA DE LINEAS NEUROENDOCRINAS PC12 E INS-1. SUBPOBLACIÓN VESICULAR</u> .....	180
<b><i>CONCLUSIONES</i></b> .....	<b>185</b>
<b><i>BIBLIOGRAFÍA</i></b> .....	<b>189</b>



## LISTADO DE ABREVIATURAS

<b>[Ca<sup>2+</sup>]:</b>	Concentración de Ca <sup>2+</sup> .
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>C</sub>:</b>	Concentración de Ca <sup>2+</sup> citosólico.
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>ER</sub>:</b>	Concentración de Ca <sup>2+</sup> del retículo endoplásmico.
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>GC</sub>:</b>	Concentración de Ca <sup>2+</sup> del complejo de Golgi.
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>M</sub>:</b>	Concentración de Ca <sup>2+</sup> mitocondrial.
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>N</sub>:</b>	Concentración de Ca <sup>2+</sup> nuclear.
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>SG</sub>:</b>	Concentración de Ca <sup>2+</sup> de los gránulos de secreción.
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>SUB-PM</sub>:</b>	Concentración de Ca <sup>2+</sup> de la zona submembrana plasmática.
<b>Ach:</b>	Acetilcolina.
<b>nAChR:</b>	Receptor nicotínico de acetilcolina.
<b>cADPR:</b>	ADP ribosa cíclica.
<b>(wt)AEQ:</b>	Aequorina nativa.
<b>cyt-AEQ:</b>	Aequorina nativa dirigida al citosol.
<b>mAEQ:</b>	Aequorina mutada.
<b>mit-mAEQ:</b>	Aequorina mutada dirigida a mitocondria.
<b>ER-LAAEQ:</b>	Aequorina doble mutada dirigida al retículo endoplásmico.
<b>SG-mAEQ:</b>	Aequorina mutada dirigida a gránulos de secreción.
<b>cAMP:</b>	Adenosín monofosfato cíclico.
<b>BAPTA:</b>	Ácido 1,2-bis(o-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético.
<b>BCL-2:</b>	Proteína de linfoma de células B.
<b>BHQ:</b>	Terc-butil-benzohidroquinona.
<b>BrA:</b>	Brefeldina A.
<b>BSA:</b>	Albumina de suero bovina.
<b>CaM:</b>	Calmodulina.
<b>CaMKII:</b>	Calmodulina-quinasa II.
<b>CaN:</b>	Calcineurina.
<b>CB:</b>	Calbindina.
<b>CgA(B):</b>	Cromogranina A (B).

## ABREVIATURAS

---

<b>CHX:</b>	Intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ .
<b>mCHX:</b>	Intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ mitocondrial.
<b>CICR:</b>	Liberación de $\text{Ca}^{2+}$ inducida por $\text{Ca}^{2+}$ .
<b>CSQ:</b>	Calsecuestrina.
<b>DHPR:</b>	Receptores de dihidropiridinas.
<b>DMSO:</b>	Dimetil sulfóxido.
<b>EGTA:</b>	Acido etilenglicoltetraacetico.
<b>EMRE:</b>	Regulador esencial del MCU.
<b>ER/SR:</b>	Retículo endoplásmico/sarcoplásmico.
<b>FBS:</b>	Suero fetal bovino.
<b>FCCP:</b>	Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona.
<b>FKBP:</b>	Proteínas de unión FK506.
<b>GC:</b>	Complejo de Golgi.
<b>c-GC:</b>	cis-Golgi.
<b>m-GC:</b>	medial-Golgi.
<b>t-CG:</b>	trans-Golgi.
<b>GECO:</b>	Indicadores de $\text{Ca}^{2+}$ genéticamente codificados para imagen óptica.
<b>GEMGECO1:</b>	GECO1 ratiométrico de doble emisión azul-verde.
<b>GEXGECO1:</b>	GECO1 ratiométrico de doble excitación verde.
<b>RGECO1:</b>	GECO1 rojo fluorescente.
<b>(E)GFP:</b>	Proteína verde fluorescente (mejorada).
<b>(cp)-GFP:</b>	Proteína verde fluorescente (circularmente permutada).
<b>mit-EGFP:</b>	Proteína verde fluorescente dirigida a mitocondrias.
<b>cGMP:</b>	Guanosín monofosfato cíclico.
<b>GPCR:</b>	Receptores acoplados a proteínas G.
<b>GPN:</b>	Glicil-L-fenilalanina- $\beta$ -naftilamida.
<b>HEDTA:</b>	Ácido N-(2-hidroxietyl)etilenodiamino-N,N',N'-triacético.
<b>HEPES:</b>	Ácido N-(2-hidroxietyl)piperacina-N'-(2-etanosulfónico).
<b>HS:</b>	Suero de caballo.
<b>I<sub>CRAC</sub>:</b>	Corriente de $\text{Ca}^{2+}$ activada por la liberación de $\text{Ca}^{2+}$ .



<b>IP<sub>3</sub>:</b>	Inositol(1,4,5)trifosfato.
<b>IP<sub>3</sub>R:</b>	Receptor de inositol(1,4,5)trifosfato.
<b>IRP:</b>	Población vesicular de liberación inmediata.
<b>LDCV:</b>	Vesículas de secreción de núcleo denso.
<b>MCU:</b>	Uniportador de Ca <sup>2+</sup> mitocondrial.
<b>MICU1:</b>	Proteína 1 de la captación de Ca <sup>2+</sup> mitocondrial.
<b>MICU2:</b>	Proteína 2 de la captación de Ca <sup>2+</sup> mitocondrial.
<b>NAADP:</b>	Ácido nicotínico-adenín-dinucleótido fosfato.
<b>NAADPR:</b>	Receptor de NAADP.
<b>NCX:</b>	Intercambiador Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> .
<b>mNCX:</b>	Intercambiador Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> mitocondrial.
<b>NMDA:</b>	Receptor de glutamato N-metil-D-aspartato.
<b>NPY:</b>	Neuropéptido Y.
<b>P2X:</b>	Receptores de ATP
<b>PBS:</b>	Tampón fosfato salino.
<b>rtPericam:</b>	Pericam ratiométrico.
<b>PIP<sub>2</sub>:</b>	Fosfatidil inositol bifosfato.
<b>PKA:</b>	Proteína-quinasa A.
<b>PKB:</b>	Proteína-quinasa B.
<b>PKC:</b>	Proteína-quinasa C.
<b>PLC:</b>	Fosfolipasa C.
<b>PMCA:</b>	ATPasas de Ca <sup>2+</sup> de la membrana plasmática.
<b>mPTP:</b>	Poro de transición de permeabilidad mitocondrial.
<b>PV:</b>	Parvalbúmina.
<b>ROCC:</b>	Canales de Ca <sup>2+</sup> operados por receptor.
<b>RRP:</b>	Población vesicular de rápida liberación.
<b>RVP:</b>	Población vesicular de reserva.
<b>RyR:</b>	Receptor de rianodina.
<b>SCSV:</b>	Vesículas sinápticas pequeñas claras.
<b>SERCA:</b>	ATPasas de Ca <sup>2+</sup> del retículo sarco/endoplásmico.

## ***ABREVIATURAS***

---

<b>SG:</b>	Gránulos de secreción.
<b>SMOCC:</b>	Canales de $\text{Ca}^{2+}$ operados por segundos mensajeros.
<b>SNAP-25:</b>	Proteína 25 asociada al sinaptosoma.
<b>SNARE:</b>	Receptor de la proteína de unión sensible a la N-etilmaleimida soluble.
<b>SOCC:</b>	Canales de $\text{Ca}^{2+}$ operados por depósitos.
<b>SOCE:</b>	Entrada de $\text{Ca}^{2+}$ operada por depósitos.
<b>SPCA:</b>	ATPasas de $\text{Ca}^{2+}$ de la vía secretora.
<b>SRP:</b>	Población vesicular de lenta liberación.
<b>STIM:</b>	Molécula de interacción del estroma.
<b>TKR:</b>	Receptor de tirosina-quinasa.
<b>TPC:</b>	Canales de dos poros.
<b>TRP:</b>	Receptores de potencial transitorio.
<b>V-ATPasa:</b>	ATPasa de protones vacuolar.
<b>VAMP(2):</b>	Proteína (2) asociada a membrana vesicular.
<b>VDAC:</b>	Canal de aniones dependiente de voltaje.
<b>VMAT:</b>	Transportador vesicular de monoaminas.
<b>VOCC:</b>	Canales de $\text{Ca}^{2+}$ operados por voltaje.
<b>(cp)-YFP:</b>	Proteína amarilla fluorescente (circularmente permutada).







# *INTRODUCCIÓN*

---



## 1. EL CALCIO Y SU IMPORTANCIA COMO SEGUNDO MENSAJERO.

---

El ión  $\text{Ca}^{2+}$ , es un segundo mensajero intracelular universal en la práctica totalidad de los seres vivos tanto procariotas como eucariotas. La importancia de este segundo mensajero radica en su versatilidad regulando una gran variedad de funciones celulares (Clapham, 1995). En las células eucariotas el calcio se encuentra compartimentalizado en diversos orgánulos, pudiendo a su vez presentarse como  $\text{Ca}^{2+}$  libre, o bien unido a diferentes proteínas específicas. La movilización intracelular del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico junto a la entrada de este ión al citosol desde el medio extracelular o su liberación desde ciertos orgánulos, los denominados depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares, son eventos implicados en una amplia variedad de cascadas de señalización intracelulares (Berridge et al., 2003).

De esta forma, el  $\text{Ca}^{2+}$  regula procesos fisiológicos tan variados como la fertilización, la expresión génica, la contracción muscular, la secreción, etc. A continuación, se describirá más detalladamente el papel de la señalización por  $\text{Ca}^{2+}$  en la regulación de algunos procesos biológicos.

### Apoptosis.

La apoptosis ha sido definida como una forma de “suicidio celular”. Es una vía de destrucción o muerte celular programada, utilizada por organismos multicelulares para la eliminación de células innecesarias o potencialmente perjudiciales (Kerr et al., 1972). Morfológicamente se encuentra caracterizada por diversos procesos como la condensación de la cromatina y su marginación en la periferia del núcleo (picnosis), la disminución del tamaño celular, la fragmentación del núcleo y material genético, y finalmente la formación de cuerpos apoptóticos. En las numerosas vías de señalización capaces de inducir y regular la apoptosis, tanto en las vías extrínsecas como intrínsecas, el  $\text{Ca}^{2+}$  desempeña un papel crítico en algunas de sus etapas.

La mitocondria toma un papel central en la vía intrínseca de la apoptosis.

## ***INTRODUCCIÓN***

---

La familia de proteínas señalizadoras BCL-2 (*B-Cell lymphoma 2*) proapoptóticas (BAX y BAK) y antiapoptóticas (BCL-XL y BCL-2), el estrés oxidativo y sobre todo aumentos prologados de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico ( $[\text{Ca}^{2+}]_C$ ) y mitocondrial ( $[\text{Ca}^{2+}]_M$ ) regulan la apertura del Poro de Transición de Permeabilidad mitocondrial (mPTP) (Tait & Green, 2010). Como consecuencia de la apertura del poro se producen cambios de potencial de membrana mitocondrial ( $\Psi_M$ ), detención de la síntesis de ATP y la liberación de diversas proteínas proapoptóticas al citosol (Kroemer et al., 2007; Chai et al., 2000), entre ellas del citocromo-c (Cyt-C), con la consiguiente activación de la vía de las caspasas, efectores finales de la apoptosis con actividad proteolítica y DNasa (Hengartner, 2000).

En cuanto a la vía extrínseca, el aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]_C$  promueve la activación de la calcineurina (CaN), que a su vez defosforila el agonista de muerte celular asociado a BCL-2 (BAD), inhibiendo a BCL-XL e induciendo apoptosis (Wang et al., 1999). Por otra parte la alteración por estrés de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  en uno de los principales reservorios de  $\text{Ca}^{2+}$ , el retículo endoplásmico (ER), puede activar caspasas específicas (Nakagawa et al., 2000; Morishima et al., 2002). En estos mecanismos participan diferentes canales iónicos permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  tales como receptores de inositol(1,4,5)trifosfato (IP<sub>3</sub>R), receptores de rianodina (RyR), el uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial (MCU), el canal de aniones voltaje-dependiente (VDAC), canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por depósitos (SOCC), canales TRP (*Transient Receptor Potential*), y canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje-dependientes (VOCC), que pueden interaccionar con los diferentes factores proapoptóticos y antiapoptóticos (Kondratskyi et al., 2015).

### *Contracción muscular.*

La señalización por  $\text{Ca}^{2+}$  es un prerequisite para el funcionamiento y la plasticidad de las fibras de músculo esquelético, cuya contractibilidad está basada en un mecanismo de acoplamiento excitación-contracción. La contracción muscular se inicia en la terminal presináptica de las motoneuronas. El impulso nervioso permite la apertura de canales VOCC y desencadena la liberación de acetilcolina (ACh) en la hendidura sináptica (Sine, 2012). Esto provoca la apertura de los receptores nicotínicos del sarcolema (nAChR), causando su despolarización por los flujos de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  desde la apertura de los canales iónicos correspondientes.



Si se alcanza el potencial umbral, la despolarización migrará a lo largo de los túbulos T localizados en el entorno próximo del retículo sarcoplásmico (SR) provocando la apertura de los VOCC  $Ca_v1.1$  o más conocidos como receptores de dihidropiridinas (DHPR). La apertura de los DHPR induce una interacción mecánica con los RyR del SR, con los que se encuentran íntimamente reaccionados. Los RyR que no interactúan íntimamente con los DHPR se encuentran organizados en *clusters* cercanos a dicha interacción, activándose y participando en la liberación de  $Ca^{2+}$  (Cheng & Lederer, 2008). Estos procesos desencadenan un significativo aumento en la  $[Ca^{2+}]_C$ , en torno a 100 veces superior que la  $[Ca^{2+}]_C$  basal de la miofibrilla, poniendo en marcha la maquinaria contráctil, mediante el mecanismo del Ciclo de los Puentes Cruzados (Tanabe et al., 1988; Flucher et al., 2005). En la regulación de la contracción muscular, la homeostasis del  $Ca^{2+}$  juega un papel crucial, en especial la liberación de  $Ca^{2+}$  desde los depósitos a través de los RyR. Estos canales pueden sufrir procesos de modificación post-translacional como fosforilaciones, vía proteína-quinasa A (PKA), o calmodulina-quinasa II (CaMKII). También pueden interactuar con proteínas tales como calreticulina (o calsecuestrina en el SR), parvalbúmina y sarcalumenina, que a su vez regulan la proporción de  $Ca^{2+}$  libre existente en el SR/ER (Gehlert et al., 2015).

### Expresión génica.

Entre la amplia variedad de funciones celulares reguladas por el  $Ca^{2+}$  se encuentra la activación de diversos factores de transcripción. Por ejemplo, en cardiomiocitos un aumento de la concentración de  $Ca^{2+}$  nuclear ( $[Ca^{2+}]_N$ ) desencadena la defosforilación de NFAT (*Nuclear Factor of Activated T-Cells*) en respuesta a la activación por  $Ca^{2+}$  de CaN, culminando en la expresión del péptido natriurético atrial (ANP) y la respuesta hipertrófica adaptativa (Guatimosim et al., 2008). De igual forma, la activación por  $Ca^{2+}$  de CaMKII permite la activación de MEF2 (*Myocyte Enhancer Factor 2*) mediante fosforilación de la histona desacetilasa (HDAC) (Passier et al., 2000). Otro factor relevante activado por fosforilación de CaMKII es CREB (*Cyclic-AMP-Response Element-Binding protein*), que a su vez media en la transcripción de genes en procesos antioxidativos y antiapoptóticos (Watson et al., 2007; Ljubojevic & Bers, 2015). El aumento de la  $[Ca^{2+}]_N$  permite la disociación de DREAM (*Downstream Regulatory Element Antagonist Modulator*) del DNA, facilitando la transcripción de diversos genes, participando en la neuroprotección (Oliveira et al., 2014).

## ***INTRODUCCIÓN***

---

### ***Fertilización.***

Los espermatozoides recién eyaculados son, en principio, poco capaces de realizar la fertilización del óvulo. La idoneidad del mecanismo de fertilización depende de una hiperactivación, quimiotaxis, capacitación, y reacción acrosómica adecuadas espacio-temporalmente, en donde el incremento en la  $[Ca^{2+}]$  intracelular desarrolla un papel esencial. Dicho incremento de  $[Ca^{2+}]$  se debe fundamentalmente a la entrada de  $Ca^{2+}$  al espermatozoide desde el medio externo en las trompas de Falopio del tracto reproductivo femenino (Foresta & Rossato, 1997). La familia de canales *CatSper* presentes en los espermatozoides son los reguladores esenciales de dicha entrada de  $Ca^{2+}$  y cruciales para la fertilidad del esperma (Kirichok et al., 2006). Se trata de una familia de canales voltaje-dependientes, permeables a iones monovalentes y divalentes pero con mayor afinidad por estos últimos. Estructuralmente son heterotetrámeros que constan de tres subunidades auxiliares, y se encuentran localizados en la parte principal de la cola de los espermatozoides (Singh & Rajender, 2015). Estudios con ratones *knockdown* de *CatSper1* y *CatSper2* mostraron un fenotipo estériles debido a la incapacidad para generar la hipermotilidad del esperma requerida para la penetración en el oocito (Carlson et al., 2003; Quill et al., 2003). La apertura de estos canales está inducida por una serie de estímulos fisiológicos mediados por nucleótidos cíclicos (cAMP y cGMP), glicoproteínas, adenilil-ciclasas solubles y cambios en el pH intracelular. En su regulación están implicados el canal de protones voltaje-dependiente del flagelo (Hv1), ATPasas de  $Ca^{2+}$ , y diversos receptores de proteínas G (GPCR). La importancia de estos canales iónicos en la motilidad del esperma los convierte en objetivo de las investigaciones en el campo de la fertilidad masculina, la infertilidad y la anticoncepción.

### ***Metabolismo mitocondrial.***

La acumulación de  $Ca^{2+}$  en la mitocondria regula un conjunto de funciones intrínsecas de la misma entre las que se encuentra la producción de ATP por fosforilación oxidativa. Existen tres enzimas deshidrogenasas de la matriz mitocondrial, limitantes de la cinética del ciclo de Krebs, susceptibles de activación por  $Ca^{2+}$ : la piruvato-deshidrogenasa, que se encuentra regulada por una fosfatasa dependiente de  $Ca^{2+}$ , la  $\alpha$ -cetoglutarato-deshidrogenasa y la isocitrato-deshidrogenasa, reguladas directamente por el propio  $Ca^{2+}$  (McCormack et al., 1990; Denton, 2009).

Frente a un incremento de  $[Ca^{2+}]_C$  y su propagación a través del citosol, la mitocondria, por medio de su canal MCU, puede acumular y modular la onda de  $Ca^{2+}$  (Montero et al., 2000), a la vez que se ajusta a las demandas energéticas de la célula aumentando la síntesis de NADH y consecuentemente ATP (Jouaville et al., 1999). La regulación por  $Ca^{2+}$  del metabolismo mitocondrial no solo se limita a este aspecto. El sistema ATP-sintasa podría estar regulado por  $Ca^{2+}$ , diversos sistemas de transporte de metabolitos (Aspartato/Glutamato) y subunidades reguladoras del MCU (MICU1-2) capaces de unir  $Ca^{2+}$  a alguno de sus dominios *EF-Hand* (Wiederkehr & Wollheim, 2012; Rizzuto et al., 2012).

### Proliferación celular.

La proliferación celular es un mecanismo complejo dirigido por un conjunto de proteínas asociadas a la señalización por  $Ca^{2+}$  en diferentes regiones subcelulares. Se ha determinado que el origen de la señal que desencadena la proliferación celular es la entrada de  $Ca^{2+}$  desde el medio extracelular, siendo la  $[Ca^{2+}]$  necesaria para activar dicha señal significativamente más elevada en células normales que en células tumorales (Boynton et al., 1977). En células no excitables la entrada de  $Ca^{2+}$  se realiza mayoritariamente a través de SOCE (*Store Operated Calcium Entries*, entrada de calcio operada por depósitos), mientras que en células excitables los canales VOCC ejercen un importante papel. Recientes estudios sugieren que la contribución del mecanismo SOCE a la proliferación celular es más importante que la propia entrada de  $Ca^{2+}$  o el funcionamiento de los canales (Borowiec et al., 2014; Pinto et al., 2015). En células de melanoma, la iniciación del mecanismo SOCE desencadenó la activación dependiente de  $Ca^{2+}$ /Calmodulina (CaM) de la cascada de señalización del proto-oncogén tirosina-proteína quinasa (Src)/proteína fosfatasa 2 (PP2A)/proteína quinasa B (PKB), responsable de la malignización del tumor (Fedida-Metula et al., 2012). Por otra parte, en células endoteliales de vena umbilical humana, el silenciamiento de las proteínas implicadas en el mecanismo SOCE (Orai1, STIM1 y STIM2) condujo a una mayor proporción de dichas células en estadios S y G2-M del ciclo celular (Abdullaev et al., 2008). De estas proteínas mencionadas, la familia de proteínas Orai parece tener un papel crítico en la señalización por  $Ca^{2+}$  a través del SOCE y por tanto en la proliferación celular.

## INTRODUCCIÓN

---

En la línea celular de cáncer de mama (MCF-7), el silenciamiento de Orai3 indujo la detención del ciclo celular en la fase G1, a través de la ruta de MAP-quinasas y la activación de la vía c-myc (Faouzi et al., 2011). Los mecanismos por los cuales las proteínas implicadas en el SOCE controlan la proliferación celular no se conocen con profundidad, siendo motivo de activas investigaciones en la actualidad.

### Regulación de la exocitosis.

El denominado acoplamiento estímulo-secreción es el mecanismo básico implicado tanto en la neurotransmisión como en la secreción hormonal, actuando el  $\text{Ca}^{2+}$  como nexos regulador entre el estímulo y la respuesta exocitótica (Douglas, 1968). En células excitables, existe un modelo de activación, donde el estímulo es un potencial de acción que despolariza la membrana plasmática, permitiendo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular principalmente a través de VOCC y con un aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_C$  rápido y muy localizado (García et al., 2012; Rorsman et al., 2012). En células no excitables, existe otro modelo de activación donde el estímulo activa una cascada de señalización generalmente a través de proteínas G, con liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde depósitos intracelulares, principalmente el ER a través de  $\text{IP}_3\text{R}$  (Berridge, 2009). En este último caso el aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_C$  es generalmente menor, menos localizado y más permanente en el tiempo. Conforme se produce el aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]_C$ , diversas sinaptotagminas presentes en las membranas vesiculares, interaccionan con el  $\text{Ca}^{2+}$  desestabilizando el complejo proteico SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide sensitive fusion proteins Attachment Protein REceptor*) y desencadenando la fusión de los gránulos de secreción (SG) con la membrana plasmática que conduce a la exocitosis de su contenido (Südhof, 2013; Messenger et al., 2014). Este proceso de acoplamiento estímulo-secreción se encuentra regulado espacio-temporalmente, debiendo considerarse la contribución de los depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares. De hecho, el papel que desempeñan estos reservorios de  $\text{Ca}^{2+}$  y su homeostasis, en especial los gránulos de secreción, a regular su propia exocitosis es uno de los temas principales que se discutirán a lo largo del presente trabajo.

## 2. ORGANIZACIÓN ESPACIO-TEMPORAL DE LA SEÑAL DE CALCIO.

En el apartado anterior se han expuesto varios ejemplos que muestran la diversidad de funciones fisiológicas reguladas por el  $\text{Ca}^{2+}$ . Por ello las elevaciones de  $[\text{Ca}^{2+}]_C$  requieren de una precisa regulación espacio-temporal. En eventos rápidos como la neurotransmisión o la contracción muscular, se generan flujos de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol, que dan lugar a grandes incrementos de  $[\text{Ca}^{2+}]$  localizados, responsables de la regulación de estos eventos (Montero et al., 2000; Berridge, 2006). En procesos más duraderos como la expresión génica o la proliferación celular, los flujos de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  se modulan e integran en una señal global de larga duración que se propaga a través de la célula. Las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  incluyen un amplio mecanismo de regulación que se puede implicar incluso a la expresión génica de componentes de la propia señal. Tal es el caso de la regulación del factor CREB en neuronas por la apertura de canales VOCC, a través de la interacción con CaMKII (Wheeler et al., 2008). Por otra parte, aumentos prologados de la  $[\text{Ca}^{2+}]_C$  pueden tener efectos negativos en la célula, llegando a desencadenar procesos apoptóticos.

En ciertas condiciones las  $[\text{Ca}^{2+}]_C$  pueden aumentar de forma localizada, que se denominan microdominios de alto  $\text{Ca}^{2+}$ , llegando a alcanzar valores de  $[\text{Ca}^{2+}]$  superiores a  $300\mu\text{M}$  en algunos tipos celulares. La regulación de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  en dichos microdominios se debe tanto a la existencia de amortiguadores citosólicos, que reducen la difusión del  $\text{Ca}^{2+}$  a lo largo de la célula como a los sistemas involucrados en la captación y liberación de dicho  $\text{Ca}^{2+}$  (Rizzuto & Pozzan, 2006). Estos sistemas son los responsables de la modulación espacial y la amplitud del microdominios. Los microdominios de  $\text{Ca}^{2+}$  se producen en regiones celulares muy concretas como el entorno de los canales responsables tanto de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular como su liberación desde compartimentos intracelulares. A lo largo del presente trabajo se detallarán los mecanismos por los que se generan estos microdominios de alto  $\text{Ca}^{2+}$  y su contribución en la regulación de procesos fisiológicos, en especial la exocitosis.

### 3. HOMEOSTASIS DEL CALCIO CELULAR.

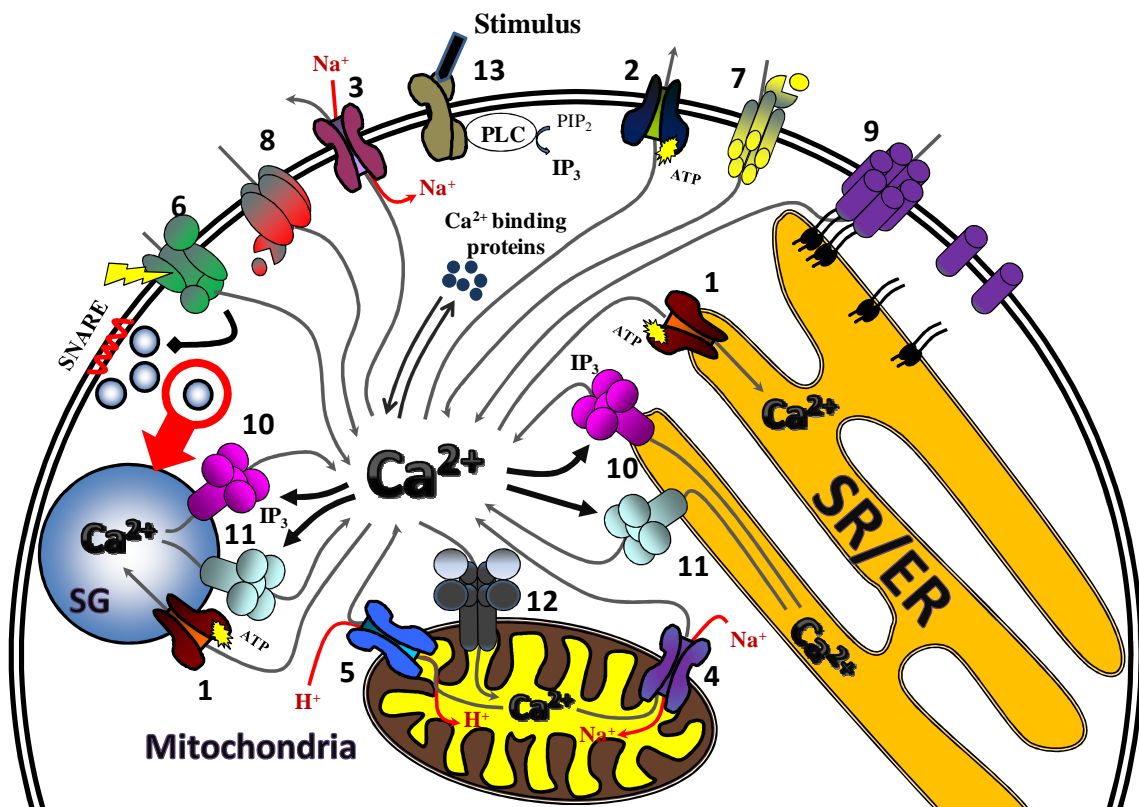
---

A diferencia de otros segundos mensajeros intracelulares, la característica principal de la señal del  $\text{Ca}^{2+}$ , es que su regulación se basa en la compartimentalización dinámica en diferentes regiones intracelulares y a través de la membrana plasmática. En la célula en reposo la  $[\text{Ca}^{2+}]_C$  se sitúa en el rango entre 50-200nM dependiendo del tipo celular, mientras que en el medio extracelular es de 1-2mM. En el interior de la célula existen orgánulos que actúan como depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$ . Históricamente el ER (o el SR en células musculares) se ha considerado que juega un papel primordial en la movilización del  $\text{Ca}^{2+}$ . No obstante, existen otros compartimentos como el complejo de Golgi (GC) o los gránulos de secreción, que pueden tener relevancia en tipos celulares como las células neuroendocrinas (Haigh et al., 1989). Se ha estimado que la  $[\text{Ca}^{2+}]$  en estos diversos depósitos se sitúa entre 300 $\mu\text{M}$  y 1-2mM para el ER (Barrero et al., 1997; De la Fuente et al., 2013), entre 200 y 300  $\mu\text{M}$  para el GC (Pinton et al., 1998; Aulestia et al., 2015) y entre 20-100 $\mu\text{M}$  en los SG (SantoDomingo et al., 2008; 2010).

Los estímulos externos que producen la activación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ , pueden actuar regulando la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular, y/o liberando  $\text{Ca}^{2+}$  desde los depósitos intracelulares. Existe un gran número de canales implicados en la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  cuya apertura permite el flujo de este ión a favor de gradiente electroquímico. La expresión de estos canales puede variar enormemente en función del tipo celular. Se encuentran localizados fundamentalmente en la membrana plasmática y en los depósitos intracelulares, y su regulación es crucial en la relación estímulo-respuesta (Berridge, 2012). Existen un conjunto de proteínas intracelulares que se comportan como amortiguadores de  $\text{Ca}^{2+}$  y que también contribuyen a la regulación de las  $[\text{Ca}^{2+}]_C$ , en especial en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol (Schwaller, 2010).

La recuperación de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, tras la estimulación celular, se basa en sistemas de captación de  $\text{Ca}^{2+}$  por los depósitos intracelulares y de extrusión hacia el medio extracelular. En este proceso participan las ATPasas de  $\text{Ca}^{2+}$ , que bombean el ión al medio extracelular o al interior de los depósitos, en contra de gradiente electroquímico y con gasto de ATP.

Otros sistemas presentes en muchos tipos celulares son los intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Estos sistemas utilizan la energía libre liberada por el transporte de  $\text{Na}^+$  a favor de gradiente electroquímico para bombear  $\text{Ca}^{2+}$  al medio extracelular o los depósitos intracelulares, sin gasto de ATP. A diferencia de los canales estos sistemas tienen una escasa regulación. Las mitocondrias, como reservorio dinámico de  $\text{Ca}^{2+}$ , juegan también un papel fundamental en la modulación espacio-temporal de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. A través del MCU, las mitocondrias son capaces de captar y almacenar  $\text{Ca}^{2+}$  hasta niveles cercanos a 2-3mM (De la Fuente et al., 2012). Ese  $\text{Ca}^{2+}$  posteriormente puede liberarse gradualmente mediante sistemas intercambiadores. En la **Fig. 1** se presenta un esquema de los principales sistemas que componen la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en un modelo de célula neuroendocrina.



**Fig. 1. Homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  en el modelo de célula neuroendocrina.** Se expone un ejemplo de la regulación de flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  celular donde participan el retículo sarcoplásmico/endoplásmico (SR/ER), la mitocondria (Mitochondria) y los gránulos de secreción (SG). Se encuentran representadas las ATPasas de  $\text{Ca}^{2+}$  SERCA (y/o SPCA) (1), la PMCA (2), y los sistemas intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  NCX, mNCX (3 y 4 respectivamente) y  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  mCHX (5). Por otro lado se muestran los canales VOCC (6), ROCC (7) y SMOCC (8), la entrada capacitativa a través de SOCC (9) y los canales de depósitos intracelulares  $\text{IP}_3$  e RyR (10 y 11 respectivamente). En la mitocondria se muestra la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del MCU (12). Como ejemplo de estimulación se expone la cascada PLC- $\text{IP}_3$  (13). Otros procesos representados son la interacción con proteínas de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ , la regulación de  $\text{IP}_3$ R y RyR a través de  $\text{Ca}^{2+}$  (CICR) y el proceso de exocitosis a través del complejo SNARE mediado por la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ .



### 3.1 Amortiguadores intracelulares de calcio.

En el citosol se han identificado más de 100 tipos de proteínas capaces de unir  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, solo se consideran amortiguadores de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico a un pequeño subgrupo de proteínas que presentan motivos *EF-Hand*. Las proteínas amortiguadoras de  $\text{Ca}^{2+}$  constituyen la primera línea de modulación de los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólicos tras la estimulación celular. Los amortiguadores de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólicos principales son: la parvalbúmina (PV), la calbindina-D28K (CB-D28K), y la calretinina (CR). La capacidad de tamponamiento de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  por estos amortiguadores depende de los parámetros de concentración y movilidad intracelular, selectividad por  $\text{Ca}^{2+}$  frente a otros iones, y cinética de unión y liberación del  $\text{Ca}^{2+}$ .

La PV presenta una cinética de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  lenta pero de alta capacidad por este ión, lo que no permite regular el incremento inicial en la  $[\text{Ca}^{2+}]_C$  sino, por el contrario, los procesos de salida, más lentos, una vez se ha alcanzado la amplitud máxima de dicho incremento. La concentración de PV puede variar desde 1mM en células musculares, participando en el proceso de relajación (Tikunov & Rome, 2009), hasta 50-100 $\mu\text{M}$  en diferentes poblaciones neuronales, interviniendo en la plasticidad sináptica a corto plazo (Collin et al., 2005).

La CB-D28K y la CR presentan una cinética de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  más rápida, siendo capaces de regular los incrementos de  $[\text{Ca}^{2+}]_C$  en las primeras etapas de la señalización, por ejemplo, interviniendo en la modulación de secreción de insulina en células  $\beta$ -pancreáticas (Sooy et al., 1999). Su concentración varía desde 1mM en células ciliares del sáculo (Hackney et al., 2005) hasta 30-400 $\mu\text{M}$  en diferentes poblaciones neuronales (Schwaller et al., 2002; Gall et al., 2003). Adicionalmente a la CB-D28K se le ha atribuido un papel como sensor de  $\text{Ca}^{2+}$ , pudiendo interactuar entre otros con la ATPasa de la membrana plasmática (PMCA) y la subunidad  $\alpha$  del canal  $\text{Ca}_v1.2$ , si bien su relevancia fisiológica no se conoce en detalle actualmente (Morgan et al., 1986; Christakos et al., 2007).

Recientemente se ha propuesto un papel amortiguador de  $\text{Ca}^{2+}$  para el sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  CaM, interviniendo en la exocitosis y la plasticidad sináptica (Timofeeva & Volynski, 2015).



La actuación coordinada de estos amortiguadores de  $\text{Ca}^{2+}$  en la presinapsis es crucial para regular el fenómeno de facilitación en la liberación repetitiva de neurotransmisores (Burnashev & Rozov, 2005).

Los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  poseen su propio sistema tamponador para este ión. La calreticulina es responsable del amortiguamiento del 50% del  $\text{Ca}^{2+}$  en el ER, presentando una alta capacidad de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  (25mol de  $\text{Ca}^{2+}$ /mol de proteína), y baja afinidad ( $K_d = 2\text{mM}$ ) (Nakamura et al., 2001). Las proteínas amortiguadoras de  $\text{Ca}^{2+}$  del lumen del ER como calreticulina, BiP (*Binding immunoglobulin Protein*) y GRP94 tienen función de chaperonas, responsables del correcto plegamiento y transporte de proteínas sintetizadas en el ER (Schrag et al., 2001; Lamb et al., 2006). En el SR la calsequestrina (CSQ) es el amortiguador de  $\text{Ca}^{2+}$  más abundante, presentando también alta capacidad y baja afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  con la peculiaridad de oligomerizar en función de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  (Wang et al., 1998). Parece que además, puede actuar como sensor de  $\text{Ca}^{2+}$ , modulando la actividad de los RyR (Wei et al., 2009). Otros compartimentos de  $\text{Ca}^{2+}$  como el CG y los SG también poseen sistemas de amortiguamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  como se mencionará posteriormente (Prins & Michalak, 2011).

### 3.2 Sistemas de entrada de calcio al citosol.

El aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_C$  frente a un estímulo varía tanto en función del estímulo como la respuesta que posteriormente desencadena, modulándose su amplitud, distribución espacial y permanencia temporal. Inicialmente, el aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_C$  puede deberse a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el entorno extracelular o a través de su liberación desde depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares.

#### 3.2.1 Canales de calcio de la membrana plasmática.

La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular se lleva a cabo gracias al gradiente químico de  $\text{Ca}^{2+}$  existente entre el medio intracelular ( $10^{-7}\text{M}$ ) y el extracelular ( $10^{-3}\text{M}$ ), y eléctrico con un potencial de membrana de  $-60\text{mV}$  con respecto al medio extracelular. A pesar del enorme gradiente electroquímico existente, las células en condiciones de reposo se mantienen impermeables al  $\text{Ca}^{2+}$ , regulándose su entrada a través de una serie de canales localizados en la membrana plasmática.

La apertura de estos canales se regula según una serie de estímulos, por los cuales se clasifican en canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltaje (VOCC), canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por receptor (ROCC) canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por depósitos (SOCC) y canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por segundos mensajeros (SMOCC).

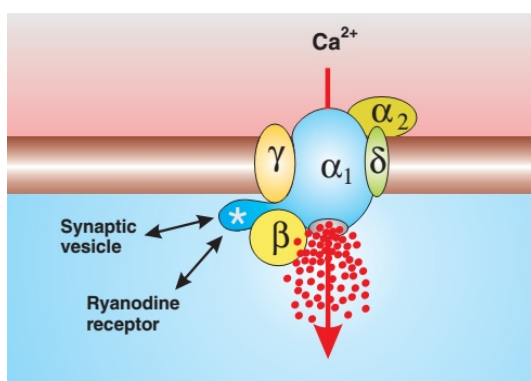
Su expresión depende del tipo celular e incluso del grado de maduración de la célula. Su distribución en la membrana plasmática puede no ser homogénea, aspecto crucial para la generación de microdominios de alto  $\text{Ca}^{2+}$ . Por ejemplo, las células  $\beta$ -pancreáticas tienen una pequeña expresión de canales VOCC que supone un 5-10% de la presente en células cromafines de médula adrenal, pero estos canales se encuentran localizados en regiones concretas de la membrana plasmática, cerca de zonas con alta densidad en SG, de modo que pequeñas entradas de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de estos canales son suficientes para desencadenar la secreción de insulina (Gilon et al., 2014).

### **3.2.1.1 Canales de calcio operados por voltaje (VOCC).**

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje dependientes (*Voltage Operated Calcium Channels*; VOCC;  $\text{Ca}_v$ s) se encuentran en la membrana plasmática de células excitables, como neuronas, células neuroendocrinas y musculares, siendo un elemento clave en la transducción de las señales eléctricas. Se identificaron por primera vez en el músculo de crustáceos (Fatt & Katz, 1953).

Ante un estímulo despolarizante, estos canales sufren un cambio conformacional que permite su apertura provocando la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio externo a través del gradiente electroquímico existente y desencadenando procesos fisiológicos tales como transmisión sináptica, secreción, contracción muscular y expresión génica entre otros (Stanley, 1993; Deisseroth et al., 2003; Dolmetsch, 2003). Posteriormente, en estado de reposo y con la membrana hiperpolarizada, dichos canales vuelven a la conformación cerrada. Estos canales juegan un papel fundamental en la generación de microdominios de alto  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que pueden interactuar íntimamente con RyR en el caso de músculo esquelético, o bien con los SG a través de proteínas del complejo SNARE (Berridge, 2012).

Estructuralmente (**Fig. 2**) los canales VOCC son complejos heteromultiméricos consistentes en una subunidad  $\alpha_1$  formadora del poro y un conjunto de subunidades auxiliares  $\beta$  y  $\alpha_2$ - $\delta$  responsables de la localización, tráfico y estabilización del canal en la membrana (Buraei & Yang, 2010). Otras subunidades reguladoras ( $\gamma$ , p95, etc.) han sido descritas en ciertos tejidos como músculo esquelético y neuronas. Cada subunidad- $\alpha$  está formada por cuatro dominios homólogos, consistentes en seis  $\alpha$ -hélices transmembrana ( $S_1$ - $S_6$ ), localizándose el sensor de voltaje en la unidad  $S_4$ . Se han descrito tres subfamilias de canales VOCC, clasificados en función a su conductividad, características biofísicas y su respuesta farmacológica como se muestra de forma resumida en la **Tabla 1** (Ertel et al., 2000; Dolphin, 2006). Esta diversidad funcional se puede explicar por la existencia de diferentes variantes funcionales de procesamiento alternativo, de la subunidad  $\alpha_1$  principalmente (Catterall, 2011).



**Fig. 2. Organización de las subunidades de los VOCC.** Se muestra la subunidad  $\alpha_1$ , que contiene la región del poro y el sensor de voltaje así como los sitios de unión para la modulación por  $Ca^{2+}$  y fármacos. En algunas subunidades  $\alpha_1$  (\*) existen regiones de interacción de los canales con las vesículas sinápticas o bien los RyR del músculo esquelético. La subunidad  $\alpha_2$  extracelular está vinculada a la subunidad  $\delta$ , y junto a la subunidad  $\gamma$  y ambas presentan una región transmembrana. La subunidad  $\beta$ , es objetivo de algunas vías de modulación de los canales. Imagen modificada de Berridge, 2012.

Subfamilia	Características Funcionales	Conductividad	Respuesta Farmacológica	Localización
Ca <sub>v</sub> 1 (1.1-1.4)	Presentan una alta conductancia, y una lenta inactivación dependiente de voltaje.	Tipo L Long-lasting	Sensibles a dihidropiridinas, fenilquilaminas, y benzodiazepinas.	Músculo y células neuroendocrinas.
Ca <sub>v</sub> 2 (2.1-2.3)	Requieren una alta despolarización para su activación (HVA).	No-L: N, P/Q, R.	Sensibles a toxinas polipeptídicas presentes en venenos de serpientes e invertebrados.	Neuronas de sinapsis rápidas.
Ca <sub>v</sub> 3 (3.1-3.3)	Presentan una baja conductancia, y se inactivan rápidamente. Requieren una pequeña despolarización para su activación (LVA).	Tipo T Transitorias	Insensibles a agentes farmacológicos específicos.	Gran variedad de tipos celulares, donde modulan el Potencial de Acción, y el control de patrones de disparo repetitivos.

**Tabla 1. Clasificación de los VOCC.** Se muestra la clasificación de los VOCC descritos en mamíferos, en función de su conductividad y respuesta farmacológica así como la principal localización en células.

## ***INTRODUCCIÓN***

---

La subfamilia de canales  $Ca_v1$  (1.1 – 1.4) tienen una capacidad de conducción de corriente relativamente grande, y se modulan fundamentalmente por AMP cíclico (cAMP) a través de proteína quinasa A (PKA), y el sistema  $Ca^{2+}/CaM$  entre otros mecanismos. Estos canales están presentes en prácticamente todas las células excitables, constituyendo la principal vía de entrada de  $Ca^{2+}$  en músculo cardiaco, esquelético y liso. En células neuroendocrinas son responsables de la iniciación de la secreción hormonal y de neurotransmisores. En neuronas regulan la expresión génica y la integración de la señal sináptica (Yang & Berggren, 2006; Flavell & Greenberg, 2008).

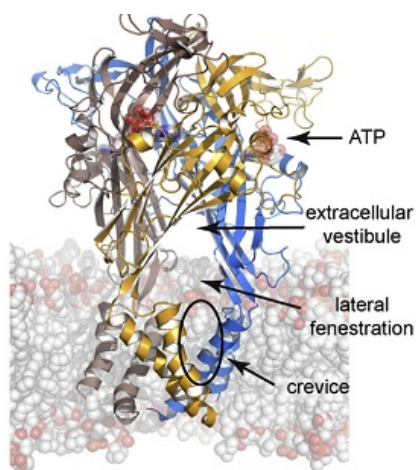
La subfamilia de canales  $Ca_v2$  (2.1 – 2.3), al igual que los canales de corriente tipo L o  $Ca_v1$ , requieren una alta despolarización para ser activados pero su conductancia es menor. A cada variante genética se le ha asignado un tipo de corriente característica: N (Neutral;  $Ca_v2.2$ ); P/Q (Purkinje;  $Ca_v2.1$ ); R (Resistente;  $Ca_v2.3$ ). Su papel es clave en el control de la liberación de neurotransmisores en la sinapsis y de ahí su expresión fundamentalmente localizada en sistema nervioso (Nimmervoll et al., 2013). Los canales  $Ca_v2.1$  se modulan por diversos mecanismos, destacando el sistema  $Ca^{2+}/CaM$ , y la inhibición por neurotransmisores a través de proteínas G. No se inactivan durante la etapa de despolarización y se bloquean selectivamente por la  $\omega$ -agatoxina IVA con diferentes afinidades para las variantes P y Q según la composición de sus subunidades (Llinás et al., 1989; Wakamori, 1998). Los canales  $Ca_v2.2$  tienen generalmente una inactivación más rápida que los canales de tipo L y se bloquean irreversiblemente por la  $\omega$ -conotoxina GVIA (Olivera et al., 1994). Los canales  $Ca_v2.3$  se caracterizan por una rápida inactivación y su resistencia general a las toxinas peptídicas a excepción de la toxina SNX-482, presente en una especie de tarántula (Newcomb et al., 1998).

La subfamilia de canales  $Ca_v3$  (3.1 – 3.3) presentan activación a bajos potenciales de membrana y una baja conductividad, aunque debido a la gran activación estos canales son capaces de transportar grandes cantidades de  $Ca^{2+}$ . Debido a su rápida inactivación, su función está más relacionada con el inicio y mantenimiento de potenciales de acción repetitivos como la función “marcapasos” del nodo sinoatrial cardiaco o los patrones rítmicos de neuronas talamocorticales (Berridge, 2012). Se encuentran modulados a través de receptores de proteínas G. En células cromafines inmaduras se expresan débilmente, dejando de expresarse en células maduras (Mahapatra et al., 2012).

### 3.2.1.2 Canales de calcio operados por receptor (ROCC).

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por receptor (*Receptor Operated Calcium Channels*; ROCC) son canales iónicos multiméricos que permiten la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol a través del cambio conformacional producido por un agonista extracelular como puede ser un neurotransmisor. Este agonista puede actuar bien en el propio canal, denominándose ionotrópicos, con entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular. Otros, metabotrópicos, se activan generalmente a través de un receptor asociado a proteínas G. Los receptores ionotrópicos se clasifican estructuralmente y según el tipo de efector del canal, existiendo tres grupos principales. A continuación se expondrán los tres grupos de canales ROCC con ejemplos representativos de cada grupo.

Los receptores P2X, componen una superfamilia de ROCC ionotrópicos cuyo agonista es el ATP extracelular, induciendo despolarización de la membrana plasmática y la entrada de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . Estructuralmente son homo/heterotrímeros compuestos de siete subunidades diferentes ( $\text{P2X}_{1-7}$ ), situándose los extremos C- y N- terminal en el citosol y con un gran dominio extracelular, ectodominio, que contiene los sitios de unión a ATP (**Fig. 3**) (Giniatullin & Nistri, 2013; Habermacher et al., 2016). La composición de las diferentes subunidades configura las propiedades biofísicas del canal. Estos canales se encuentran distribuidos en muchos tipos celulares tanto excitables como no excitables, donde cumplen diversas funciones (Benham & Tsien, 1987; Berridge, 2012). Si bien se suelen expresar en la membrana plasmática, también se han localizado en membranas de diferentes orgánulos como el receptor  $\text{P2X}_4$  en lisosomas y cuerpos lamelares (Qureshi et al., 2007; Huang et al., 2014; Miklavc et al., 2011).



**Fig. 3. Organización molecular de los receptores P2X.** En la estructura cristalina del canal se muestran los sitios de unión a ATP, el vestíbulo extracelular donde se acumulan los diferentes iones, las fenestraciones laterales por donde generalmente se produce su entrada y una hendidura (*crevice*) con función actualmente desconocida, si bien puede tener relación con la inactivación lipídica del canal. Imagen modificada de Habermacher et al., 2016.

## INTRODUCCIÓN

---

Los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) son ROCC ionotrópicos que pertenecen a la superfamilia de receptores *Cys-loop*. Estructuralmente son homo/heteropentámeros que configuran un canal permeable a  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . La gran variedad de subunidades existentes configuran su permeabilidad. Se expresan en una gran variedad de tejidos, principalmente en sistema nervioso central y periférico, con un papel crucial en la sinapsis de la placa motora. También se expresan en un gran número de células no neuronales como las células del epitelio bronquial y del sistema inmune (Karlin, 1993; Wu & Lukas, 2011). Se han descrito dos mecanismos para la actuación del nAChR; uno mediante despolarización de la membrana plasmática, propio únicamente de células excitables, y otro asociado a la entrada e inicio de la señalización por  $\text{Ca}^{2+}$ . Se han descrito una gran variedad de agonistas para estos canales siendo los más representativos la acetilcolina (ACh) y la nicotina (Gündisch & Eibl, 2011).

Los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDAR), son ROCC ionotrópicos de la superfamilia de receptores *de Glutamato*, con una permeabilidad a iones no selectiva pero más específica a  $\text{Ca}^{2+}$ . Estructuralmente son tetrámeros compuestos por dos subunidades esenciales GluN1 y dos subunidades GluN2(A-D) o GluN3(A-B) (Brothwell et al., 2008). Son activados por el neurotransmisor glutamato y bloqueados por  $\text{Mg}^{2+}$  en forma dependiente de voltaje. Dentro de la familia de receptores de glutamato, su lenta activación e inactivación, que desencadena una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  prolongada, les hace idóneos para la plasticidad sináptica, teniendo importancia en procesos de memoria y aprendizaje (Sanz-Clemente et al., 2013).

### 3.2.1.3 Canales de calcio operados por depósitos (SOCC).

Una de las principales fuentes de  $\text{Ca}^{2+}$  para señalización proviene de los depósitos intracelulares y en especial del ER, cuya homeostasis resulta crítica, ya que niveles bajos de  $\text{Ca}^{2+}$  en este depósito pueden desencadenar fenómenos de estrés celular o apoptosis. En las décadas de los 80-90s diversos grupos de investigación propusieron que ante una depleción de  $\text{Ca}^{2+}$  en el ER, por ejemplo inducida por estímulos de  $\text{IP}_3$  o  $\text{Ca}^{2+}$  a través de receptores de  $\text{IP}_3\text{R}$  y  $\text{RyR}$  respectivamente, las ATPasas de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarco/endoplásmico (SERCA), participarían en la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en colaboración con un conjunto de canales regulados por el nivel de llenado de dicho depósito, en un mecanismo denominado entrada capacitativa de  $\text{Ca}^{2+}$  o SOCE.

Posteriormente, se detectó una corriente principalmente de  $\text{Ca}^{2+}$ , e independiente de voltaje, receptores y cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]_C$ , denominada  $I_{\text{CRAC}}$  (*Calcium Release Activated Current*) evidencia de dicho mecanismo (Putney, 1986; 1990; Hoth & Penner, 1992). Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por depósitos intracelulares (*Stored Operated Calcium Channels*; SOCC) se activan, por tanto, en respuesta a una disminución de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  de los depósitos intracelulares, y suponen la principal vía de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular en células no excitables, y una vía importante en células excitables.

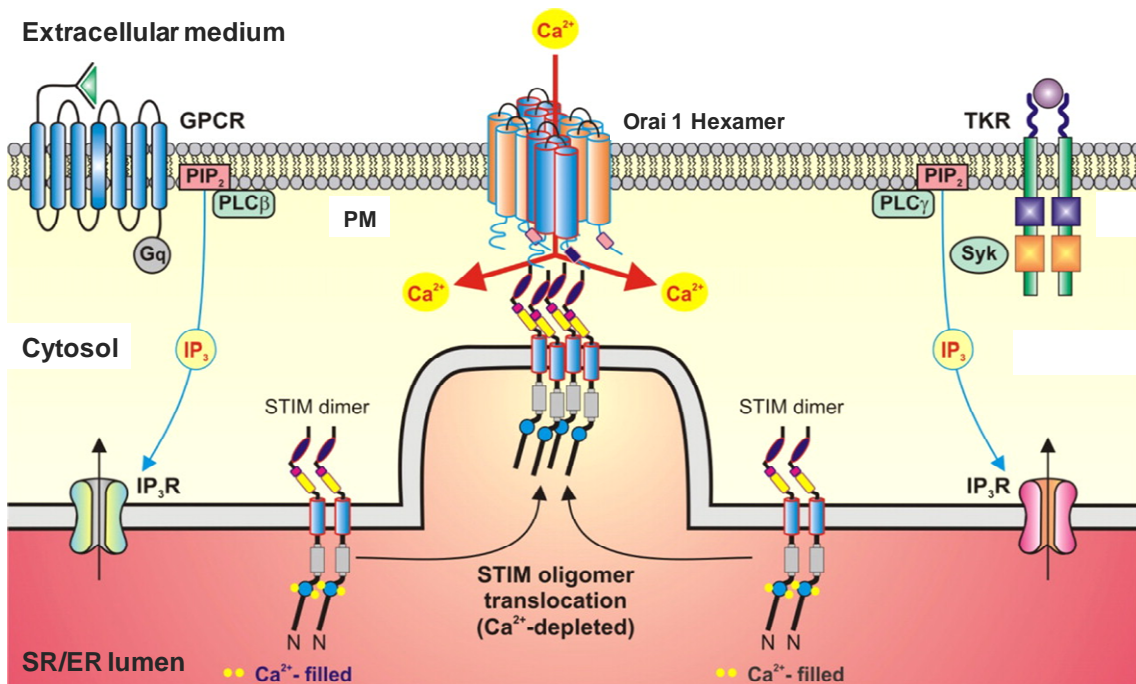
Si bien este modelo SOCE fue ampliamente aceptado, ha existido un debate sobre la identidad de los componentes implicados y su funcionamiento. Diversos estudios genómicos identificaron el papel de las proteínas STIM (*STromal Interaction Molecule*) y Orai en la entrada operada por depósitos (Ross et al., 2005; Feske et al., 2006). STIM es una proteína transmembrana compuesta de un dominio C-terminal dispuesto en el citosol y el N-terminal en el lumen de los depósitos, fundamentalmente el ER. En el dominio C-terminal se distingue una región CAD (*CRAC Activation Domain*) y en el dominio N-terminal un dominio EF-SAM (*EF-Hand – Sterile Alfa Motif*). La región SAM presenta residuos hidrofóbicos responsables de la oligomerización de STIM. En humanos existen dos tipos de STIM (STIM1-2) y tres tipos de proteína Orai presenta (Orai1-3) siendo STIM1 y Orai1 las más activas. Orai se encuentra localizada en la membrana plasmática y estructuralmente se compone de cuatro hélices transmembrana situándose los extremos C-terminal y N-terminal en el lado citosólico con regiones altamente conservadas en la interacción con STIM. Es responsable de la formación del poro del canal con alta selectividad por  $\text{Ca}^{2+}$  frente a  $\text{Na}^+$ . Actualmente se ha asumido que dicho canal es un hexámero de unidades Orai (Hou et al., 2012). Previamente al descubrimiento de Orai, se propusieron los canales VOCC y TRP como responsables de la entrada capacitativa. La participación de los canales TRP en la entrada capacitativa sigue siendo objeto de debate en la actualidad (Cheng et al., 2013).

Históricamente se han propuestos diversos mecanismos del proceso de entrada capacitativa, como la existencia de un mensajero difusible, fusión y exocitosis de vesículas que contuvieran los SOCC e incluso un acoplamiento directo entre canales similar al visto en la excitación-contracción del músculo esquelético (Berridge, 2012).



## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el modelo más aceptado implica a las proteínas STIM1 y Orai1 (**Fig. 4**). En situación de reposo los niveles de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el ER ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ ) se sitúan entre 400-700 $\mu\text{M}$  y el  $\text{Ca}^{2+}$  del lumen reticular se encontraría unido a la región *EF-Hand* formando un complejo estable (EF-SAM) con el dominio SAM de STIM1. En este momento tanto STIM1 como Orai1 estarían distribuidos libremente en la membrana del ER y plasmática respectivamente. La depleción de  $\text{Ca}^{2+}$  del ER desencadenaría el cambio conformacional de *EF-Hand* y la desestabilización del complejo EF-SAM que conduciría a la autoasociación de STIM1. Seguidamente, los oligómeros de STIM1 translocarían a las uniones entre el ER y la membrana plasmática, zonas más probables de interacción con Orai1 que, a su vez, oligomerizaría y formaría el canal por acción de los agregados de STIM1 (Xu et al., 2006; Luik et al., 2008; Shim et al., 2015). STIM1 se une a Orai1 en dos posibles regiones a través del CAD con apertura del poro e inicio de la corriente  $I_{\text{CRAC}}$ , generándose un microdominio de alto  $\text{Ca}^{2+}$  rápidamente captado por las SERCA del ER.



**Fig. 4.** El papel de STIM y Orai en el mecanismo SOCE. Los dímeros de STIM interactúan con  $\text{Ca}^{2+}$  (bolas amarillas) a través del dominio *EF-Hand* de baja afinidad del extremo N-terminal cuando el SR/ER está lleno o con una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el ER ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ ) alrededor de 1mM. La depleción del SR/ER mediada, por ejemplo, a través de  $\text{IP}_3\text{R}$  desencadena la oligomerización y translocación de los dímeros de STIM a las uniones con la membrana plasmática. La acumulación de los oligómeros de STIM en la proximidad de Orai induce la formación y apertura del canal, y la entrada capacitativa de  $\text{Ca}^{2+}$ . Las cascadas de señalización a través de fosfolipasas C (PLC) como receptores acoplados a proteínas G (GPCR) o de tirosina-quinasa (TKR), son ejemplos de señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de  $\text{IP}_3$ . Imagen modificada de Kuhr et al., 2012.



Recientes estudios afirman que STIM en condiciones de reposo celular forma dímeros que interaccionan unimolecularmente con cada unidad Orai del canal (Zhou et al., 2015).

Todo este mecanismo de entrada capacitativa se encuentra altamente regulado por cambios en el potencial de membrana,  $\text{Ca}^{2+}$ , variaciones en el pH y procesos de fosforilación en regiones clave de STIM y Orai. Existe un conjunto de proteínas de anclaje, de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  y chaperonas que pueden interaccionar y regular la actividad de STIM1 y Orai1, como septina, CRAC2A (*CRAC regulatory protein 2A*), junctato y CaM (Shim et al., 2015; Hogan & Rao, 2015). Los otros tipos de STIM y Orai, dadas sus propiedades de sensibilidad y cinética, pueden intervenir en procesos de relleno de depósitos como las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$ . El mecanismo SOCE, aparte de su función primordial de relleno de depósitos, desencadena otros procesos fisiológicos en las células como la proliferación celular. En neuronas, el SOCE puede intervenir en la plasticidad de la señal sináptica y el crecimiento dirigido del axón (Pinto et al., 2015; Majewski & Kuznicki, 2015).

### 3.2.1.4 Canales de calcio operados por segundos mensajeros (SMOCC).

Los canales SMOCC (*Second Messenger Operated Calcium Channels*) se activan por segundo mensajeros procedentes de las diversas cascadas de señalización. Los ejemplos más representativos de este grupo son los canales activados por nucleótidos cíclicos (CNGC), fundamentalmente cAMP y cGMP, y los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  regulados por ácido araquidónico (ARC) (Bird et al., 2004). Los canales activados por nucleótidos cíclicos son canales de  $\text{Ca}^{2+}$  que también transportan  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  con menor afinidad, y que desempeñan un papel crucial en la transducción de estímulos sensoriales, expresándose en bastones y conos retinales, y cilios olfativos. Estructuralmente son heterotetrámeros compuestos por subunidades formadoras del poro CNGCA<sub>1-3</sub> y subunidades moduladoras CNGCA<sub>4</sub> y CNGCB<sub>1-2</sub> con sitios de interacción con CaM (Bradley et al., 2005). Por otra parte, los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  regulados por ácido araquidónico son canales altamente selectivos a  $\text{Ca}^{2+}$ , identificados en células acinares de páncreas y glándula parótida, relacionados con la estimulación por glucosa y secreción de insulina (Yeung-Yam-Wah et al., 2010). Estos canales se activan por ácido araquidónico a través de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>).

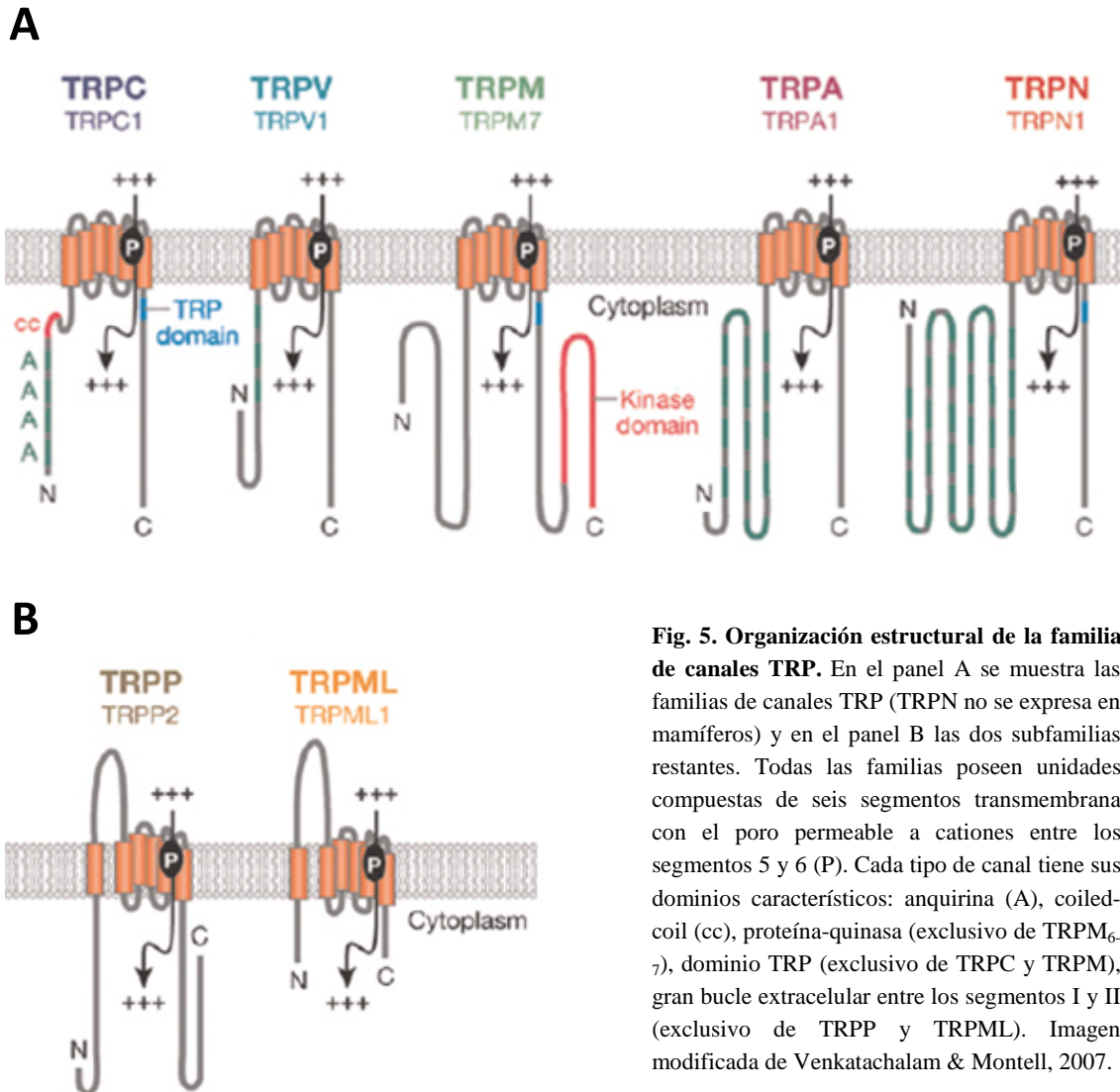
Además, dichos canales se pueden modular por procesos fosforilativos a través de PKA o CaN, activándose o inactivándose respectivamente.

### 3.2.2 Superfamilia de canales de calcio TRP.

Los canales TRP (*Transient Receptor Potential*) constituyen una amplia y diversa familia de más de 30 canales que se expresa en multitud de tipos celulares tanto en la membrana plasmática como en membranas de diversos orgánulos, de ahí que constituyan un apartado propio en el presente trabajo. Estos canales actúan en diversas funciones regulando el paso de iones, principalmente  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$ . Se activan por una gran variedad de estímulos extra e intracelulares de naturaleza física (temperatura, deformaciones mecánicas, presión osmótica) o química (productos naturales, pH,  $\text{PO}_2$ , ROS, neurotransmisores, factores de crecimiento, citoquinas) e incluso pueden exhibir un comportamiento voltaje-dependiente.

Están involucrados en multitud de procesos fisiológicos como fotorrecepción, detección de feromonas, sensibilidad térmica y mecánica, nocicepción, mantenimiento renal de  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ , mantenimiento de tono muscular y regulación de presión sanguínea (Clapham, 2003; Pedersen et al., 2005; Nilius & Owsianik, 2011). En vertebrados hay 28 genes que codifican los TRP. Estos canales se clasifican en siete familias atendiendo a diversas homologías: TRPC (clásicos), TRPV (vaniloides), TRPM (melastatina), TRPA (anquirina), TRPN (no expresado en mamíferos), TRPML (mucolipidinas), TRPP (policistina) (Ramsey et al., 2006). De todos los canales TRP, aquellos que están estrechamente relacionados con los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  son todos los TRPC, TRPV, y TRPML,  $\text{TRPM}_{2, 3, 6, 7, 8}$ ,  $\text{TRPA}_1$ , y  $\text{TRPP}_{2, 3, 5}$ . Estructuralmente se encuentran relacionados con los canales VOCC y ROCC, constituidos por homo-heterotetrámeros, con unidades de seis segmentos transmembrana, con el dominio formador del poro localizado entre los segmentos 5 y 6 y los extremos C-terminal y N-terminal dispuestos en el lado citosólico (**Fig. 5**).

Los TRPC constituyen una familia de canales no selectivos de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$ . Existen siete tipos de TRPC ( $\text{TRPC}_{1-7}$ ) con diferente permeabilidad selectiva a  $\text{Ca}^{2+}$ . En general, son activados por receptores que interaccionan con las diferentes isoformas de fosfolipasa C (PLC) (Hofmann et al., 1999).



**Fig. 5. Organización estructural de la familia de canales TRP.** En el panel A se muestra las familias de canales TRP (TRPN no se expresa en mamíferos) y en el panel B las dos subfamilias restantes. Todas las familias poseen unidades compuestas de seis segmentos transmembrana con el poro permeable a cationes entre los segmentos 5 y 6 (P). Cada tipo de canal tiene sus dominios característicos: anquirina (A), coiled-coil (cc), proteína-quinasa (exclusivo de TRPM<sub>6</sub>,  $\gamma$ ), dominio TRP (exclusivo de TRPC y TRPM), gran bucle extracelular entre los segmentos I y II (exclusivo de TRPP y TRPML). Imagen modificada de Venkatachalam & Montell, 2007.

Se expresan en una amplia gama de tipos celulares y desempeñan funciones diversas, como el crecimiento de conos neuronales, y proliferación y remodelado de células de músculo esquelético. La segregación de estos canales esta mediada por la interacción con diversas proteínas que determinan su localización y regulación en dominios celulares funcionalmente distintos (Ambudkar et al., 2006). La interacción de alguno de sus heterotetrámeros con STIM1 y Orai ha abierto un debate sobre su contribución en la SOCE (Cahalan, 2009; Cheng et al., 2013).

Los TRPV son una familia de canales con seis formas (TRPV<sub>1-6</sub>), caracterizados por su relativa permeabilidad al Ca<sup>2+</sup> frente iones monovalentes, siendo los canales TRPV<sub>5</sub> y TRPV<sub>6</sub> los más selectivos para Ca<sup>2+</sup> de esta familia.

Se expresan en células sensoriales y terminales nerviosas periféricas, cerebro y espina dorsal, así como intestino, riñón y piel. Sus funciones abarcan la nocicepción y respuesta frente a aumentos de temperatura, compuestos naturales como la capsaicina y lípidos de respuestas inflamatorias, y procesos de absorción de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (Hoenderop et al., 2005; Vay et al., 2012). Su expresión y activación está estrechamente relacionada con la proliferación o la apoptosis en diferentes líneas tumorales (Kondratskyi et al., 2015; Stewart et al., 2015).

Los TRPM constituyen una familia de canales con permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  muy variable, presentando ocho formas (TRPM<sub>1-8</sub>). Algunas formas como TRPM<sub>2</sub> y TRPM<sub>7</sub> son capaces de ejercer una doble función como canales y enzimas. Las formas TRPM<sub>4</sub> y TRPM<sub>5</sub> son canales de iones monovalentes que sin embargo están regulados por  $\text{Ca}^{2+}$  y participan en la modulación de oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  para procesos como secreción de insulina en células  $\beta$ -pancreáticas (Launay et al., 2002; Minke, 2006). TRPM<sub>8</sub> es un canal con alta permeabilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  que funciona como receptor del frío en neuronas sensoriales (McKemy et al., 2002).

Los canales de iones no selectivos a  $\text{Ca}^{2+}$  TRPML están asociados a compartimentos ácidos como endosomas y lisosomas, participando en procesos como fusión, fisión y autofagia (Cheng et al., 2010). Presentan tres formas (TRPML<sub>1-3</sub>). Se ha sugerido que TRPML<sub>1</sub> podría ser el receptor de ácido nicotínico-adenín-dinucleótido-fosfato (NAADPR), liberando  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de este segundo mensajero, si bien este hecho es controvertido (Zhang & Li, 2007; Lloyd-Evans et al., 2010).

### 3.2.3 Canales de calcio de los depósitos intracelulares.

La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares tiene un papel crucial en la generación de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en numerosos tipos celulares. Dentro de los diferentes depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$ , el ER es uno de los más importantes. Este compartimento presenta dos tipos de canales de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ : los RyR y los IP<sub>3</sub>R (Berridge, 1993). No obstante, existen otros tipos de reservorios de  $\text{Ca}^{2+}$  como el GC y otros compartimentos ácidos que pueden presentar diversos sistemas de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  como los ya vistos canales TRP y P2X y los canales de dos poros (TPC) (Calcraft et al., 2009).

Hay que mencionar que en el ER existe además una difusión pasiva y constante de  $\text{Ca}^{2+}$  (*leak*). Esta difusión se produce a favor de gradiente electroquímico y toma parte en el equilibrio dinámico de la  $[\text{Ca}^{2+}]_C$ , siendo especialmente visible cuando las SERCA se encuentran bloqueadas por tapsigargina (Camello et al., 2002). En la actualidad, el mecanismo de esta vía de difusión es todavía desconocido, sugiriéndose varios candidatos, entre ellos los propios  $\text{IP}_3\text{R}$  y RyR, el complejo del traslocón especialmente activo en células secretoras, miembros de los canales TRP como TRPP2, presilinas y miembros de la familia de proteínas antiapoptóticas como BCL-2 y BI-1 (*BAX-inhibitor-1*) (Sammels et al., 2010).

### 3.2.3.1 Receptores de $\text{IP}_3$ ( $\text{IP}_3\text{R}$ ).

Los receptores de  $\text{IP}_3$  ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) son responsables de la mayor parte de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  interno en la célula, y han sido motivo de un amplio estudio desde la década de los 80s hasta la actualidad. Fueron extraídos y purificados por primera vez de cerebelo de rata (Supattapone et al., 1988). La clonación de su cDNA colaboró con el comienzo de los estudios de estructura y función para el descubrimiento de las diversas propiedades de los  $\text{IP}_3\text{R}$  nativos y recombinantes (Mignery & Südhof, 1990; Miyawaki et al., 1991; Wagner & Yule, 2012). Se tratan de canales catiónicos con una alta conductancia (50-80ps) y baja selectividad a  $\text{Ca}^{2+}$  (Bezprozvanny & Ehrlich, 1994).

En mamíferos existen tres tipos ( $\text{IP}_3\text{R1}$ ,  $\text{IP}_3\text{R2}$  e  $\text{IP}_3\text{R3}$ ), de los cuales el primero ha sido el más extensamente estudiado, y dentro de estos tipos numerosas isoformas variantes de procesamiento alternativo. Todos ellos comparten entre un 60-80% de identidad en la secuencia de aminoácidos. Los  $\text{IP}_3\text{R}$  se encuentran localizados fundamentalmente en la membrana del ER tanto liso como rugoso, aunque también se pueden expresar en el complejo de Golgi, la envuelta nuclear, y en los gránulos de secreción (Lam & Galione, 2013). Si bien el  $\text{IP}_3\text{R}$  se expresa de forma ubicua en mamíferos, la forma  $\text{IP}_3\text{R1}$  es predominante en el sistema nervioso, especialmente en células de Purkinje, mientras que en hepatocitos y células musculares cardiacas, se expresa en mayor proporción  $\text{IP}_3\text{R2}$  (Taylor et al., 1999). La forma  $\text{IP}_3\text{R3}$  se expresa en menor proporción, distribuido de forma ubicua.

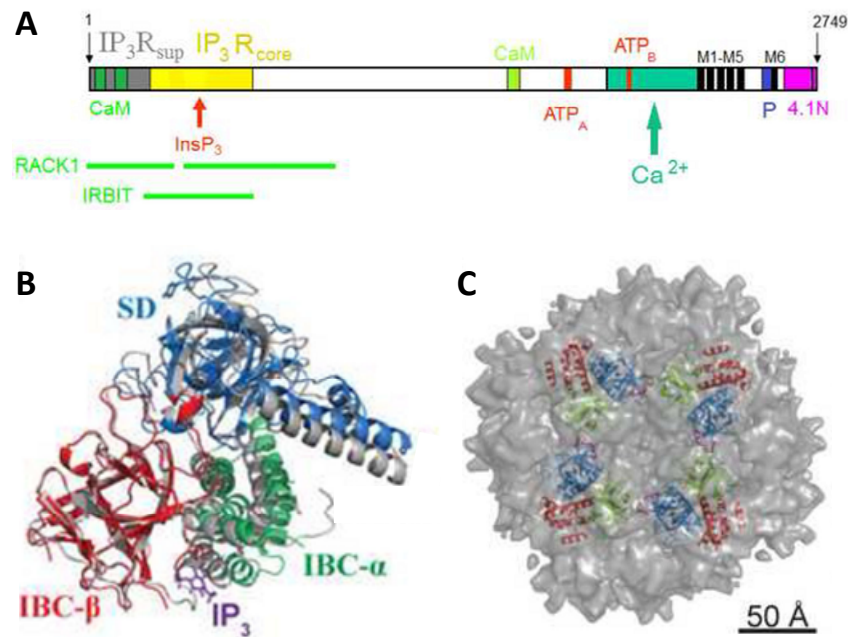
## INTRODUCCIÓN

---

Estructuralmente los IP<sub>3</sub>R son complejos macroproteicos, homo-heterotetrámeros, que constituyen un único canal, con una forma característica similar a la de una seta con un peso molecular que excede de 1MDa (**Fig. 6C**). Cada subunidad que configura el tetrámero presenta una pequeña región citoplasmática C-terminal de 150aa, un conjunto de seis segmentos transmembrana TM<sub>1</sub> - TM<sub>6</sub>, siendo TM<sub>5</sub> y TM<sub>6</sub> los responsables de la configuración del poro, y una región citoplasmática N-terminal, que constituye aproximadamente el 85% de la proteína (Mikoshiya, 2007; Foskett et al., 2007) (**Fig. 6A**). En esta región N-terminal se diferencia un dominio de modulación, un dominio de unión a IP<sub>3</sub> (*IP<sub>3</sub>-Binding Core*; IBP), y un dominio supresor (SD). El dominio de modulación, que abarca unos 1700aa, posibilita el cambio conformacional tras la unión del IP<sub>3</sub> y contiene secuencias consenso para la fosforilación e interacción a diversos reguladores alostéricos. El dominio IBP se divide en dos motivos (IBP $\alpha$ , IBP $\beta$ ) en cuya unión se encuentran 10 residuos básicos responsables de la unión a IP<sub>3</sub> (Bosanac et al., 2002). El dominio SD si bien reduce la afinidad de unión a IP<sub>3</sub>, es necesario para la activación alostérica del canal e inicia el cambio conformacional que permite la apertura del canal (Uchida et al., 2003) (**Fig. 6B**).

Los agonistas principales de los IP<sub>3</sub>R son IP<sub>3</sub> y Ca<sup>2+</sup>. La estimulación de la cascada de señalización de PLC, bien a través de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), o receptores de tirosina-quinasa (TKR), permite la hidrólisis de PIP<sub>2</sub> (fosfatidilinositol(4,5)bisfosfato), generando los segundos mensajeros diacilglicerol (DAG) e IP<sub>3</sub> (Berridge & Irvine, 1984). El cambio conformacional derivado de la unión a IP<sub>3</sub> es responsable de la unión a Ca<sup>2+</sup> que desencadena la apertura del canal y el flujo de salida de Ca<sup>2+</sup> desde los depósitos intracelulares, mediante el mecanismo denominado CICR (*Calcium Induced Calcium Release*). Este mecanismo CICR fue originalmente descrito en RyR. Además, este ión juega un papel fundamental en la modulación de la señalización de Ca<sup>2+</sup> inducida por IP<sub>3</sub>. A [Ca<sup>2+</sup>]<sub>C</sub> < 300nM existe una mayor probabilidad de apertura del canal que va decreciendo según esta [Ca<sup>2+</sup>] aumenta. La inhibición por Ca<sup>2+</sup> es un mecanismo de retroalimentación negativa que evita la salida de este ión a partir de cierta [Ca<sup>2+</sup>]<sub>C</sub> alrededor de la boca del canal, incluso en presencia de IP<sub>3</sub>. Este comportamiento bifásico queda representado en forma de distribución gaussiana, entre la probabilidad de apertura y la [Ca<sup>2+</sup>], la cual puede a su vez variar según la isoforma de IP<sub>3</sub>R (Regan et al., 2005; Marchenko et al., 2005).





**Fig. 6. Secuencia y estructura del IP<sub>3</sub>R.** En la parte superior (A) se muestra la secuencia proteica de una subunidad del IP<sub>3</sub>R1. Se exponen desde el extremo N-terminal al C-terminal los dominios SD, IBC, de modulación, transmembrana y formación del poro (P), y el fragmento de 150aa con los sitios de interacción de diversos agonistas y reguladores. En la parte inferior izquierda (B) se muestra la superposición de los dominios SD e IBC(α-β) y el *loop* de unión en ausencia (azul, verde, rojo y morado) o presencia de IP<sub>3</sub> (gris). En la parte inferior derecha (C) se muestra una representación frontal del IP<sub>3</sub>R mediante Cryo-EM (*Electron Microscopy*) en configuración cerrada, donde se observa el tetrámero de dominios SD, IBC(α-β), y de modulación con el *loop* de unión correspondiente (azul, verde, rojo, gris y morado respectivamente). Imagen modificada de Fedorenko et al., 2014.

Además, la señal de Ca<sup>2+</sup> mediada por IP<sub>3</sub>R se puede organizar en tres niveles consecutivos de funcionalidad. A bajas concentraciones de ambos agonistas se da activación de un solo IP<sub>3</sub>R generándose un rápido y pequeño microdominio de Ca<sup>2+</sup>, denominado *blip* (Parker & Yao, 1996). Conforme la concentración de IP<sub>3</sub> aumenta, los IP<sub>3</sub>R cercanos distribuidos aleatoriamente, son capaces de organizarse rápida y reversiblemente en agregados que liberan Ca<sup>2+</sup> gracias al *blip* mediante CICR generando *puffs* de mayor [Ca<sup>2+</sup>] (Yao et al., 1995), hasta que finalmente en altas concentraciones de IP<sub>3</sub> los *puffs* actúan como sitios propagadores de la onda de Ca<sup>2+</sup> que viaja a través de toda la célula (Berridge, 2009). La regulación a nivel local y general de los IP<sub>3</sub>R por Ca<sup>2+</sup> es crucial en la generación de oscilaciones de Ca<sup>2+</sup> citosólico y la modulación espacio-temporal de la señal de Ca<sup>2+</sup> (Bezprozvanny et al., 1991; Konieczny et al., 2012).

Como se ha mencionado previamente, existen otros reguladores alostéricos a parte de  $IP_3$  y  $Ca^{2+}$  que modulan los  $IP_3R$ . Entre otros están las variaciones de pH, nucleótidos como ATP, AMP y GTP y proteínas como CaM, cromogranina A (CgA), IRBIT (*IP<sub>3</sub>R Binding Protein Released with Inositol(1,4,5)Trisphosphate*), RACK1 (*Receptor for Activated C Kinase 1*), proteína 4.1N y BCL-2. Además, estos canales están también fuertemente regulados por diferentes quinasas fosforilando en sitios consenso, entre las que se incluyen las siguientes: PKA, la proteína quinasa dependiente de cGMP (PKG), y CaMKII, (Michikawa et al., 1999; Chen et al., 2004; Bezprozvanny, 2005; Foskett et al., 2007). Entre los inhibidores destacan el  $Mg^{2+}$ , cafeína, heparina y xestoponginas (Maruyama et al., 1997; Kasri et al., 2004).

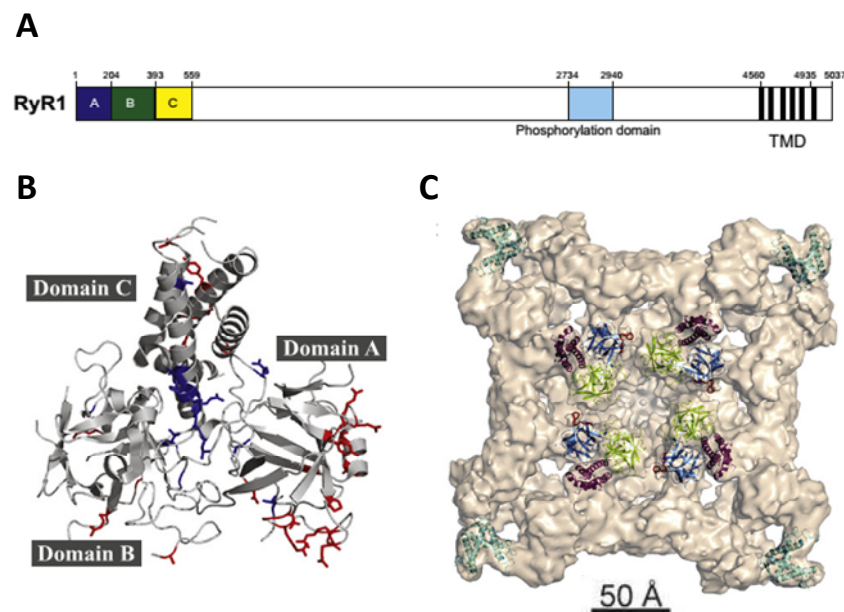
### 3.2.3.2 Receptores de Rianodina (RyR).

Dada su importancia, los receptores de rianodina (RyR) al igual que los  $IP_3R$  han sido investigados desde hace al menos 40 años. Observados por primera vez mediante microscopía electrónica en músculo esquelético (Franzini-Armstrong, 1970) fueron posteriormente extraídos y purificados de este mismo tejido, comenzando así el estudio de su estructura, expresión y propiedades (Lai et al., 1988; Seo et al., 2015). Se trata de un canal catiónico de alta conductancia (100ps) y baja selectividad al  $Ca^{2+}$ .

En mamíferos el RyR presenta tres formas (RyR1, RyR2 y RyR3) codificadas por genes diferentes, con una homología de secuencia del 65-70% entre ellas, existiendo además isoformas variantes de procesamiento alternativo (Hakamata et al., 1992; Rossi & Sorrentino, 2002). RyR1 se encuentra distribuido en músculo esquelético, y en menor medida en ciertas aéreas del sistema nervioso central, células hematopoyéticas, y músculo liso y cardiaco. RyR2 es característico de músculo cardiaco, diversas regiones del cerebelo y córtex central. RyR3 se encuentra distribuido con baja expresión de forma ubicua y en mayor proporción en neuronas de hipocampo, tálamo, células de Purkinje y en general en células no excitables (Lanner et al., 2010; Hwang et al., 2012). En cuanto a su expresión intracelular, los RyR se localizan fundamentalmente en el ER/SR aunque también se ha demostrado funcionalmente su presencia en envoltura nuclear, mitocondria e incluso compartimentos acídicos como los gránulos de secreción (Mitchell et al., 2001; Marius et al., 2006; McNally et al., 2014; Patel & Cai, 2015).



Estructuralmente los RyR son muy similares a los IP<sub>3</sub>R a pesar de compartir menos del 17% de homología en su secuencia. Son los canales iónicos más grandes descubiertos hasta la fecha, formados por homo-heterotetrámeros que exceden los 2,2MDa (**Fig. 7C**). Cada subunidad, con más de 5000aa, presenta un conjunto de dominios transmembrana con seis - ocho segmentos por subunidad (Du et al., 2002), y una región citoplasmática N-terminal, que constituye aproximadamente el 80% de la proteína (Van-Petegem, 2012). En esta región N-terminal se diferencian tres dominios A, B y C, posibles iniciadores del cambio conformacional que permite la apertura del canal y en las que se han detectado mutaciones del canal asociadas a enfermedades musculares como la hipertermia maligna (HM) en RyR1 o la taquicardia ventricular catecolaminérgica polimórfica (CVPT) en RyR2 (**Fig. 7B**). La región N-terminal citosólica contiene secuencias consenso para fosforilación, e interacción con diversas proteínas e iones que modulan la actividad del canal, y es donde se encuentran las posibles zonas de unión a Ca<sup>2+</sup>, dividiéndose en zonas de activación del canal con alta afinidad y las zonas de inactivación del canal con baja afinidad (**Fig. 7A**) (Hwang et al., 2012).



**Fig. 7. Secuencia y estructura del RyR.** En la parte superior (A) se muestra la secuencia proteica de una subunidad del RyR1. Se exponen desde el extremo N-terminal al C-terminal los dominios A, B, C, el resto citosólico y los segmentos transmembrana (TMD), con los sitios de fosforilación. En la parte inferior izquierda (B) se muestra la estructura de los dominios A, B y C con las zonas activas de mutación (azul, y rojo) En la parte inferior derecha (C) se muestra una representación frontal del RyR mediante Cryo-EM en configuración cerrada, donde se observa el tetrámero de dominios A, B y C, y el resto citosólico con la zona de fosforilación correspondiente (azul, amarillo, rojo, gris y verde respectivamente). Imagen modificada de Seo et al., 2015.

## INTRODUCCIÓN

---

Los RyR deben su nombre al alcaloide rianodina, que tiene sobre el receptor un efecto bifásico siendo estimulador a bajas concentraciones e inhibidor a altas (Buck et al., 1992). No obstante, el principal activador y modulador de los RyR es el propio  $\text{Ca}^{2+}$  y es en estos receptores donde primeramente se describió el mecanismo CICR (Berridge, 1997). Este ión puede actuar directamente en el receptor o de forma indirecta en el lumen de los depósitos mediante proteínas que interaccionen con  $\text{Ca}^{2+}$ , modulando la actividad de los RyR. Similar a la acción con los  $\text{IP}_3\text{R}$ , el  $\text{Ca}^{2+}$  regula la probabilidad de apertura de los RyR de forma bifásica, con la salvedad que la inactivación del canal por  $\text{Ca}^{2+}$  se produce a concentraciones superiores a  $100\mu\text{M}$ . En el caso de RyR2 se ha descrito una región, localizada en el lumen del SR, con secuencias homologas a *EF-Hand* que podría actuar como sensor de  $\text{Ca}^{2+}$ . La activación del canal provocaría una depleción transitoria del SR localizada en el entorno del canal (*Blink*) que desencadenaría su inactivación rápidamente (Brochet et al., 2005).

La contracción muscular, tanto esquelética como cardiaca, es el fenómeno por excelencia que explican la funcionalidad de los RyR. En músculo esquelético los VOCC, o más bien los DHPR, están directamente acoplados a los RyR1 formando una estructura tridimensional con DHPR y RyR1 en proporción 4:1. La despolarización de la membrana plasmática induce apertura de los DHPR y este cambio conformacional se transmite a los RyR1 provocando su apertura. Este proceso denominado VICR (*Voltage Induced Calcium Release*) no requiere inicialmente el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  para la apertura de los RyR1 (Beam & Bannister, 2010). En músculo cardiaco, se produce una interacción no tan estrecha entre los canales  $\text{Ca}_v1.2$  y agregados de RyR2 en proporción 10:100. La despolarización de la membrana permite la apertura de los  $\text{Ca}_v1.2$  entrando  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular y formando un pequeño y rápido microdominio de  $\text{Ca}^{2+}$  (*Sparklet*). Este microdominio se amplifica considerablemente a través de los agregados de RyR2 mediante CICR. Estos nuevos microdominios de alto  $\text{Ca}^{2+}$  (*Spark*) se extienden rápidamente, siendo los responsables del proceso de contracción (Berridge, 2006). En el caso de células neuroendocrinas existe controversia sobre el papel de los RyR, principalmente debido a su baja expresión en estos tipos celulares. Generalmente la isoforma RyR2 es la más comúnmente expresada. En neuronas se ha evidenciado la existencia de acoplamiento funcional entre VOCC o ROCC y RyR, acoplamiento que interviene en la regulación de la plasticidad sináptica (Bardo et al., 2006).

En células cromafines la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  por RyR dirige principalmente el proceso de la exocitosis y en células  $\beta$ -pancreáticas estimula la secreción de insulina (Islam, 2002).

Los RyR se inhiben por  $\text{Mg}^{2+}$ , rianodina y el fármaco dantroleno. El ATP es un fuerte activador del canal. Además, los RyR se encuentran modulados por proteínas reguladas por  $\text{Ca}^{2+}$  como CaM, CaMKII, S100A1 y CSQ, immunofilinas como la familia de proteínas de unión FK506 (FKBP), PKA. Pueden sufrir modificaciones fosforilativas y del estado *redox* que regulan su actividad (Hwang et al., 2012). Otros posibles activadores descritos son ADP ribosa cíclica (cADPR) y NAADP (Galione, 2011; Patel & Cai, 2015).

### 3.2.3.3 Canales de dos poros (TPC).

Los canales de dos poros (*Two Pore Channels*; TPC) están estructuralmente configurados por un conjunto de 2 x 6 segmentos transmembrana dispuestos en tándem, formando dímeros que mantiene una simetría similar a la de los canales voltaje-dependientes. Son canales permeables a iones monovalentes como  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , y a  $\text{Ca}^{2+}$ . Presentan dos formas en humanos (TPC<sub>1-2</sub>) y se expresan fundamentalmente en el sistema endolisosomal (Brailoiu et al., 2009; Calcraft et al., 2009). Existen numerosas evidencias de que el canal TPC<sub>2</sub> podría ser el NAADPR, movilizándolo  $\text{Ca}^{2+}$  a través de este segundo mensajero, e incluso participando en el mecanismo CICR de otros depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  cercanos (Patel & Docampo, 2010; Hooper & Patel, 2012). No obstante, recientes experimentos han demostrado que los TPC son canales de  $\text{Na}^+$ , insensibles a NAADP pero no a  $\text{PIP}_2$ , fomentando la controversia sobre su posible activación (Wang et al., 2012).

### 3.2.4 Otros segundos mensajeros iniciadores de la señal de calcio.

Hasta se ha hablado de la importancia del  $\text{IP}_3$  como segundo mensajero de  $\text{Ca}^{2+}$  y su papel en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares. No obstante en la literatura y desde hace más de 20 años, se han descrito otros segundos mensajeros iniciadores de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ : cADPR y NAADP. Estos segundos mensajeros derivan del nicotinamida-adenin-dinucleótido (NAD y NADP respectivamente) (Lee et al., 1994; Lee & Aarhus, 1995).

Ambos compuestos son sintetizados por las proteínas CD157 y CD38, homólogos en mamíferos de la familia de enzimas ADP-ribosil-ciclasas solubles. CD38 es la más estudiada, presentando un único fragmento transmembrana, con una pequeña región N-terminal y un dominio C-terminal que posee la actividad enzimática responsable de la catálisis de reacciones de ciclación, cambio de base e hidrólisis (Ferrero et al., 2014). Similar al caso de otros segundos mensajeros, diversos agonistas extracelulares estimulan la actividad de estas enzimas, a través de GPCR o TKR principalmente, provocando un aumento de los niveles citosólicos de cADPR y NAADP (Guse et al., 2005; Galione et al., 2010). La actividad enzimática de CD38 depende de la concentración de los metabolitos y sobre todo del pH. A pH neutro o alcalino se ha descrito que las reacciones predominantes son la ciclación e hidrólisis y, por tanto, la formación de cADPR, si bien pueden existir otras fuentes adicionales para este segundo mensajero (Ceni et al., 2003; Schuber & Lund, 2004). A pH ácido es predominante la reacción de cambio de base y formación de NAADP, lo cual además sugiere los compartimentos ácidos como orgánulos diana para este segundo mensajero (Aarhus et al., 1995; Lee, 2000). La síntesis y transporte de cADPR y NAADP por CD38 plantea un problema topológico ya que los sitios catalíticos de la enzima se encuentran en el exterior de la superficie celular o en el caso de la expresión en orgánulos, en el lumen de los mismos. Ante este hecho, se han investigado activamente dos propuestas.

La primera, plantea la existencia de transportadores de sustratos y productos de CD38 como los hemicanales de la proteína  $\text{Ca}^{2+}$ -dependiente conexina-43 para el intercambio de NAD, y de transportadores de nucleósidos para cADPR y NAADP (Podestà et al., 2005; Billington et al., 2006). La segunda, plantea la coexpresión de CD38 con otra forma de la enzima que presenta una orientación en membrana opuesta, formando un dímero (Zhao et al., 2012). Otro tercer mecanismo, involucra la endocitosis de CD38 seguida de síntesis intracelular de los mensajeros cADPR y/o NAADP (Guida et al., 2002).

### **3.2.4.1 ADP ribosa cíclica (cADPR).**

La primera observación de movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante cADPR se realizó en oocitos de erizo de mar, siendo esta movilización independiente de  $\text{IP}_3$  pero actuando a través del mecanismo CICR (Galione et al., 1991).

En células permeabilizadas de islotes pancreáticos de ratón se ha demostrado que la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por cADPR desempeña un papel crucial en el acoplamiento estímulo-secreción (Takasawa et al., 1993). La mayoría de los estudios sugieren que los RyR, fundamentalmente del ER/SR, son el receptor diana de la cADPR cuyo efecto es similar al de la cafeína pero más potente. En algunos tipos celulares se ha propuesto que pueden ser los RyR2 como en células de feocromocitoma de rata PC12 (Fritz et al., 2005) o los RyR1 y RyR3 como en células embrionarias de riñón HEK293 (Ogunbayo et al., 2011). La acción de cADPR en los RyR requiere factores proteicos adicionales como CaM y FKBP. De hecho, existen evidencias que señalan a las proteínas FKBP como el actual receptor de cADPR. En ausencia de cADPR, las FKBP estarían unidas al RyR impidiendo su activación. En presencia de cADPR, dicha unión se desestabilizaría, desencadenando la apertura de los RyR y la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  (Morita et al., 2006; Zheng et al., 2010). Por otra parte, diversos estudios que realizaron medidas directas de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  en células cromafines no evidenciaron liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por cADPR en el ER así como en otros depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares susceptibles de expresar RyR (Alonso et al., 1999; SantoDomingo et al., 2008). Este hecho sugiere la presencia de otras dianas de este segundo mensajero intracelular.

### 3.2.4.2 Ácido nicotínico-adenín-dinucleótido-fosfato (NAADP).

El NAADP es el segundo mensajero capaz de desencadenar la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  más potente descubierta hasta la fecha, requiriendo pequeñas dosis de este mensajero, del orden de nanomolar e incluso picomolar, para activar la señalización celular (Galione, 2011). Además en células de mamíferos, la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por NAADP exhibe un comportamiento auto-inhibitorio de posteriores liberaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  donde la relación concentración-respuesta para este mensajero describe una distribución gaussiana (Morgan & Galione, 2008). Al igual que la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  estimulada por cADPR, el efecto del NAADP fue descubierto en oocito de erizo de mar, en un compartimento celular posteriormente identificado como gránulos de reserva (Churchill et al., 2002). En mamíferos, la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por NAADP ha sido descrita en varios tipos celulares y desempeña funciones en diferentes eventos fisiológicos. En células de músculo ventricular y atrial, el NAADP está implicado en la señalización del receptor adrenérgico y potenciación de la contracción muscular (Macgregor et al., 2007).

Se ha evidenciado el papel de la señalización por NAADP en la diferenciación de osteoclastos, células de músculo esquelético y neuronas (Parington & Tunn, 2014). En células  $\beta$ -pancreáticas tras la estimulación con glucosa, se ha observado un aumento de los niveles de NAADP y su intervención en la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los SG u orgánulos próximos (Masgrau et al., 2003; Mitchell et al., 2003). En células acinares de páncreas, la estimulación con colestiloquinina (CCK) conlleva una rápida producción de NAADP que precede la generación de oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y estimulación de la secreción (Yamasaki et al., 2005).

Existe una gran controversia sobre los receptores y orgánulos diana del NAADP. Por un lado, se han propuesto los RyR, TRPM4, TRPML-1, TPC1 y TPC2 siendo estos dos últimos canales los que han acumulado más evidencias de ser los posibles NAADPR (Ruas et al., 2010). Estudios recientes con marcaje radiactivo, [ $^{32}\text{P}$ ]-5- $\text{N}_3$ - NAADP, en oocitos de erizo de mar y células de mamífero han mostrado la existencia, no de un canal específico, sino de una proteína soluble que interacciona con NAADP (NAADP-BP) que podría activar los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Lin-Moshier et al., 2012; Guse, 2012). Por otro lado, en cuanto a los orgánulos diana del NAADP, estudios en diversos cultivos celulares han sugerido que estos pueden ser los lisosomas u orgánulos relacionados con ellos. En linfocitos-T se ha propuesto el propio ER (Steen et al, 2007). En células  $\beta$ -pancreáticas y células acinares de páncreas este orgánulo diana parece ser los SG (Gerasimenko et al., 2006; Rizzuto & Pozzan, 2006). Esta controversia puede ser aún más compleja, considerando las interrelaciones de la dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$  existente entre el ER y los depósitos ácidos (Ronco et al., 2015).

### 3.3 Sistemas de recuperación del calcio basal citosólico.

Tras la estimulación celular y el consiguiente aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , es necesario recuperar los niveles basales de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol, para evitar un elevado nivel mantenido de  $\text{Ca}^{2+}$  y preparar a la célula frente a nuevos estímulos. Se han descrito varios mecanismos encargados de mantener los niveles basales de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. En la membrana plasmática, se puede encontrar la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  PMCA y el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  NCX, responsables del transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  al exterior celular.

En la membrana del ER/SR se encuentra la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  SERCA y en menor grado ATPasa de la vía de secreción SPCA. En el GC, por el contrario, es más común la expresión de SPCA frente a SERCA. Además, estos sistemas pueden presentarse en otros depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares como los SG (Mitchell et al., 2001; SantoDomingo et al., 2008; 2010). En la membrana interna de las mitocondrias actúa el MCU captando  $\text{Ca}^{2+}$  a favor de gradiente electroquímico, si bien su función primordial es modular la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  tras la estimulación.

### 3.3.1 Bombas de Calcio.

Las bombas o ATPasas de  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentran presentes en todas las células eucariotas. En mamíferos se presentan tres sistemas de ATPasas de  $\text{Ca}^{2+}$ : PMCA, SERCA y SPCA. Son sistemas de alta afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  con una baja capacidad de transporte, utilizando la energía liberada por la hidrólisis del ATP para bombear iones  $\text{Ca}^{2+}$  en contra de gradiente electroquímico. Las bombas SPCA están relacionadas con las SERCA, si bien presentan propiedades funcionales diferentes (Wuytack et al., 2002). Son capaces de responder a pequeñas variaciones de  $[\text{Ca}^{2+}]_C$  en condiciones de reposo, confiriendo un ajuste fino de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (Berridge et al., 2003).

#### 3.3.1.1 ATPasa de calcio de la membrana plasmática (PMCA).

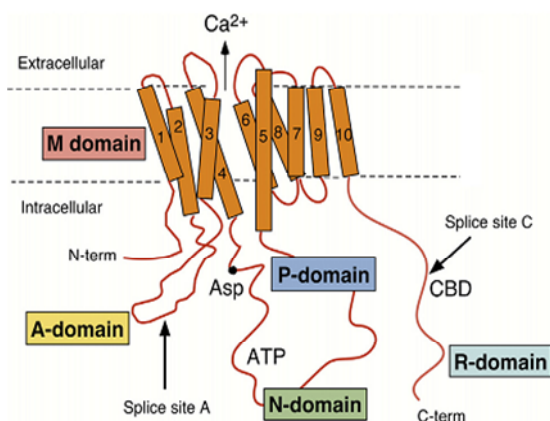
La PMCA (*Plasma Membrane Calcium ATPase*) es el principal sistema de extrusión de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citosol al medio extracelular en células no excitables. Este bombeo se realiza con consumo de un ATP por cada  $\text{Ca}^{2+}$  e intercambiando además un  $\text{H}^+$  en el proceso (Schatzmann, 1973; Sarkadi, 1980). Fue descubierta y estudiada en eritrocitos *ghost* y después en varios tipos celulares y tejidos tanto de animales como de plantas (Carafoli, 1991). La obtención de su secuencia de aminoácidos abrió el camino al descubrimiento de otras formas de la PMCA (Verma et al., 1988). Se inhibe por  $\text{La}^{3+}$  y  $[\text{VO}_4]^{2-}$  (vanadato) irreversiblemente y se activa por CaM que disminuye su  $K_d$  de 10-30  $\mu\text{M}$  en reposo a 0,2-0,5  $\mu\text{M}$  en su máxima activación.

Estructuralmente son proteínas de unos 1200aa, que constan de 10 segmentos transmembrana ( $M_{1-10}$ ), configurando el **dominio M** y tres dominios citosólicos, existentes en dos bucles que unen las regiones transmembrana.



El primer bucle, entre  $TM_2$  y  $TM_3$ , contiene el **dominio A** (actuador) con dos sitios de unión a fosfolípidos ácidos y uno de los dos sitios de autoinhibición por interacción con el dominio de unión a CaM (*Calmodulin Binding Domain*, CBD). El segundo, entre  $TM_4$  y  $TM_5$ , contiene el **dominios P** (fosforilación) y el **dominio N** (unión a nucleótido) que configuran el sitio catalítico. En este bucle se encuentra por un lado un residuo de aspartato conservado que forma el intermedio fosforilado responsable del ciclo catalítico, y por otro lado el segundo sitio de unión al CBD. En el extremo C-terminal se encuentra el dominio CBD y el **dominio R** (regulador), con zonas consenso para fosforilación por PKA, PKC y tirosina quinasa, zonas de unión a fosfolípidos ácidos así como los sitios alostéricos de unión a  $Ca^{2+}$  de alta afinidad (**Fig. 8**) (Brini & Carafoli, 2011). Bajo ciertas condiciones puede funcionar de forma inversa.

En mamíferos se han descrito cuatro tipos (PMCA, PMCA2, PMCA3 y PMCA4) codificados por cuatro genes (ATP2B1, ATP2B2, ATP2B3 y ATP2B4) localizados en diferentes cromosomas (Strehler et al., 2007). Existen dos sitios de procesamiento alternativo en el bucle del dominio receptor y en el extremo C-terminal que producen isoformas con diferentes propiedades regulatorias y funcionales así como de distribución celular. Con todos los tipos e isoformas pueden existir alrededor de 30 PMCA, si bien de algunas no está confirmada su existencia y otras se expresan a muy bajos niveles (Strehler & Zacharias, 2001; Chicka & Strehler, 2003). Los tipos PMCA1 y PMCA4 se expresan prácticamente en todos los tipos celulares, mientras que PMCA2 y PMCA3 se encuentran en tejidos más especializados, como cerebro y músculo cardíaco (Huang et al., 2010). Se ha propuesto que las PMCA puedan formar complejos multiprotéicos entre varios tipos e isoformas capaces de tomar lugar en las diferentes señales de  $Ca^{2+}$  (Strehler, 2015).



**Fig. 8. Estructura esquemática de la PMCA.** Las regiones transmembrana numeradas constituyen el dominio M donde se indica la salida de  $Ca^{2+}$ . Se muestran los extremos N- y C-terminal citosólicos. También se indican el residuo de aspartato conservado (Asp), la región de unión a ATP (ATP) y el dominio de unión a CaM (CBD). Finalmente se muestran los dominios proteicos citosólicos A, P, N y R con flechas en las posiciones de procesamiento alternativo del primer bucle citosólico (*Splice site A*) y C-terminal (*Splice site C*). Imagen modificada de Strehler, 2015.



Defectos en la PMCA son responsables de numerosas enfermedades, particularmente ligadas a estrés oxidativo (Ficarella et al., 2007).

### 3.3.1.2 ATPasa de calcio del retículo sarco/endoplásmico (SERCA).

La SERCA (*Sarco-Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase*) lleva a cabo las funciones de recuperación de los niveles basales de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico así como las de relleno de ciertos depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares, principalmente el ER/SR. Este sistema bombea dos  $\text{Ca}^{2+}$  por ATP consumido desde el citosol al lumen del ER/SR, intercambiando dos  $\text{H}^+$  en el proceso siendo, al igual que la PMCA (Yu et al., 1993).

Las SERCA conservan cierta homología estructural con las PMCA y SPCA, ya que todas pertenecen a la superfamilia de las ATPasas de tipo P. El **dominio M** ( $M_{1-10}$ ) consta de 10 segmentos transmembrana con zonas de coordinación con el  $\text{Ca}^{2+}$  en  $M_4$ ,  $M_5$ ,  $M_6$  y  $M_8$ , que forman una hélice central. Esta hélice se encuentra rodeada por los segmentos  $M_{1-3}$  por una cara ( $M_4$ ) y por la cara opuesta ( $M_8$ ) por  $M_{7-10}$ . El dominio M está altamente conservado en toda la familia de ATPasas de tipo P (Gadsby, 2007). Existe un bucle citosólico de conexión del dominio M con el **dominio P** a través de los segmentos  $M_6$  y  $M_7$ , y a su vez presenta una zona de interacción con la proteína reguladora fosfolamban (PLN). El dominio P presenta residuos de aminoácidos muy conservados como Asp351 que se fosforila durante el ciclo catalítico y Thr353 responsable de la coordinación con  $\text{Mg}^{2+}$  (Clausen et al., 2001). El **dominio N** presenta un residuo Phe487, crítico para la unión del ATP (Toyoshima et al., 2000). Finalmente el **dominio A** tiene un motivo conservado de Thr81-Gly-Glu-Ser (TGE) responsable de la defosforilación del dominio P. Este dominio se encuentra conectado al dominio M a través de un lazo citosólico entre  $M_2$  y  $M_3$ .

El cuanto al mecanismo de acción de las SERCA en primer lugar conviene definir los dos estados conformacionales principales: E1 y E2. La conformación E1 presenta dos sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  de alta afinidad en el lado citoplasmático, mientras que en la conformación E2 dichos sitios son de baja afinidad y se encuentran en el lado luminal. En primer lugar en la conformación E2 se sitúa un ión  $\text{Ca}^{2+}$  en sus sitios de unión y mediante cambios conformacionales en el dominio M permite la incorporación del segundo  $\text{Ca}^{2+}$  de forma alostérica, liberando al citosol los dos  $\text{H}^+$  unidos.

## INTRODUCCIÓN

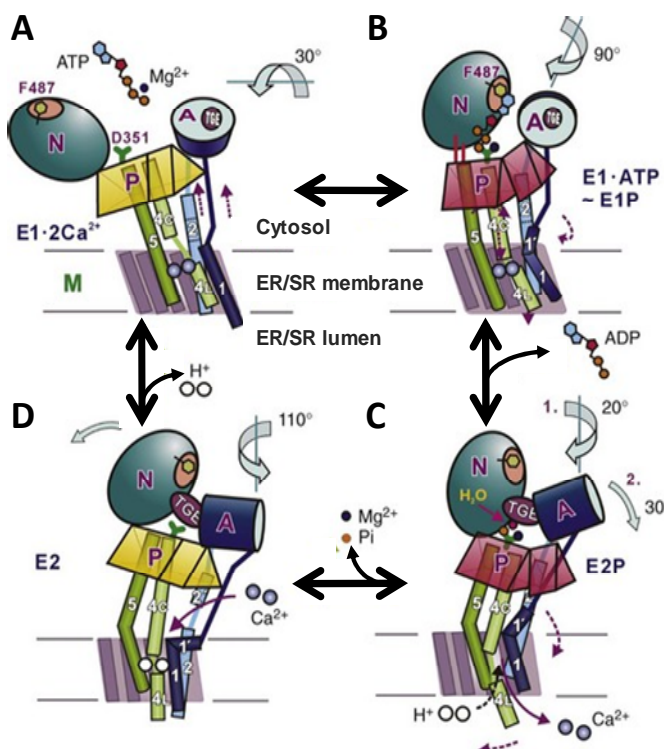
---

De esta forma, se modifica la configuración de E2 a la E1 con separación de los dominios N, P y A para permitir la unión del ATP (**Fig. 9A**). El fórmero, compuesto por el ATP unido al dominio N y a D351 del dominio P, se dobla acercándose al dominio A, que rota y permite la oclusión de los sitios citosólicos de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ . El  $\text{Mg}^{2+}$  coordinado con D351 actúa como catalizador de la hidrólisis del ATP (**Fig. 9B**). Se transfiere el fosfato del ATP a D351, con lo que se produce ahora un cambio conformacional en el dominio M que mueve el  $\text{Ca}^{2+}$  a sitios de unión de baja afinidad expuestos hacia el lumen del ER/SR, liberándose el  $\text{Ca}^{2+}$ . En el lumen del ER, dado su pH más bajo con respecto al citosol, los  $\text{H}^+$  estabilizan los sitios de unión de  $\text{Ca}^{2+}$  de baja afinidad lo que desencadena una rotación y flexión del dominio A, cerrando la compuerta luminal (**Fig. 9C**). Posteriormente la secuencia TGE del dominio A interacciona con el residuo D351-P, hidrolizando el enlace D351-P y liberando  $\text{Mg}^{2+}$  y fosfato, y se regeneran los sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  de alta afinidad, inactivándose los de baja afinidad (**Fig. 9D**). Todos estos procesos pueden ser reversible en determinadas condiciones (Brini & Carafoli, 2009).

En humanos se han identificado tres genes (ATP2A1, ATP2A2 y ATP2A3) que codifican para tres tipos de SERCA con isoformas obtenidas por procesamiento alternativo (SERCA1a-b, SERCA2a-d y SERCA3a-f). La SERCA1a es una forma especializada localizada en fibras rápidas del músculo esquelético mientras que la SERCA1b se encuentra únicamente en el músculo del neonato (Zador et al., 2007). La SERCA2a se localiza en el músculo cardiaco, músculo esquelético de contracción lenta y en menor proporción en músculo liso y neuronas. Tanto SERCA2c como SERCA2d se expresan en bajos niveles en músculo cardiaco (Kimura et al., 2005; Dally et al., 2006; Vandecaetsbeek et al., 2009a). La SERCA2b se expresa de forma ubicua en prácticamente todos los tejidos con niveles de expresión medio-bajos. La SERCA2b presenta una afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  mayor, con menor tiempo de recuperación que las formas restantes, posiblemente debido a un segmento transmembrana ( $\text{M}_{11}$ ) y una extensión luminal adicionales (Vandecaetsbeek et al., 2009b). La ablación de SERCA2 en los dos alelos es letal y los *knock-out* heterocigóticos en ratones pueden desarrollar tumores de células escamosas y otras alteraciones cancerosas, si bien la función cardiaca no se ve afectada (Prasad et al., 2005). Las isoformas de SERCA3 presentan altos niveles de expresión en varios tipos de células sanguíneas, células endoteliales, epitelio intestinal y respiratorio, y células de Purkinje (Wuytack et al., 1994).

En células  $\beta$ -pancreáticas se expresan al 50% con la SERCA2b. Todas las isoformas de SERCA3 tienen una afinidad aparente por  $\text{Ca}^{2+}$  10 veces inferior a SERCA2b, y su expresión puede relacionarse con el control espacio-temporal de las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (Arredouani et al., 2002). Además, se ha descrito que esta isoforma puede actuar de forma reversa promoviendo el fenómeno ACIRC (*Atypical Calcium Induced Calcium Release*) (Shannon et al., 2000).

Se han descrito alrededor de una docena de proteínas reguladoras de la SERCA, de las que destacan PLN y en menor grado sarcolipina (SLN), proteínas transmembrana del ER/SR de bajo peso molecular. Ambas proteínas reducen la afinidad aparente por  $\text{Ca}^{2+}$  por unión en sitios específicos de la SERCA. En células cardiacas, músculo liso y fibras lentas de músculo esquelético actúa PLN, mientras que en músculo esquelético de contracción rápida actúa predominantemente SLN (Vangheluwe et al., 2005). La fosforilación de PLN por PKA o CaMKII durante la estimulación  $\beta$ -adrenérgica promueve la disociación del complejo PLN-SERCA, revertiendo la afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  (MacLennan & Kranias, 2003). La SERCA se puede distinguir de la PMCA y SPCA mediante el uso de inhibidores específicos irreversibles como la tapsigargina, o reversibles como la terc-butyl-benzohidroquinona (BHQ) (Thastrup et al., 1990; Oldershaw & Taylor, 1990). La SERCA también se inhibe por  $\text{La}^{3+}$  y  $[\text{VO}_4]^{2-}$ .



**Fig. 9. Esquema del ciclo de reacción de la SERCA.** Se muestran los diferentes estados conformacionales del ciclo de bombeo de  $\text{Ca}^{2+}$  de la SERCA, siendo E1-2Ca<sup>2+</sup> en el panel A, E1-ATP (E1P) en el panel B, E2P en el panel C y finalmente E2 en el panel D. Se indican en cada conformero el dominio transmembrana M, en concreto las regiones M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub> y M<sub>5</sub>, y los citosólicos N, P y A. En M<sub>4</sub> se muestran los sitios de unión de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (4<sub>c</sub>) y del lumen reticular (4<sub>l</sub>). De igual forma, se indican los sitios de interacción de ATP (F487), fosforilación (D351) y de hidrólisis del residuo fosforilado (TGE). Imagen modificada de Brini & Carafoli, 2009.

### **3.3.1.3 ATPasa de calcio de las vías de secreción (SPCA).**

La SPCA (*Secretory Pathway Calcium ATPase*) es el principal sistema de recuperación de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en el complejo de Golgi y otros depósitos intracelulares, tras la activación celular. En 1985 se identificó y clonó Pmr1 (*Plasma membrane ATPase Related*), homólogo de SPCA en levaduras que carecen de sistema SERCA (Smith et al., 1985). En 1992 se clonó en rata la primera SPCA de mamífero (Gunteski-Hamblin et al., 1992). Estudios de la expresión de SPCA1 humana en células CHO determinaron su localización subcelular en el GC. Su nivel de expresión puede variar en función del tipo celular, compitiendo con la SERCA en la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  para este depósito (Pinton et al., 1998; Reinhardt & Horst, 1999; Ton et al., 2002). Recientemente, estudios funcionales han podido elucidar la expresión relativa de SERCA y SPCA en diferentes regiones del GC (Aulestia et al., 2015). La SPCA puede expresarse en otros compartimentos ácidos tales como lisosomas, endosomas y los gránulos de secreción (Mitchell et al., 2001; 2004).

Estructuralmente la SPCA tiene un peso molecular menor que la SERCA, con un solo sitio de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ , considerándose estas ATPasas como ancestros de las SERCA. El mayor empaquetamiento de los segmentos transmembrana del dominio M junto con bucles luminales y citosólicos más cortos puede ser responsable de la existencia de un solo sitio de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  así como del transporte de  $\text{Mn}^{2+}$ , característica propia de las SPCA. Frente a la SERCA, la SPCA presenta mayor afinidad aparente para iones divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ ), posiblemente debido a una estabilidad extra de la conformación E1 sobre E2 (Dode et al., 2006). La SPCA a diferencia de la SERCA, no intercambia  $\text{H}^+$  en el proceso de transporte (Vangheluwe et al., 2009). Las bombas SPCA cumplen importantes funciones dentro de la célula. El  $\text{Mn}^{2+}$  es cofactor de varias enzimas antioxidantes, de ahí la importancia de esta bomba en la respuesta al estrés oxidativo (Cho et al., 2005). El mantenimiento de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en el GC permite la correcta regulación del tráfico proteico. Además, las SPCA están implicadas en la modulación de las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, desempeñando un papel en procesos de secreción de células  $\beta$ -pancreáticas (Mitchell et al., 2004).

En humanos se han identificado dos genes (ATP2C1 y ATP2C2) para estas bombas (SPCA1 y SPCA2).

SPCA1 se expresa de forma ubicua en todos los tipos celulares y presenta cuatro variantes de procesamiento alternativo (SPCA1a-d). Durante el desarrollo cerebral en ratones la actividad de la SPCA1 parece incrementarse si bien los niveles de expresión parecen constantes (Sepulveda et al., 2008). La delección en los dos alelos del gen *ATP2C1* es letal y a nivel subcelular el GC resulta alterado observándose una serie de defectos conocidos como estrés de Golgi. La isoforma SPCA1c esta truncada en el último segmento transmembrana y no es funcional (Dode et al., 2006). Al igual que en SERCA2, los *knock-out* heterocigóticos de SPCA1 en ratones pueden desarrollar tumores de células escamosas (Okunade et al., 2007). Por otra parte, mutaciones en la SPCA1 son causa de la enfermedad autosómica-dominante *Hailey-Hailey*, consistente en desordenes del tejido epidérmico, como falta de adhesión. El posible decremento de la  $[Ca^{2+}]$  y/o  $[Mn^{2+}]$  en el GC podría llevar a alteraciones de la modificación y el tráfico de proteínas involucradas en la adhesión celular como desmosomas (Hu et al., 2000). La forma SPCA2, más especializada, se restringe principalmente a sistemas de secreción con alta actividad como tiroides, glándula salivar y mamaria y próstata. Durante la lactancia la expresión relativa de SPCA2 con respecto a la SPCA1 es 17 veces superior (Faddy et al., 2008).

Como todas las ATPasas de tipo P las SPCA se inhiben por  $[VO_4]^{2-}$ . La tapsigargina inhibe la actividad de SPCA a concentraciones superiores a  $5\mu M$ , permitiendo establecer la proporción SERCA/SPCA de ciertos depósitos de  $Ca^{2+}$  (Sorin et al., 1997). Recientemente se ha descrito al bis-fenol como inhibidor específico de SPCA (Lai & Michelangeli, 2012).

### 3.3.2 Intercambiador Sodio/Calcio de la membrana plasmática (NCX).

El NCX (*Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger*) constituye el principal mecanismo de extrusión de  $Ca^{2+}$  de células excitables, sobre todo en células cardiacas (Low et al., 1993). Se trata de un sistema de baja afinidad por  $Ca^{2+}$  con una alta capacidad de transporte electrogénico, que intercambia un  $Ca^{2+}$  por tres  $Na^+$ . Por tanto, este sistema utiliza el gradiente electroquímico de  $Na^+$  (Blaustein et al., 1999). Diversos cationes divalentes y trivalentes como  $La^{3+}$ ,  $Ni^{2+}$  y  $Cd^{2+}$  inhiben el NCX. De igual forma, se conocen compuestos sintéticos capaces de inhibir la actividad del NCX de forma relativamente selectiva como el KB-R7943 (Trosper & Philipson, 1983; Iwamoto et al., 1996).

## INTRODUCCIÓN

---

Estructuralmente consta de nueve segmentos transmembrana que se encuentran divididos por un bucle citosólico en cinco segmentos N-terminales y cuatro C-terminales. En cada región transmembrana se localizan zonas involucradas en la unión y transporte iónico. La primera porción del bucle citosólico tiene una zona denominada “péptido inhibidor del NCX” (XIP) donde se unen fosfolípidos ácidos y  $\text{Na}^+$ . La segunda porción del bucle posee dos dominios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  con función regulatoria, cada uno operando en un rango de  $[\text{Ca}^{2+}]_C$  (Nicoll et al., 2013). El bucle citosólico es diana de diferentes efectores que afectan a las propiedades funcionales, reclutamiento y localización del NCX en zonas concretas de la membrana plasmática, como ATP,  $\text{PIP}_2$ , PKA, y CaN (He et al., 2000; Schulze et al., 2003; Annunziato et al., 2004).

Los NCX pertenecen a una gran superfamilia de intercambiadores  $\text{Ca}^{2+}$ /catión, entre los que se encuentran los NCKX ( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+} - \text{K}^+$  *eXchanger*) responsables de la regulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en la plasticidad sináptica, adaptación de fotorreceptores y la pigmentación cutánea (Lytton, 2007). Se han descrito en mamíferos tres genes que codifican tres tipos del NCX (NCX1, NCX2 y NCX3) (Marshall et al., 2005). NCX1 es prácticamente ubicuo en todos los tipos celulares, si bien tiene especial importancia en corazón, y en menor grado en cerebro y riñones. El *knock-out* homocigótico de NCX1 en ratones es letal en estado embrionario y el *knock-out* específico de corazón produce fallo cardíaco en adultos (Henderson et al., 2004). NCX2 y NCX3 se expresan específicamente en cerebro, músculo esquelético y ciertas poblaciones neuronales, y su delección produce problemas de aprendizaje y psicomotores (Jeon et al., 2003; Sokolow et al., 2004). La expresión del NCX se regula por  $\text{Ca}^{2+}$ , característica que comparte con PMCA (Carafoli et al., 1999).

El sistema NCX funciona normalmente extruyendo  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citosol, colaborando con las ATPasas de  $\text{Ca}^{2+}$ . No obstante, NCX puede trabajar de forma inversa como se ha descrito en corazón. En células de músculo cardíaco durante la fase de despolarización en el ciclo excitación-contracción, la  $[\text{Ca}^{2+}]_C$  aumenta por depleción del SR. Posteriormente en la relajación muscular el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico se retira principalmente por acción de SERCA y NCX1. Durante la fase de repolarización, NCX contribuye al relleno del SR actuando de forma inversa, a favor del gradiente de  $\text{Na}^+$  citosólico. Se han descrito acoplamientos funcionales entre la membrana plasmática y el SR en donde se forman microdominios de  $\text{Ca}^{2+}$  próximos a NCX (Blaustein & Golovina, 2001).



En procesos de isquemia/reperfusión NCX también puede actuar en modo inverso, disminuyendo la excitotoxicidad del exceso de  $\text{Na}^+$  (Annunziato et al., 2007). En células  $\beta$ -pancreáticas el transporte reverso de NCX puede formar parte en el proceso de la secreción de insulina (Gall et al., 1999).

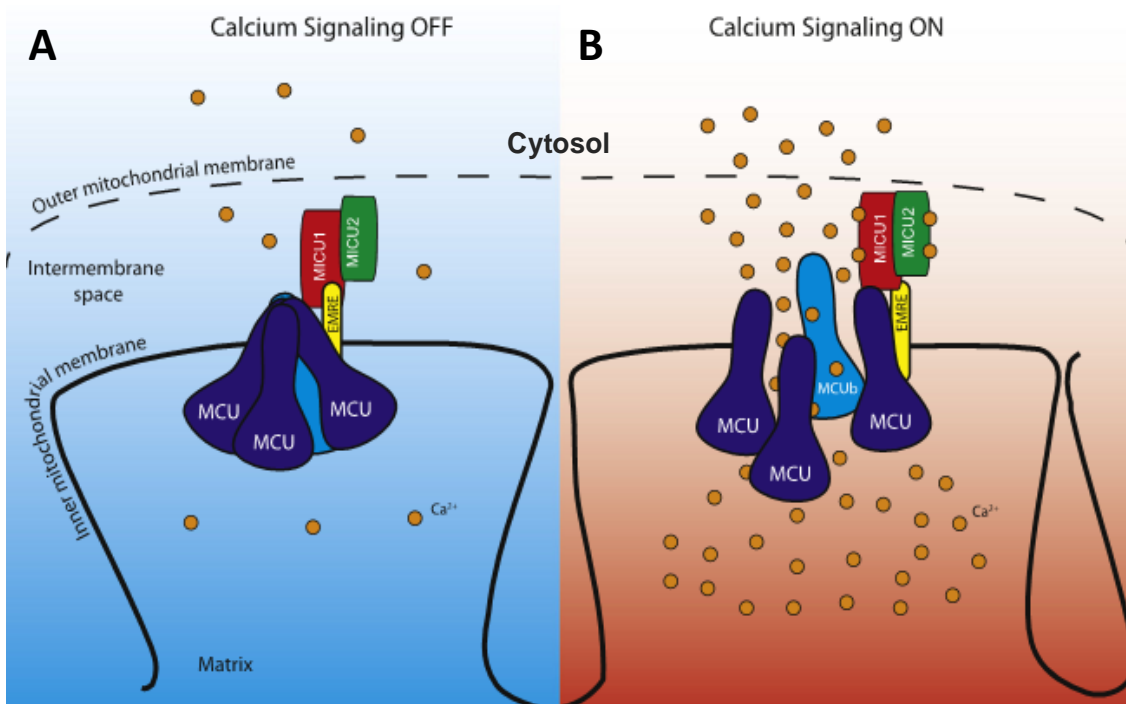
### 3.3.3 Uniportador de calcio mitocondrial (MCU).

El MCU (*Mitochondrial Calcium Uniporter*) es un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  altamente selectivo que media la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la mitocondria, a favor del gradiente electroquímico existente entre este orgánulo y el citosol, generado a su vez por la actividad respiratoria (Kirichok et al., 2004). Existe un conjunto de iones y moléculas que pueden alterar la actividad del MCU. Los iones  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Sr}^{2+}$  son inhibidores que compiten con el  $\text{Ca}^{2+}$ . El rojo de rutenio y el Ru360 son compuestos inhibidores relativamente selectivos del MCU sin bien son poco permeables a través de la membrana celular. Ciertos flavonoides de plantas y estrógenos activan MCU (Santo-Domingo & Demareaux, 2010). Una característica de este canal es su activación y regulación alostérica por  $\text{Ca}^{2+}$ , aunque su afinidad por este ión es muy baja con una  $K_d$ , medida en células permeabilizadas, de en torno a  $10\mu\text{M}$  (Gunter & Pfeiffer, 1990; Bernardi, 1999). Este hecho restringe la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico a los microdominios de alto  $\text{Ca}^{2+}$ , generados en el entorno de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  que durante la activación celular permiten la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular o lo liberan desde depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares. Existen evidencias morfológicas y funcionales de distribución de las mitocondrias en zonas próximas a la membrana plasmática o el ER donde se pueden generar microdominios con  $[\text{Ca}^{2+}]$  10 veces superiores al  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (Rizzuto et al., 1998; Csordás et al., 2010).

La identidad del MCU ha sido objeto de debate proponiendo, entre otros candidatos, a las proteínas desacoplantes UCP2 y UCP3 (Trenker et al., 2007; Waldeck-Weiermair et al., 2011). En 2011 se identificó una proteína (CCDC109A) no caracterizada, cuya expresión era necesaria y suficiente para la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial, y que poseía la mayoría de las características atribuibles a MCU (De Stefani et al., 2011; Baughman et al., 2011). Su silenciamiento por RNAi suprime la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial en cardiomiocitos, células  $\beta$ -pancreáticas y neuronas (Joiner et al., 2012; Tarasov et al., 2012; Qiu et al., 2013). Actualmente se acepta que la proteína CCDC109A es MCU.

## INTRODUCCIÓN

Estructuralmente MCU se trata de una proteína de 40kD con dos dominios transmembrana y dos dominios *coiled-coil* en la matriz mitocondrial, unidos por un pequeño bucle de residuos ácidos en el espacio intermembrana. Esta estructura parece formar un multímero, presumiblemente un tetrámero, que se configura como el canal MCU. Dicho multímero se produce por autooligomerización o bien con una proteína de similar estructura MCUB en diferentes proporciones según el tejido celular (Fieni et al., 2012). A lo largo de estos últimos años se han descrito otras proteínas que intervienen en la regulación o activación del canal MCU, que forman parte de ese complejo multimérico. De ellas, MICU1 y MICU2 (*Mitochondrial Calcium Uptake*) son proteínas solubles localizadas en el espacio intermembrana que se presentan en forma de heterodímeros, actuando como sensores de  $\text{Ca}^{2+}$  y compuertas del canal MCU. Son responsables de inhibir o activar el canal en un determinado rango de  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ . La unión de MCU a MICU1 y MICU2 se lleva a cabo gracias a una proteína denominada EMRE (*Essential MCU Regulator*). Por otra parte se ha sugerido que MCUB puede actuar como inhibidor parcial del canal (**Fig. 10**) (De Stefani et al., 2015).



**Fig. 10. Representación esquemática del complejo MCU.** En estado de reposo (A) la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  es controlada por un complejo multiprotéico posiblemente compuesto por MCU y MCUB junto con EMRE, MICU1, y MICU2. En estas condiciones, los heterodímeros MICU1/MICU2 actúan como compuerta en el MCU, gracias al efecto inhibitorio predominante de MICU2. Al activarse la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  (B), el aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ) localizado en el entorno de la mitocondria induce un cambio conformacional en el dímero que libera MICU2 y permite la activación de MCU mediada por MICU1. Imagen modificada de De Stefani et al., 2015.



### 3.4 Depósitos intracelulares de calcio.

La mayoría de los orgánulos intracelulares contienen una  $[Ca^{2+}]$  superior a la del citosol. Estos depósitos de  $Ca^{2+}$  intracelulares cumplen funciones celulares muy variadas. A continuación se expondrán cada uno de los reservorios de  $Ca^{2+}$  representativos de células neuroendocrinas: el retículo sarco/endoplásmico, las mitocondrias, el complejo de Golgi y otros compartimentos acídicos, entre los que se encuentran los gránulos de secreción.

#### 3.4.1 Retículo Endoplásmico/Sarcoplásmico.

El retículo endoplásmico/sarcoplásmico (ER/SR) es un orgánulo multifuncional de las células eucariotas, responsable de la síntesis, modificación post-translacional y empaquetamiento de la mayoría de proteínas de membrana y secreción, metabolismo de lípidos y esteroides, y detoxificación. Además, se considera unos de depósitos de  $Ca^{2+}$  intracelulares más importantes, con un papel central en diferentes procesos de señalización intracelular gracias a su rápida y regulada captación, almacenamiento y liberación de este ión (Michalak & Opas, 2009). Estructuralmente está compuesto de una red de endomembranas continua que se extiende por toda la célula, presentando una morfología heterogénea de túbulos, cisternas y que finalmente engloba a la envoltura nuclear. Dicha red varía morfológica y funcionalmente entre los diferentes tipos celulares. Este hecho que viene posiblemente determinado por el conjunto de funciones fisiológicas que desempeña la célula en cuestión. Se ha propuesto que las cisternas se especializan en la síntesis de proteínas, mientras que los túbulos permiten un rápido control de los flujos de  $Ca^{2+}$  (Shibata et al., 2010; West et al., 2011). En ciertos casos existen, además de las diferencias morfológicas, diferencias de composición proteica como en el SR, siendo este una versión especializada del ER en células musculares (Pozzan et al., 1994). Dada su extensión, el ER es capaz de entrar en contacto con otros orgánulos del citoplasma como las mitocondrias, el complejo de Golgi, peroxisomas, endosomas, lisosomas y la membrana plasmática (Friedman & Voeltz, 2011).

El ER/SR como reservorio de  $Ca^{2+}$  presenta una concentración total de calcio entre 5-50mM (Meldolesi & Pozzan, 1998).

La mayor parte del calcio se encuentra ligado a proteínas de baja afinidad como la calreticulina (o CSQ para el SR), calnexina, BiP y GRP94 entre otras, y solo una pequeña fracción se presenta como  $\text{Ca}^{2+}$  libre. Las primeras medidas de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  realizadas con la fotoproteína aequorina mutada dirigida al ER (ER-mAEQ) reportaron valores de 300-800 $\mu\text{M}$  para diversos tipos celulares (Barrero et al., 1997; Montero et al., 1997a; Alonso et al., 1998). No obstante, el desarrollo de sondas de aequorina (AEQ) de menor afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  ha permitido establecer valores superiores de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ , en torno a 1-2mM (De la Fuente et al., 2013). Además estos últimos datos revelan que la distribución del  $\text{Ca}^{2+}$  en el ER puede ser heterogénea, con subcompartimentos que presentan diferentes dinámicas de  $\text{Ca}^{2+}$ . De hecho, la continuidad morfológica del ER, es un tema de gran controversia actual (Park et al., 2000; Verkhratsky, 2005; Bannai et al.; 2004; Aulestia et al., 2011; De la Fuente et al., 2013).

La captación y acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  se realiza vía SERCA fundamentalmente, si bien se ha documentado la existencia de SPCA en ciertos tipos celulares como células  $\beta$ -pancreáticas (Berridge et al., 2003; Mitchell et al., 2004). Si este reservorio disminuye drásticamente su nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  se activan los mecanismos de entrada capacitativa, a través de los SOCC, en colaboración con estos sistemas de captación. Es conveniente mencionar que el mantenimiento de un nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  bajo en el ER es un factor que contribuye a la respuesta a estrés y puede desencadenar apoptosis (Álvarez et al., 1999). La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  está regulada fundamentalmente por  $\text{IP}_3\text{R}$  y  $\text{RyR}$ . Se ha documentado la existencia de TRPP2 expresado en alta concentraciones en el ER, posiblemente colaborando con la liberación inducida por  $\text{IP}_3$  (Koulen et al., 2002). Como se ha expuesto con anterioridad, existe un amplio debate acerca del papel de otros segundos mensajeros intracelulares en el ER como la cADPR y el NAADP.

### 3.4.2 Mitocondria.

La mitocondria es un orgánulo clave en la producción de energía, necesaria para el desempeño de las funciones celulares. Además, tiene un gran papel en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  subcelular ya que es capaz de captar  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico producido frente a un estímulo y modular espacio-temporalmente la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ , codificando así una amplia variedad de respuestas celulares. Las mitocondrias interaccionan entre sí, formando una amplia red mitocondrial móvil (MR), con procesos de fisión y fusión (Picard et al., 2013).

Son capaces de distribuirse en regiones concretas de la célula como las terminales sinápticas o cerca de los depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares, zonas con abundantes canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Es más, se conoce en profundidad la existencia de interacciones MR-ER, con uniones físicas funcionales (Rizzuto, 1998; Rowland & Voeltz, 2012).

Estructuralmente la mitocondria aislada consta de dos membranas, externa e interna, separadas entre ambas membranas por un espacio intermembrana. La membrana externa es muy permeable gracias a un conjunto de canales de aniones dependiente de voltaje (VDAC), permitiendo el paso de macromoléculas y regulando el transporte de metabolitos entre el citosol y el espacio intermembrana (Gincel et al., 2001). La membrana interna, por su parte, es impermeable a iones y metabolitos, y forma pliegues e invaginaciones que generan un complejo tubular dinámico (crestas) donde se disponen subcompartimentos de series de proteínas con funciones específicas como la cadena respiratoria y diversos sistemas de transporte (Mannella et al., 1994). Funcionalmente la mitocondria se encarga de la producción de ATP en la célula mediante la cadena respiratoria. Este proceso genera un bombeo de  $\text{H}^+$  desde la matriz mitocondrial hasta el espacio intermembrana, produciendo un gradiente eléctrico de  $-150/-180\text{mV}$ , crucial para la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citosol (Parekh, 2003).

En condiciones de reposo celular, la  $[\text{Ca}^{2+}]_M$  es similar a la existente en el citosol (Brini et al., 1997). Sin embargo en procesos de estimulación celular las mitocondrias son capaces de captar el  $\text{Ca}^{2+}$  de los microdominios existentes en el entorno de los canales activados por el estímulo, a través del canal de baja afinidad MCU. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria tiene dos consecuencias fundamentales. Por una parte, existen tres enzimas del ciclo de Krebs activadas por  $\text{Ca}^{2+}$ , ajustándose la producción de ATP frente a la demanda energética que conlleva la estimulación celular (Jouaville et al., 1999). Por otra parte, la mitocondria actúa como un tamponador de  $\text{Ca}^{2+}$  regulando tanto la amplitud como los patrones espacio-temporales de los aumentos de  $[\text{Ca}^{2+}]_C$ , que a su vez pueden controlar la actividad de los canales que los desencadenan. Dicha regulación afecta a procesos celulares como la exocitosis (Montero et al., 2000). En células acinares del páncreas la mitocondria evita la propagación de las ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en la zona apical de la célula dividiendo a la misma en dos compartimientos funcionales que pueden generar diferente señalización por  $\text{Ca}^{2+}$  (Park et al., 2001).

En definitiva, la mitocondria se considera un reservorio de  $\text{Ca}^{2+}$  dinámico, capaz de acumularlo hasta una  $[\text{Ca}^{2+}]_M$  superior a 2mM (De la Fuente et al., 2012).

Junto a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del MCU, existen dos sistemas de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria: Los intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  mitocondriales (mNCX y mCHX respectivamente), evitando la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en la matriz mitocondrial en condiciones basales (Bernardi, 1999). El mNCX es el principal sistema de salida de  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria, intercambiando  $\text{Na}^+$  por  $\text{Ca}^{2+}$  en proporción 3:1 y siempre que exista  $\text{Na}^+$  en el citosol, dependiendo la velocidad de intercambio, de la concentración este ión (De la Fuente et al., 2010). El mCHX es capaz de intercambiar  $\text{H}^+$  por  $\text{Ca}^{2+}$  en proporción 1:1 si bien su capacidad de transporte es muy baja (Jiang et al., 2013). Estos sistemas electrogénicos, al igual que el MCU, se encuentran regulados y son capaces de influir en diversos procesos fisiológicos de la célula (Nita et al., 2015). La acumulación mantenida de  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria energizada, en colaboración con otros factores, puede producir un incremento súbito de la permeabilidad de la membrana interna a solutos de masa molecular de hasta unos 1500Da. Este hecho puede desencadenar la liberación desde la mitocondria de diferentes factores que conducen a la apoptosis celular, mediada por la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP). La identidad de este canal es objeto de debate actual (Orrenius et al., 2015).

### 3.4.3 Complejo de Golgi.

El complejo de Golgi representa la estación central de empaquetamiento y procesamiento asegurando que las proteínas sintetizadas en el ER se modifican y dirigen correctamente a su destino celular final. Estructuralmente se trata de un orgánulo muy heterogéneo tanto morfológicamente como a su composición proteica y función (Breton et al., 2001). Se compone de múltiples cisternas membranosas, formando conjuntos apilados. Se distinguen tres subcompartimentos polarizados, *cis*-Golgi, *medial*-Golgi y *trans*-Golgi, estando *cis*-Golgi y *trans*-Golgi asociados con una red tubular de membranas. En mamíferos cada conjunto de cisternas apiladas están conectadas por series de túbulos que sirven de vías eficaces para la difusión de elementos. El complejo de Golgi es una estructura altamente dinámica cuya integridad depende del balance del transporte anterógrado y retrógrado entre sus subcompartimentos y con el ER (De Matteis & Luini, 2008).

El complejo de Golgi presenta un pH luminal más ácido con respecto al citosol, característica que comparte con otros depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  como lisosomas o los gránulos de secreción (Llopis et al., 1998).

El complejo de Golgi participa en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  subcelular como reservorio de  $\text{Ca}^{2+}$  capaz de almacenar el 5% (por encima de 10mM) de la concentración de calcio total celular en el caso de células neuroendocrinas (Pezzati et al., 1997). En su mayor parte el calcio se encuentra ligado a diferentes proteínas tamponadoras de las que destacan, por abundancia y exclusividad, CALNOC y Cab45 (Scherer et al., 1996; Lin et al., 1998). En células HeLa se ha estimado una  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{GC}}$  entorno a 200-300 $\mu\text{M}$  (Pinton et al., 1998), si bien dichos niveles pueden variar en función del tipo celular. Existen un conjunto de enzimas que intervienen en el procesamiento de proteínas cuya actividad viene regulada por  $\text{Ca}^{2+}$ . Además, ciertos procesos de transporte retrogrado GC-ER y agregación selectiva de proteínas de secreción dependen del contenido en  $\text{Ca}^{2+}$  del complejo de Golgi (Oda, 1992; Chanut & Huttner, 1991).

El GC, al igual que el ER, juega un papel en la modulación de las respuestas de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Las vías de acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en GC son SERCA y SPCA, mientras que la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  se realiza fundamentalmente a través de  $\text{IP}_3\text{R}$ , y en ciertos cultivos celulares como cardiomiocitos, a través de RyR (Van Baelen et al., 2003; Lissandron et al., 2010). No obstante, al hablar de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  en el GC se debe considerar la heterogeneidad de este orgánulo como depósito de  $\text{Ca}^{2+}$ . La contribución relativa de las bombas SERCA y SPCA varía en función del tipo celular pero también en función de los subcompartimentos del GC descritos con anterioridad. En queratinocitos, la proporción SPCA/SERCA aumenta desde el *cis*-Golgi al *trans*-Golgi, mientras que en células  $\beta$ -pancreáticas se ha evidenciado la presencia de SPCA en los gránulos de secreción, posiblemente debido a un gradiente molecular de estas bombas a lo largo del complejo de Golgi (Behne et al., 2003; Mitchell et al., 2004). Se ha señalado la existencia de dos subcompartimentos diferentes en el CG en términos de dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$ . El primero, presumiblemente el *cis*-Golgi, presenta captación de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por SERCA y responde a  $\text{IP}_3$  con una liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  más rápida que la del ER. El segundo, presumiblemente el *trans*-Golgi, presenta captación de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de SPCA, es poco sensible a  $\text{IP}_3$  y, en principio, no participaría en la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (Missiaen et al., 2004; Vanoevelen et al., 2005).

Estudios más recientes han señalado que en células con alta expresión de RyR, este último compartimento responde a  $\text{Ca}^{2+}$ , cafeína y posiblemente a otros agonistas como cADPR y NAADP (Pizzo et al., 2011). Dichos subcompartimentos pueden presentar además diferentes  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{GC}}$  (Aulestia et al., 2015).

### **3.4.4 Compartimentos Acídicos.**

Dentro del término compartimento ácido se incluyen una serie de orgánulos de diversas características morfológicas y funcionales que presentan altas  $[\text{H}^+]$  y  $[\text{Ca}^{2+}]$  en su matriz como nexo común. Se incluyen los endosomas, los lisosomas, orgánulos relacionados con lisosomas, y los gránulos de secreción. El complejo de Golgi, tratado con anterioridad, estaría también incluido en este grupo. Los gránulos de secreción, dada la importancia que tienen en el presente trabajo, se tratarán con detalle más adelante.

#### **3.4.4.1 Lisosomas.**

Los lisosomas son vesículas ácidas, en cuya matriz se encuentran enzimas hidrolíticas, que median la degradación de vesículas endocíticas o autofágicas (Mellman, 1989). El gradiente de protones existente entre la matriz lisosomal y el citosol (pH 4-5) se mantiene gracias a la ATPasa de  $\text{H}^+$  vacuolar (V-ATPasa) en colaboración con intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+/\text{H}^+$  y  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$  (Ishida et al., 2013) y es crítico para la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en los lisosomas. La mayor parte del calcio se encuentra ligado a fosfatos, sulfatos y carboxilatos, estimándose una  $[\text{Ca}^{2+}]$  en la matriz lisosomal en torno a  $500\mu\text{M}$  (Lloyd-Evans et al., 2008). El mecanismo de captación de  $\text{Ca}^{2+}$  en los lisosomas no se conoce en profundidad, proponiéndose la captación a través de CHX y de una ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  no identificada (Hilden & Madias, 1989; Adachi et al., 1996). En cuanto a los mecanismos de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , los lisosomas se proponen como orgánulos diana en la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por cADPR y sobre todo NAADP. En este sentido se ha descrito la existencia de canales TRPML, TRPM<sub>2</sub> y TPC así como P2X, en lisosomas de varios tipos celulares (Zhang & Li, 2007; Lange et al., 2009; Brailoiu et al., 2009; Qureshi et al., 2007; Huang et al., 2014). Como depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$ , los lisosomas participan en la transducción de señales, regulando varias etapas que forman parte de su formación y tráfico, pudiendo tomar parte en otros procesos de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  subcelular (Morgan et al., 2011).

### 3.4.4.2 Endosomas.

Una vez los endosomas se forman en la membrana plasmática gradualmente se van acidificando hasta un pH de 6, posiblemente debido a la acción de una V-ATPasa. Esta acidificación es esencial para la degradación de los metabolitos internalizados y también para la liberación de efectores para receptores internos que median el tráfico y la fusión de estos orgánulos a lisosomas o membrana plasmática (Mellman et al, 1986). Tras su inclusión celular, los endosomas originalmente presentarían una  $[Ca^{2+}]$  en torno a 1mM, similar a la del medio extracelular. Conforme el endosoma van madurando y su matriz acidificándose esta  $[Ca^{2+}]$  disminuye hasta 40 $\mu$ M (Sherwood et al., 2007). Se ha demostrado la salida de  $Ca^{2+}$  en los endosomas a través de TRPML, TRPV<sub>2</sub> y TPC (Saito et al., 2007; Cheng et al., 2010; Brailoiu et al., 2009). Al igual que los lisosomas, los endosomas, como depósitos de  $Ca^{2+}$ , pueden participar en la regulación de su formación y tráfico, por ejemplo en la fusión homo-heterotípica. No obstante, los mecanismos de homeostasis del  $Ca^{2+}$  intraendosomal son todavía desconocidos (Luzio et al., 2007; Venkatachalam et al., 2015).

### 3.4.4.3 Orgánulos relacionados con lisosomas.

Los orgánulos relacionados con lisosomas (*Lisosome Related Organelle*, LRO) son un conjunto heterogéneo de orgánulos entre los que se encuentran los gránulos líticos de linfocitos, los gránulos densos de plaquetas y los acrosomas de espermatozoides (Raposo et al., 2007). La mayoría son ácidos y presentan alta concentración de calcio total (2,2M), la mayor parte ligado a una matriz de polifosfatos (Holmsen & Weiss, 1979). Si bien tienen algunas características similares con los gránulos de secreción, funcionalmente son más comparables con los acidocalcisomas (Docampo et al., 2005). Se ha descrito captación de  $Ca^{2+}$  en los LRO a través de SERCA, NCX y CHX en colaboración con una V-ATPasa (López et al., 2006; Lamason et al., 2005; Salceda & Sánchez-Chávez, 2000). En cuanto a la liberación de  $Ca^{2+}$  se ha propuesto la existencia de IP<sub>3</sub>R y RyR así como de TPC y P2X (Salceda & Sánchez-Chávez, 2000; Walensky & Snyder, 1995; Brailoiu et al., 2009; Miklavc et al., 2011). Los procesos de captación y liberación de  $Ca^{2+}$  de los LRO así como su papel funcional en la homeostasis de  $Ca^{2+}$  son actualmente objeto de intenso estudio.



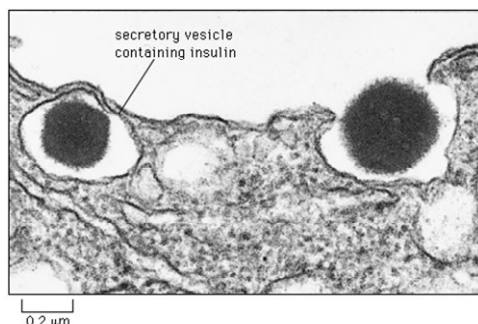
### 4. EL PAPEL DEL CALCIO EN LOS GRÁNULOS DE SECRECIÓN DE CÉLULAS NEUROENDOCRINAS.

---

La exocitosis vesicular es un evento biológico fundamental. La liberación del contenido de los gránulos de secreción regula, entre otras, las funciones cerebrales, los niveles de glucosa en sangre y la respuesta frente a estrés (Wu et al, 2014). Desde hace décadas se sabe que el  $\text{Ca}^{2+}$  es una de las principales señales que desencadenan y regulan el proceso de exocitosis (Del Castillo & Katz, 1954). Son muchos los estudios que se acumulan sobre el papel de este ión en la regulación de las etapas de la secreción. En este apartado se tratarán las características de los gránulos de secreción y su relación con el  $\text{Ca}^{2+}$  en el proceso de exocitosis.

#### 4.1 Estructura y composición de los gránulos de secreción.

Los gránulos de secreción de células neuroendocrinas tanto de células cromafines como de células insulínicas se definen como vesículas de núcleo denso (*Large Dense Core Vesicles*; LDCV), siendo denominadas así porque cuando se observan al microscopio electrónico presentan de una zona densa a los electrones, producto del empaquetamiento de solutos en la matriz, (Dean, 1973) (**Fig. 11**). Se trata de vesículas de gran tamaño, con un diámetro de entre 100-2000nm. Por el contrario las vesículas sinápticas son pequeñas y claras (*Small Clear Synaptic Vesicles*, SCSV) con un diámetro de entre 20-50nm. Ambos tipos de vesículas forman parte de la vía de secreción regulada, poseen una maquinaria de exocitosis similar y pueden permanecer en el citosol durante largos periodos de tiempo y (Takamori et al., 2006).



**Fig. 11. Gránulos de secreción.** La imagen de microscopía electrónica muestra dos gránulos de núcleo denso insulínicos procedentes de islotes  $\beta$ -pancreáticos. Nótese como uno de los gránulos libera su contenido. Imagen tomada de Garland Publishing, 1998.



Una de las características más singulares de los LDCV es la capacidad de acumular grandes concentraciones de diferentes solutos, entre los que se encuentran hormonas peptídicas, proteínas, iones y pequeñas moléculas, hasta una concentración total de solutos superior a 1M (Njus et al., 1986; Albillos et al., 1997). La matriz densa de los LDCV (o SG) se comporta como un gel donde los componentes se mantienen en un estado “cristalino” reduciéndose así la carga osmótica. Los gránulos de células cromafines son capaces de acumular catecolaminas (500-1000mM), ATP (125-300mM), ascorbato (10-30mM) y diversos péptidos y proteínas (100mg/mL) entre las que destacan las cromograninas y en concreto la CgA, que representa un 40% del contenido total proteico (Borges et al., 2012). La acumulación de catecolaminas se produce a través del transportador vesicular de monoaminas VMAT-2 que utiliza el gradiente de protones como ión cotransportado (Johannes et al., 1994). En el caso de células  $\beta$ -pancreáticas, la insulina es la proteína más abundante, representando un 50-60% del contenido proteico granular total, junto con el péptido-C que interacciona e interviene en la disociación del hexámero de insulina (Suckale & Solimena, 2010). El gradiente de protones se mantiene en estos gránulos gracias a la acción de la V-ATPasa (Saroussi & Nelson, 2009). En condiciones de reposo el pH vesicular tiene un valor en torno a 5,5 (Winkler & Westhead, 1980). Entre los iones que se acumulan en los SG el calcio se encuentra presente en altas concentraciones. Los primeros estudios en las décadas de los 80-90s determinaron una concentración total de calcio en los SG entre 15-60mM en varios tipos de células neuroendocrinas (Winkler & Westhead, 1980; Fasolato et al., 1991; Hutton et al., 1983). La mayor parte de este calcio se encuentra unido a solutos del lumen vesicular y solo una pequeña fracción se presenta como  $\text{Ca}^{2+}$  libre. A lo largo de estos años numerosos estudios han tratado de estimar la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$ . En gránulos de secreción aislados y mediante mediciones con electrodos se obtuvieron valores de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$  de 24 $\mu\text{M}$  (Bulenda & Gratzl, 1985) y 5,6 $\mu\text{M}$  (Haigh et al., 1989). Estudios con colorantes fluorescentes en los SG de mastocitos, determinaron una  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$  en reposo de 25 $\mu\text{M}$  (Quesada et al., 2001). La utilización de sondas de AEQ dirigidas a los SG ha permitido realizar mediciones de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$  en células intactas de diferentes cultivos neuroendocrinos como células MIN6 e INS-1, derivadas de células  $\beta$ -pancreáticas, células PC12 y células cromafines situando su valor entre 20-100 $\mu\text{M}$  (Mitchell et al., 2001; 2003; Iezzi et al., 2005; SantoDomingo et al., 2008; 2010).

La interacción entre las cromograninas y el  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio ácido del lumen vesicular desempeña un papel crucial en varios aspectos fisiológicos de los gránulos de secreción. Las cromograninas tienden a formar autoagregados a pH ácido y alta  $[\text{Ca}^{2+}]$ , interaccionando además con otros solutos de la matriz vesicular, siendo así responsables de reducir la fuerza osmótica en los SG (Taupenot et al., 2003). De hecho, las cromograninas pueden actuar como chaperonas, facilitando el empaquetamiento de hormonas peptídicas y participando activamente en la biogénesis granular así como la liberación de dichas hormonas (Koshimizu et al., 2010; Obermüller et al., 2010). En el caso de las células  $\beta$ -pancreáticas, un ambiente ácido y con alta  $[\text{Ca}^{2+}]$  interviene en el empaquetamiento de la proinsulina y formación de vesículas inmaduras durante el *trans*-Golgi, y la posterior acidificación del medio durante la maduración vesicular promueve la conversión de la proinsulina a insulina (Hou et al., 2009). Finalmente, la alcalinización del medio vesicular contribuye a la movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  en los SG y desencadena la liberación del contenido de los gránulos (Camacho et al., 2006; Borges et al., 2012). En definitiva las LDVC son responsables de la biosíntesis, almacenaje y secreción de neurotransmisores y hormonas peptídicas (Laslop & Mahata, 2002).

### 4.2 Biogénesis y tráfico de los gránulos de secreción.

Se han propuesto dos mecanismos de empaquetamiento y clasificación de los SG en el *trans*-Golgi en células neuroendocrinas. Uno conlleva la agregación inicial de los precursores de péptidos hormonales y cromograninas de la matriz vesicular en un proceso dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y pH (Bauerfeind & Huttner, 1993), en donde el agregado se une a la membrana de *trans*-Golgi a través de receptores específicos. El otro promueve la retención selectiva de los precursores de péptidos hormonales en función de su unión a diversos receptores (Arvan & Castle, 1998). En ambos de los mecanismos se van excluyendo los componentes destinados a la vía de secreción constitutiva, formándose vesículas inmaduras que se liberan del *trans*-Golgi (Tooze, 1991). Las vesículas inmaduras son transportadas a los sitios de secreción de la membrana plasmática a través de sistemas de transporte basados en microtúbulos, principalmente de quinesina (Rudolf et al., 2001). La actividad y distribución de la quinesina en los microtúbulos se puede regular durante la estimulación celular que conduce a la exocitosis (Park & Loh, 2008).

Seguidamente, las vesículas se transfieren a la red cortical de actina, situada cerca de la membrana plasmática, donde completan su maduración en la que se acidifican progresivamente mientras aumenta el empaquetamiento del contenido vesicular (Barg, 2003). Tras la estimulación celular, la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  modula la actividad de proteínas como espectrina y escinderina que estabilizan la red cortical de actina. Mediante despolimerización parcial, esta red de actina sufre procesos de remodelado y reorganización que conducen a la movilización de los SG hacia los sitios de anclaje de la membrana plasmática, a la vez que permiten el reclutamiento de otras vesículas de la fracción de reserva, y controlar la expansión del poro de fusión en colaboración con la familia de proteínas miosinas (Rose et al., 2001; 2003; Malacombe et al., 2006; Papadopulos et al., 2013; Olivares et al., 2014). La señal de  $\text{Ca}^{2+}$  que regula la red de actina proviene principalmente de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular durante la estimulación celular. Existe otra vía independiente de estimulación secretagoga, a través de liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  desde depósitos intracelulares (Trifaró et al., 2000).

En células neuroendocrinas se han descrito diferentes subpoblaciones de vesículas de secreción, clasificadas en función de su cinética de exocitosis, morfología y regulación por  $\text{Ca}^{2+}$  (Voets et al., 1999; Marengo, 2005; Ge et al., 2006; Merrins & Stuenkel; 2008). Una primera subpoblación de vesículas (*Reserve Vesicle Pool*; RVP) interaccionan con el citoesqueleto y pueden ser reclutadas hacia los sitios de anclaje de la membrana plasmática. Dentro de esta subpoblación a su vez se han descrito dos tipos de vesículas, dependiendo del grado de maduración, en especial de la acidez de la matriz granular. Las más inmaduras (menos ácidas) experimentan movimientos aleatorios y restringidos espacialmente que responden a la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos. Las más maduras (más ácidas) experimentan movimientos rápidos, dirigidos y de gran recorrido que responden a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular (Hao et al., 2005). Tras la estimulación celular, existe una segunda subpoblación vesicular anclada a la membrana plasmática que sufre exocitosis rápidamente (*Ready Releaseable Pool*; RRP), mientras que si el estímulo es mantenido en el tiempo, se distingue una tercera subpoblación vesicular, también anclada a la membrana plasmática, de cinética de exocitosis más lenta (*Slow Releaseable Pool*; SRP). Existe una cuarta subpoblación de vesículas de rápida secreción denominada IRP (*Immediately Releaseable Pool*) localizadas en el entorno inmediato de los VOCC.

Se han descrito interacciones físicas entre componentes de membrana de la IRP con los VOCC (Álvarez & Marengo, 2011). La población vesicular de las células neuroendocrinas está comprendida entre 10000 y 20000 vesículas por célula (Vitale et al. 1995; Straub et al., 2004), si bien la estimación del número de vesículas de cada subpoblación es variable según el tipo celular. Aproximadamente el 10% del contenido vesicular total se encuentra en los sitios de anclaje de la membrana plasmática, de las cuales un 10-25% corresponderían a la RRP. A su vez entre un 7-10% de la RRP compondría la IRP (García et al., 2006; Ge et al., 2006).

### 4.3 El fenómeno de la exocitosis.

Tras reclutarse los gránulos de secreción localizados en la red de actina hacia los sitios de anclaje de la membrana plasmática y previamente a la fusión vesicular se producen tres eventos fundamentales en el proceso de exocitosis: (i) *tethering*, definido como una interacción a larga distancia entre las vesículas y la membrana plasmática; (ii) *docking*, definido como el propio anclaje de las vesículas a la membrana plasmática, donde ocurre la maduración; (iii) *priming*, el proceso de acondicionamiento de las vesículas, inmediatamente anterior a la fusión vesicular con la membrana plasmática. La diferencia entre las subpoblaciones SRP y RRP/IRP puede resultar de variaciones en este último proceso (Stojilkovic, 2005). En el proceso de *tethering* aun no se encuentra formado el complejo SNARE. Se ha documentado que las proteínas Munc13 y CAPS (*Ca<sup>2+</sup>-Activated Protein for Secretion*) reguladas por  $Ca^{2+}$ , factores que intervienen posteriormente en el *priming* vesicular, regulan el acercamiento de los componentes SNARE (James & Martin, 2013). En la actualidad está plenamente aceptado que los procesos de *docking* y *priming* requieren interacciones multiméricas entre las proteínas que forman los complejos SNARE (Chen & Scheller, 2001; Südhof, 2013). La familia SNARE se compone de más de 35 proteínas, algunas de ellas se encuentran en la membrana plasmática, conocidas como t-SNARE (sintaxinas y SNAP25), y otras están presentes en la membrana de los SG, conocidas como v-SNARE o VAMP (*Vesicle-Associated Membrane Proteins*, sinaptobrevinas). Si bien la maquinaria SNARE no interacciona directamente con  $Ca^{2+}$ , si que se encuentra regulada por diversas proteínas que interaccionan con este ión y, por tanto, responden a los cambios en la  $[Ca^{2+}]_C$  que ocurren durante la estimulación celular.

Existen estudios que documentan la existencia de interacciones físicas entre componentes de t-SNARE y canales VOCC donde el citoesqueleto celular juega un papel clave en la organización de la maquinaria secretora (Torregrosa-Hetland et al., 2010). Durante los eventos del *docking* comienza la formación del complejo SNARE entre t-SNARE y v-SNARE, anclándose de forma estable los SG con la membrana plasmática. Tanto la formación como la estabilización de dicho complejo SNARE viene regulada por la familia de proteínas Sec1/Munc18-like que interaccionan con sintaxinas. Se ha documentado la existencia de una variante de Cab45 (un amortiguador de  $\text{Ca}^{2+}$  en GC) que interacciona con Munc18 en estado de reposo celular, inhibiendo su interacción con las sintaxinas. El aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_C$  tras la estimulación secretagoga, desestabiliza el complejo Munc18-“Cab45” promoviendo la formación del complejo SNARE (Zhang et al., 2009). En el *priming* finaliza la formación del complejo SNARE. Los factores Munc13 y CAPS intervienen en la formación y estabilización del complejo SNARE dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y promueven la fusión vesicular (James & Martin, 2013; Messenger et al., 2014).  $\text{PIP}_2$  directamente puede regular la exocitosis mediante el reclutamiento y activación de proteínas de unión a este fosfolípido como Munc13, CAPS y sinaptotagmina-1. Las sintaxinas también se unen a  $\text{PIP}_2$  lo que promueve la formación de *clusters* en donde se produce la exocitosis (Martin, 2015).

La regulación de la fusión vesicular se lleva a cabo a través de las proteínas sinaptotagminas. Las sinaptotagminas son una familia de 17 proteínas, de las cuales algunas actúan como sensores de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de dominios C2 que unen  $\text{Ca}^{2+}$  con diversas afinidades. Estas proteínas intervienen fundamentalmente en la regulación de la fusión vesicular, si bien toman parte en los procesos *docking* y el *priming* (Wang et al., 2011). Sinaptotagmina-1, la más estudiada, presenta dominios C2 de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  de baja afinidad, activándose a  $[\text{Ca}^{2+}]_C$  similares a la que se producen durante la estimulación secretagoga. El modelo de fusión más aceptado propone que la sinaptotagmina-1 no interacciona, o interacciona parcialmente con el complejo SNARE en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . El aumento local de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico induce un cambio conformacional en la sinaptotagmina-1 que provoca su interacción con los fosfolípidos de la membrana plasmática y el complejo SNARE, desestabilizándolo y desencadenando el proceso de exocitosis (Südhof, 2013).

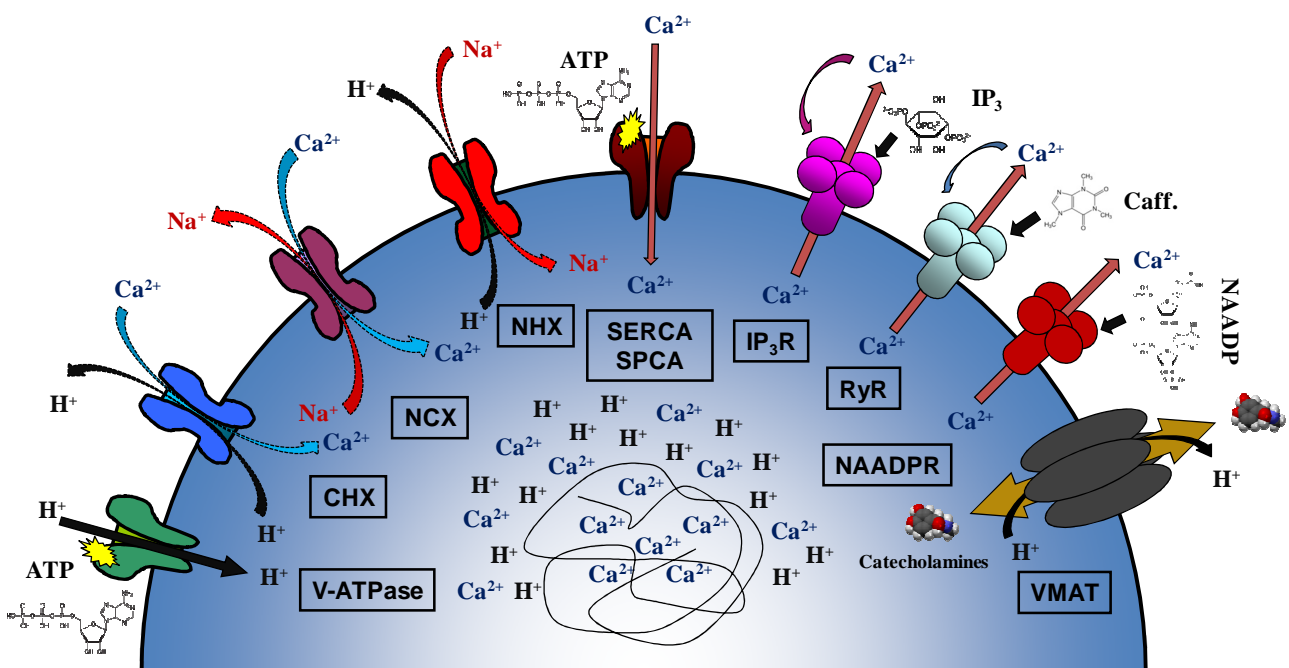
Además del proceso de exocitosis mediado por  $\text{Ca}^{2+}$ , existe una vía de secreción independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  pero en colaboración con la maquinaria SNARE. Esta vía se lleva a cabo por un conjunto de proteínas que intervienen tanto en los procesos de *docking*, *priming*, y fusión vesicular como en el reclutamiento y tráfico de los gránulos de secreción: las GTPasas Rab (Fukuda, 2008).

### 4.4 Homeostasis del calcio en los gránulos de secreción.

Los gránulos de secreción de células neuroendocrinas constituyen uno de los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  más grandes y a la vez menos conocidos, con un contenido de calcio en células cromafines que supone al 60% del total celular (Haigh et al., 1989). La concentración estimada total de calcio en los SG se sitúa alrededor de 20-40mM (Winkler & Westhead, 1980), con una fracción entre 20-100 $\mu\text{M}$  que se encuentra como  $\text{Ca}^{2+}$  libre. La relación  $\text{Ca}^{2+}$ -ligado/ $\text{Ca}^{2+}$ -libre en los SG es muy superior a la existente en otros reservorios de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este dato se debe posiblemente a la presencia de componentes en el interior de la matriz vesicular como las proteínas capaces de unirse a  $\text{Ca}^{2+}$  CgA, CgB y secretograninas en altas concentraciones. La CgA, en células cromafines, representa el 90% del total de esta familia de proteínas, capaz de unir 55moles de  $\text{Ca}^{2+}$  / mg de proteína con una  $K_d$  de 4mM, constituyendo un amortiguador de  $\text{Ca}^{2+}$  de gran capacidad pero de baja afinidad (Yoo, 2010). Estos datos de por si no justificaría la relación  $\text{Ca}^{2+}$ -ligado/ $\text{Ca}^{2+}$ -libre en los SG de no tener en cuenta las siguientes consideraciones: (i) las condiciones de la matriz densa de los SG, con alta concentración en catecolaminas (o insulina) y ATP entre otros solutos, pueden alterar las propiedades de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  de estas proteínas; (ii) existen otras proteínas de la matriz vesicular y nucleótidos capaces de unir  $\text{Ca}^{2+}$  con mayor afinidad ( $K_d$  100-300 $\mu\text{M}$ ) dependiendo de las condiciones iónicas y de pH (Reiffen & Gratzl, 1986). Se ha documentado que las cromograninas, nucleótidos y catecolaminas son capaces de interaccionar entre sí, complejos en los que el  $\text{Ca}^{2+}$  quedaría retenido de forma estable, reduciéndose la presión osmótica generada. Además, las cromograninas son capaces de formar homo-heterotetrámeros dependientes de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  y el pH, que contribuyen a la subcompartimentalización de este ión (Kopell & Westhead, 1982; Yoo & Lewis, 1996).

En función de la interacción del  $\text{Ca}^{2+}$  con el resto de solutos de la matriz vesicular se pueden definir tres subcompartimentos vesiculares: (i) un subcompartimento de  $\text{Ca}^{2+}$  libre; (ii) un subcompartimento de  $\text{Ca}^{2+}$  unido a cromograninas u otros componentes con baja afinidad, preparado para el intercambio con el subcompartimento de  $\text{Ca}^{2+}$  libre y con una capacidad dependiente de las variaciones de  $[\text{Ca}^{2+}]_C$ ; (iii) un subcompartimento que experimenta intercambios de  $\text{Ca}^{2+}$  muy lentos de  $\text{Ca}^{2+}$ , importante en la estructuración del resto de componentes granulares (Álvarez, 2012).

Los gránulos de secreción son compartimentos de  $\text{Ca}^{2+}$ , cuya  $[\text{Ca}^{2+}]_{SG}$  muy estable con una acumulación y liberación de este ión muy lentas en condiciones basales (Clemente & Meldolesi., 1975; Fasolato et al., 1991) pero capaces de contribuir rápidamente a la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico durante la estimulación celular. Hasta ahora se han expuesto ejemplos de diferentes mecanismos de captación y liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  que pueden actuar en los gránulos de secreción. Seguidamente, se detallarán estos sistemas de homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular (**Fig. 12**).



**Fig. 12. Esquema de los sistemas implicados en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular en células neuroendocrinas.** Se muestran los posibles sistemas de captación y liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los SG: las ATPasas de  $\text{Ca}^{2+}$ , SERCA y/o SPCA, los sistemas NCX y CHX, en colaboración con el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  NHX y la V-ATPasa, y los canales de  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{IP}_3\text{R}$ , RyR y NAADPR. Se indica el sistema transportador de monoaminas vesicular VMAT, responsable de la captación de catecolaminas en células cromafines. Los sistemas intercambiadores pueden funcionar de forma inversa bajo diversas condiciones fisiológicas. La acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en la matriz granular se produce a través de la interacción de este ión con diversos solutos, en especial cromograninas (línea negra).



### 4.4.1 Sistemas de liberación de calcio en los gránulos de secreción.

Los gránulos de secreción disponen de mecanismos de liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  que durante la activación celular pueden contribuir a su propia secreción. Uno de los primeros sistemas descritos en células neuroendocrinas, en concreto células cromafines, fue el  $\text{IP}_3\text{R}$  (Yoo & Albanesi, 1990). Si bien ha existido cierta controversia sobre su presencia en los SG (Pouli et al., 1998; Mitchell et al., 2001; Endo et al., 2006), cada vez se encuentran más evidencias de la existencia de  $\text{IP}_3\text{R}$  en la membrana vesicular de diversos tipos celulares neuroendocrinos, como células cromafines, células PC12 e INS-1, mastocitos, y células secretoras de somatostatina (SantoDomingo et al., 2008; 2010; Quesada et al., 2001; 2003; Blondel et al., 1994; 1995). En 2005 se evidenció la presencia de los tres tipos de  $\text{IP}_3\text{R}$  en SG de células cromafines en una proporción que corresponde al 60% del total celular, mayor que en otros orgánulos que presentan  $\text{IP}_3\text{R}$  (Huh et al., 2005). Se ha demostrado que los  $\text{IP}_3\text{R}$  interactúan físicamente con CgA y CgB al pH ácido del lumen de los SG maduros, incrementando la sensibilidad a  $\text{IP}_3$ , y la velocidad y magnitud de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en estos canales, mientras que al pH existente en el ER o incluso GC dicha interacción solo es viable con CgB (Yoo, 2000). Esto supondría una evidencia experimental de que el propio  $\text{Ca}^{2+}$  intravesicular participa en la modulación de la secreción, incluso con mayor relevancia de otros depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  como el ER, que además se encontrarían más alejados de los microdominios generados en el entorno de los SG que están anclados a la membrana plasmática. Las cromograninas desempeñan un papel clave en la biogénesis y transporte de los gránulos y se ha sugerido que participan en la regulación de la transcripción de ciertos componentes de los SG entre ellos los propios  $\text{IP}_3\text{R}$  (Huh et al., 2005; Yoo & Hur, 2012).

Las cromograninas así como diversos polímeros aniónicos juegan un papel en la compartimentalización del  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la matriz granular (Borges et al., 2012; Álvarez, 2012). El equilibrio dinámico existente entre los compartimentos de calcio intragranular desempeña un papel fundamental en la generación las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  tanto citosólico como vesicular producidas tras la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular mediada por  $\text{IP}_3$ . Ante un estímulo celular, el  $\text{IP}_3$  difunde y permite la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los SG a través de  $\text{IP}_3\text{R}$ , contribuyendo al aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]_C$  en el entorno próximo de estos canales, generándose microdominios de alto  $\text{Ca}^{2+}$ .



Dicho aumento permite la apertura de canales de  $K^+$  sensibles a  $Ca^{2+}$  (ASKCa) de la membrana vesicular y el cierre de los  $IP_3R$ , con entrada de  $K^+$  al lumen vesicular. Este  $K^+$  desplaza al calcio que se encuentra unido a la matriz de forma que aumenta la  $[Ca^{2+}]_{SG}$ . Además, la captación de  $Ca^{2+}$  del microdominio a través de ATPasas de  $Ca^{2+}$  u otros sistemas colabora con el aumento de la  $[Ca^{2+}]_{SG}$ . Consecuentemente la disminución del  $Ca^{2+}$  citosólico en los microdominios provoca el cierre de los canales ASKCa y la apertura de los  $IP_3R$ , generándose así un nuevo ciclo (Quesada et al., 2001; 2003). Al respecto de este mecanismo, aunque algunos estudios han mostrado que no existe aumento de  $[Ca^{2+}]_C$  en el entorno próximo de estos canales durante la activación celular, dicho aumento puede estar restringido a una subpoblación vesicular muy concreta, y disiparse rápidamente por movilización hacia otros depósitos de  $Ca^{2+}$  como mitocondrias, retículo endoplásmico u otras subpoblaciones vesiculares cercanas durante la exocitosis (Pouli et al., 1998; García et al., 2006).

En cuanto a los RyR, existen evidencias funcionales de liberación de  $Ca^{2+}$  mediada por cafeína en los SG de células cromafines, células PC12 e INS-1 y células MIN6 (Mitchell et al., 2001; 2003; SantoDomingo et al., 2008; 2010). De igual forma, se ha documentado la liberación de  $Ca^{2+}$  mediada por cADPR y NAADP en gránulos de zimógeno, en compartimentos ácidos en plaquetas y células PC12, y en los SG de células MIN6, células  $\beta$ -pancreáticas y células de neurohipófisis (Gerasimenko et al., 1996; Gerasimenko et al., 2006; Rosado, 2011; Brailoiu et al., 2006; Mitchell et al., 2001; 2003; Duman et al., 2006; McNally et al., 2014). La identidad del posible receptor de NAADP es actualmente desconocida habiéndose propuesto los RyR, los canales TRP y los canales TPC, siendo estos últimos los más firmes candidatos (Mojžišová et al., 2001; Hohenegger et al., 2002; Zhang & Li, 2007; Brailoiu et al., 2009; Calcraft et al., 2009).

Se ha documentado la liberación de  $Ca^{2+}$  mediada por ácido araquidónico en compartimentos ácidos distintos de los lisosomas, presumiblemente los gránulos de secreción. Este dato sugiere la presencia de canales ARC o TRP en la membrana vesicular (Yeung-Yam-Wah et al., 2012). Por otro lado, se ha propuesto la existencia de canales VOCC de tipo N en la membrana granular, si bien algunos estudios afirman que esta localización solo se observa en la etapa previa a la fusión de los gránulos con la membrana plasmática (Passafaro et al., 1996; 2000).

Se ha postulado incluso la presencia de Orai1 en la membrana de los gránulos, de forma que estos orgánulos podrían participar en el mecanismo SOCE, o bien contribuir en el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico durante la activación celular (Dickson et al., 2012).

A pesar de las numerosas evidencias funcionales, diversos estudios proteómicos que han identificado hasta 380 proteínas de membrana de los gránulos no han podido determinar la presencia de  $\text{IP}_3\text{R}$  en los SG de células cromafines, células insulínicas, y gránulos de zimógeno (Wegrzym et al., 2010; Brunner et al., 2007; Rindler et al., 2007). Por el contrario, estos estudios han mostrado evidencias de la presencia de RyR, VOCC y TRP en los SG de células cromafines (Wegrzym et al., 2010; McNally et al., 2014).

### 4.4.2 Sistemas de captación de calcio en los gránulos de secreción.

Puesto que la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$  es aproximadamente 1000 veces superior a la existente en el citosol es lógico presuponer la existencia de uno o varios mecanismos de captación y acumulación del  $\text{Ca}^{2+}$  en los SG. Se ha descrito la existencia de NCX en la membrana vesicular de células cromafines bovinas y células PC12 (Krieger-Brauer & Gratzl, 1983; Mahapatra et al., 2004). Se trata de un sistema de captación de  $\text{Ca}^{2+}$  de alta afinidad pero de transporte lento y baja capacidad, que se complementaría con un sistema intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y la acción V-ATPasa (Haigh & Phillips, 1993). La acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  depende del gradiente de  $\text{Na}^+$ , siendo la  $[\text{Na}^+]$  en los SG tres veces superior con respecto a la del citosol. Asumiendo una estequiometría de  $2\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  este sistema sería responsable en parte de la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  granular. De hecho, se ha evidenciado que este sistema funcionando de forma inversa es responsable de la acumulación de  $\text{Na}^+$  en los SG de terminaciones nerviosas de neurohipófisis (Thirion et al., 1999).

Por otra parte, se ha documentado la existencia de un intercambiador  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  (*Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger*, CHX) en vesículas sinápticas de córtex cerebral y en los SG de células PC12 y células cromafines bovinas (Goncalves et al., 2000; Mahapatra et al., 2004; Santo Domingo et al., 2008). CHX complementado con una ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  y en colaboración con la V-ATPasa permitiría la acumulación de este ión hasta una  $[\text{Ca}^{2+}]$  1000 veces superior a la existente en el citosol, asumiendo una estequiometría  $1\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$ .

No obstante, se trata de un sistema de baja afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  que empieza a tener una actividad a  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$  en torno a  $100\mu\text{M}$ . Se ha propuesto que CHX podría jugar un papel en la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el entorno de los canales VOCC durante la activación celular, modulando la duración temporal de los pulsos de acetilcolina durante el impulso nervioso, pudiendo actuar de forma inversa liberando  $\text{Ca}^{2+}$  frente a una variación en el pH granular (Camacho et al., 2008; Cordeiro et al., 2011).

Existen numerosos estudios que documentan la existencia de ATPasas de  $\text{Ca}^{2+}$  como mecanismo principal de captación de  $\text{Ca}^{2+}$  en los SG, si bien la identidad de dichas ATPasas es objeto de debate. En estudios de inhibición de la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  con tapsigargina y BHQ, se ha evidenciado la existencia de SERCA en la membrana de las vesículas sinápticas de neuronas colinérgicas y de gránulos de secreción de células  $\beta$ -pancreáticas, plaquetas, células cromafines y células PC12 e INS-1 (Fossier et al., 1998; Duman et al., 2006; Rosado., 2011; Mahapatra et al., 2004; SantoDomingo et al., 2008; 2010).

Sin embargo, otros estudios en células MIN6, y células  $\beta$ -pancreáticas demuestran que la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  en los SG esta mediada a través de SPCA, insensible a tapsigargina, donde además la contribución del CHX es prácticamente nula (Mitchell et al., 2001; 2004; Xie et al., 2006). Como se ha explicado con anterioridad, el GC presenta una proporción de SPCA/SERCA que se incrementa según se avanza desde subcompartimento *cis*-Golgi al *trans*-Golgi. Puesto que el subcompartimento *trans*-Golgi experimenta intercambios dinámicos con otros compartimentos ácidos de  $\text{Ca}^{2+}$ , es lógico suponer un aumento la presencia de este tipo de ATPasa en los SG (Mitchell et al., 2004).

Diversos estudios proteómicos que han identificado hasta 380 proteínas de membrana de los gránulos han evidenciado la existencia de proteínas que se corresponden con sistemas de captación de  $\text{Ca}^{2+}$  como NCKX, y SERCA en diversos tipos celulares neuroendocrinos, si bien se requiere todavía más información al respecto (Wegrzym et al., 2010; Lee et al., 2009).

### 4.4.3 Controversia sobre el papel del calcio en los gránulos de secreción.

A pesar de que la función tradicional de los SG ha sido la retención del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y su almacenamiento con el fin de contribuir al empaquetamiento del contenido del lumen vesicular (Winkler, 1977; Pozzan et al., 1994), cada vez existen más estudios que evidencian la importancia del  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular en la regulación de la secreción (Gerasimenko et al., 1996; Scheenen et al., 1998; Mundorf et al., 2000; Mitchell et al., 2003; Mahapatra et al., 2004; Camacho et al., 2008; SantoDomingo et al., 2008; 2010). Por ejemplo, en células  $\beta$ -pancreáticas y células cromafines la depleción de  $\text{Ca}^{2+}$  de los gránulos de secreción han inhibido considerablemente la movilidad vesicular y la exocitosis (Scheenen et al., 1998; Mundorf et al., 2000; Camacho et al., 2008).

La evidencia funcional de los diversos mecanismos de captación y liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en los gránulos de secreción es una prueba más del papel del control de los gránulos en su propia exocitosis. Recientemente, se ha descrito en los SG de células de neurohipófisis la presencia de RyR y su contribución, junto a los VOCC presentes en membrana plasmática, en la generación de microdominios de alto  $\text{Ca}^{2+}$  denominados *Syntillas*, equivalentes a los ya mencionados *Sparklet* de músculo cardíaco (Berridge, 2006). Estos *Syntillas*, generados por liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular mediante CICR, pueden jugar un papel crucial en la modulación de la secreción (McNally et al., 2014).

El uso de sondas de AEQ dirigidas a los SG ha permitido el estudio de la dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$  intragranular ante diversos estímulos fisiológicos en diversos tipos celulares neuroendocrinos (Mitchell et al., 2001; 2003; Iezzi et al., 2005; Moreno et al., 2005; SantoDomingo et al., 2008; 2010). Sin embargo, estos estudios dan una visión global del  $\text{Ca}^{2+}$  de los SG sin ahondar en el papel que puede desempeñar cada subpoblación vesicular en las etapas que componen la secreción y su dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$  individual ante un determinado estímulo.

Se requieren por tanto nuevas herramientas de medición de  $\text{Ca}^{2+}$  para el estudio de dichas subpoblaciones vesiculares y su contribución al proceso de exocitosis.



# *OBJETIVOS*

---



Como se ha mencionado en la Introducción, la importancia de la señalización celular por  $\text{Ca}^{2+}$  se debe a la variedad de funciones reguladas por este ión, que van desde la proliferación hasta la muerte celular (Berridge et al., 2003). Dentro de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  subcelular se generalmente se acepta que los principales reservorios dinámicos de  $\text{Ca}^{2+}$  son el retículo endoplásmico (ER) (Montero et al., 1997a), la mitocondria (Montero et al., 2000) y en menor grado el complejo de Golgi (GC) (Pezzati et al., 1997). Sin embargo, en células neuroendocrinas los gránulos de secreción (SG) constituyen unos de los orgánulos más abundantes y en algunos casos su principal reservorio intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , conteniendo concentraciones totales de este ión incluso mayores que las del RE (Winker & Westhead, 1980; Hutton et al., 1983; Haigh et al., 1989). Se ha propuesto que liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  de los SG podría contribuir a su propia exocitosis (Scheenen et al., 1998). A pesar de ello, en la actualidad son uno de los compartimentos subcelulares menos conocidos en términos de dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$ .

En nuestro laboratorio se han realizado mediciones directas de flujos y concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intragranular ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$ ) gracias a la sonda de aequorina (AEQ) dirigida a los SG VAMP-mAEQ, previamente usada por otros autores (Mitchell et al., 2001; 2003; Iezzi et al., 2005). La monitorización de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$  ha permitido el estudio funcional de los mecanismos de captación, almacenamiento y liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  frente a diversos estímulos y maniobras fisiológicas en los SG de diversos cultivos primarios y líneas neuroendocrinas (Moreno et al., 2005; SantoDomingo et al., 2008; 2010). No obstante, se ha observado que dichos mecanismos difieren considerablemente en función del tipo celular utilizado. Más aún, se ha reportado la existencia de respuestas heterogéneas para ciertos estímulos en un mismo tipo celular. El origen de esas respuestas pone de manifiesto la existencia de subpoblaciones de SG que se diferencian, no solo en términos de tasa de tráfico y estado de maduración, sino también en la dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular (Voets et al., 1999; García et al., 2006; Álvarez & Marengo, 2011). En la actualidad, la confirmación funcional de estos mecanismos de homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular junto con su confirmación proteómica es escasa o inexistente en algunos casos (Álvarez, 2012). Dichos aspectos han centrado el interés de los investigadores durante décadas, quedando todavía cuestiones por resolver como la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de los propios depósitos de los SG y la contribución de estos depósitos al tráfico y exocitosis de los mismos gránulos.

## OBJETIVOS

---

El objetivo principal de este trabajo es doble. Por un lado, profundizar en el estudio de la dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular mediante experimentos realizados en población celular. En segundo lugar, aproximarse a la dinámica de subpoblaciones vesiculares mediante estudios de  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular por técnicas de imagen de fluorescencia en célula única. Una de las principales dificultades para llevar a cabo estos estudios es disponer de sondas correctamente localizadas, que permitan realizar medidas adecuadas de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  libre en el medio ácido intragranular. Para este fin se utilizarán tanto sondas de AEQ como diversos indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$  codificados genéticamente (GECI) dirigidos a los SG con las secuencias de sinaptobrevina (VAMP), cromogranina A (CgA) y neuropéptido Y (NPY). Las sondas diseñadas con estas dos últimas secuencias suponen una ventaja experimental con respecto a VAMP como se irá tratando en los siguientes apartados. Dicho estudio de dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular se realizará comparativamente entre las líneas celulares cromafines de rata PC12, especializada en la secreción de catecolaminas, y las líneas celulares derivadas de células  $\beta$ -pancreáticas, INS-1 y su clon INS-1E, especializadas en la secreción de insulina. Entre esas dos últimas líneas celulares  $\beta$ -pancreáticas también se abordarán aspectos de la dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$  en el ER, mitocondria, citosol y en la zona submembrana plasmática, por medio de sondas de AEQ dirigidas a dichas localizaciones celulares. Este objetivo principal se puede concretar en los siguientes apartados:

1. Generación de constructos de AEQ dirigida a la matriz densa de los SG, mediante direccionamiento con las secuencias de CgA y NPY.
2. Generación de constructos con los indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescentes rtPericam y la familia de indicadores GECO (*Genetically Encoded  $\text{Ca}^{2+}$  indicators for Optical Imaging*) dirigidos a los SG, tanto a la membrana granular (VAMP) como a la matriz densa (CgA, NPY).
3. Monitorización de los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular en población celular mediante registros de bioluminiscencia con las diferentes sondas de AEQ dirigidas a los SG, así como los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  en ER, mitocondria, citosol y en la zona submembrana plasmática mediante sondas de AEQ dirigidas a dichas regiones celulares.
4. Monitorización de los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular en célula única mediante registros de fluorescencia por microscopía confocal con las diferentes sondas de rtPericam y GECO dirigidas a los SG.





***MATERIAL Y MÉTODOS***

---



## 1. CULTIVOS CELULARES.

---

### 1.1 Líneas celulares. Tipos y mantenimiento.

#### 1.1.1 Línea celular PC12.

Las células PC12 son una línea inmortal de células derivadas de un feocromocitoma de rata (Greene & Tischler, 1976), ampliamente utilizada en estudios morfológicos y de secreción de catecolaminas, entre otros. Fueron cultivadas en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) de alta glucosa (4,5g/L), suplementado con 7,5%(v/v) de suero de caballo (HS), 7,5%(v/v) de suero fetal bovino (FBS), L-glutamina (2mM), 100UI/mL de penicilina y 100μg/mL de estreptomicina. Para este estudio en concreto se utilizaron líneas derivadas de mayor adherencia, denominadas PCDA (Dispersyn et al., 1999). La línea celular PCDA, denominada PC12 por mayor comodidad, se incubó a 37°C en atmósfera de 7,5% de CO<sub>2</sub> y saturada de humedad.

#### 1.1.2 Línea celular INS-1.

Las células INS-1 son una línea inmortal derivada de células β-pancreáticas de un insulinoma de rata (Asfari et al., 1992), utilizada en estudios de secreción de insulina, entre otros. Fueron cultivadas en medio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 HEPES 25mM, suplementado con 10%(v/v) de FBS, L-glutamina (2mM), piruvato sódico (1mM), 100UI/mL de penicilina y 100μg/mL de estreptomicina, y β-mercaptoetanol (50 μM). Se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y saturada de humedad.

#### 1.1.3 Clon celular INS-1E.

Las células INS-1E son un clon derivado de la línea celular INS-1, seleccionado en base a su contenido insulínico y su respuesta secretora a glucosa (Merglen et al., 2004). Fueron cultivadas en medio RPMI 1640 HEPES 25mM, suplementado con 10%(v/v) de FBS, L-glutamina (2mM), piruvato sódico (1mM), 100UI/mL de penicilina y 100μg/mL de estreptomicina, y β-mercaptoetanol (50 μM). Se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y saturada de humedad.

### **1.1.4 Línea celular HeLa.**

Las células HeLa son una línea inmortal derivada de células epiteliales de adenocarcinoma de cuello de útero humano (Sherer et al., 1953). Se trata de la primera línea celular estable cultivada con éxito, y ha sido utilizada en innumerables y diversos ensayos desde entonces. Fueron cultivadas en medio DMEM glucosa 1,0g/L, suplementado con 5%(v/v) de FBS, L-glutamina (2mM), 100UI/mL de penicilina y 100µg/mL de estreptomina. Se incubaron a 37°C en atmósfera de 7,5% de CO<sub>2</sub> y saturada de humedad.

### **1.2 Protocolos de siembra y transfección de las células.**

Todos los cultivos celulares descritos en el presente trabajo son adherentes y para su mantenimiento y siembra se ha seguido el mismo protocolo. Una vez alcanzada la confluencia, los cultivos se lavan con tampón fosfato salino (PBS) y se incuban con solución de tripsina-EDTA 0,125%(v/v). Las células se resuspenden en el medio de cultivo y se siembran a la densidad deseada. El medio se recambia cada 2-3 días.

Para llevar a cabo los experimentos de bioluminiscencia con las sondas de aequorina (AEQ), los cultivos de células secretoras (PC12, INS-1 e INS-1E) se sembraron en cristales circulares de 13mm de diámetro con recubrimiento de poli-L-lisina (10µg/mL), depositados en placas de 24 pocillos de 2cm<sup>2</sup>, a una densidad comprendida entre 250.000 – 350.000 células por pocillo. Las células HeLa se sembraron a una densidad de 80.000 células por pocillo sobre cristales sin recubrimiento de poli-L-lisina. Para los experimentos de imagen en microscopio confocal con sondas de fluorescencia, los cultivos de células secretoras se sembraron en placas de cultivo circulares de 35mm de diámetro con fondo de cristal de 14mm de diámetro y recubrimiento de poli-L-lisina (10µg/mL), a una densidad de entre 350.000-500.000 células por placa. La transfección de los cultivos con los plásmidos de las diferentes sondas se realizó, a las 24-48 horas de la siembra, por lipofección con el agente Metafectene Pro. Se optimizó la cantidad y relación Metafectene/DNA, y el tiempo de expresión según el tipo de experimento y constructo utilizado siendo 24-48 horas para los experimentos realizados en el citosol, mitocondria, la cara interna de la membrana plasmática, y el retículo endoplásmico (ER), y 48-72 horas para experimentos en los gránulos de secreción (SG).

## 2. MATERIALES Y REACTIVOS.

---

El medio DMEM así como los sueros FBS y HS fueron suministrados por GIBCO. El Metafectene Pro fue suministrado por Biontex.

El kit de mutagénesis dirigida se obtuvo de Stratagene, y los oligonucleótidos se obtuvieron de Thermo Fischer Scientific y Eurofins MWG Operon. Las enzimas de restricción fueron suministrados por Fermentas y New England Biolabs. La ligasa del fago T<sub>4</sub> se adquirió en ROCHE. Otras enzimas utilizadas se adquirieron de Fermentas. Las bacterias competentes DH5- $\alpha$  y XL-10 Gold se adquirieron de Invitrogen y Agilent Technologies respectivamente. El resto de los reactivos de biología molecular fueron suministrados por Biorad.

La celenteracinas *wt* e *i* se adquirieron de Biotium. El colorante MitoTracker Deep Red fue suministrado por Molecular Probes, OR, USA.

La ionomicina ácida fue suministrada por Tocris Laboratories. La bafilomicina A se obtuvo de LC Laboratories. El inositol(1,4,5)trifosfato (IP<sub>3</sub>) fue suministrado por VWR. Monensina, ácido nicotínico-adenín-dinucleótido fosfato (NAADP), digitonina, ADP ribosa cíclica (cADPR), cafeína, carbacol, terc-butil-benzohidroquinona (BHQ), tapsigargina y carbonilcianuro-p-trifluorometoxi fenilhidrazona (FCCP) se obtuvieron de Sigma.

El resto de los reactivos no nombrados fueron suministrados mayoritariamente por Sigma-Aldrich.

### 3. GENERACIÓN DE LAS NUEVAS SONDAS DE CALCIO.

---

#### 3.1 Generación de constructos bioluminiscentes y fluorescentes.

Con el objetivo de realizar el estudio de la dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$  en los SG tanto en población celular como en célula única, se generaron diferentes sondas de  $\text{Ca}^{2+}$  dirigidas a este orgánulo. Las secuencias de localización a los SG utilizadas fueron el neuropéptido Y (NPY), la cromogranina A (CgA), y la sinaptobrevina 2 (*Vesicle-Associated Membrane Protein 2*, VAMP2) denominada a partir de ahora VAMP. El neuropéptido Y es un neurotransmisor expresado universalmente en células del cerebro y Sistema Nervioso Autónomo, que regula procesos de ingesta de alimentos en hipotálamo, la actividad neuroendocrina y vasoconstricción entre otros (Pedrazzini et al., 2003). La cromogranina A es un miembro de la familia de las graninas que desempeñan un papel biológico importante en la biogénesis de los gránulos (Koshimizu et al., 2010). Ambos se encuentran solubles, localizados en la matriz densa de los SG y se liberan al medio extracelular en la exocitosis. Por otra parte VAMP forma parte del complejo proteico implicado en el anclaje y/o la fusión de los SG con la membrana plasmática (Deák et al., 2006). Se trata de una proteína SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment Protein REceptor*) específica de vesículas con un dominio transmembrana, anclada en la membrana granular. Tras la fusión vesicular, durante la exocitosis, se queda finalmente anclada a la membrana plasmática con la sonda en el lado extracelular.

La generación de las diferentes sondas de  $\text{Ca}^{2+}$  dirigidas a los SG comprendió etapas de extracción, aislamiento y unión de las secuencias de localización a las secuencias de las correspondientes sondas. Siguiendo un protocolo estandarizado las digestiones enzimáticas preparativas contenían como pauta general unos 10-15 $\mu\text{g}$  de DNA, la enzima o enzimas seleccionadas, y el tampón salino (con o sin albumina de suero bovina, BSA) adecuados al tipo de corte enzimático y cantidad de DNA a digerir. Estas mezclas se incubaron en baño generalmente a 37°C, entre 6-12 horas para una correcta digestión del DNA. El DNA digerido se sometió a un proceso de electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v), donde se separaron, aislaron y finalmente purificaron los fragmentos de DNA de interés.

En ciertos casos el DNA digerido se defosforiló tras la digestión enzimática, evitando así problemas en la posterior ligación. En estos casos el DNA se incubó en baño con la enzima fosfatasa alcalina y su tampón salino a 37°C durante 1 hora. Las ligaciones de los fragmentos de DNA se llevaron a cabo mediante la enzima ligasa del fago T4 en su correspondiente tampón salino. Estas mezclas se incubaron unas 12 horas a temperatura ambiente. Los plásmidos obtenidos se amplificaron mediante transformación, siembra y cultivo líquido en bacterias competentes *E. Coli* DH5- $\alpha$ . La selección y cultivo de colonias que contenían los plásmidos de interés se realizaron en presencia del antibiótico correspondiente, siendo ampicilina para pcDNA3.1 y kanamicina en el caso de pEGFPN1 (3) y pShuttle (**Fig. 13**). Los plásmidos se extrajeron en H<sub>2</sub>O desionizada estéril y se conservaron a -20°C para su posterior uso. Alícuotas de bacterias conteniendo los plásmidos de interés se preservaron en medio de congelación bacteriano y se almacenaron a -80°C.

Las secuencias del NPY y CgA provinieron de los plásmidos NPY-EGFP-N1 y CgA-EGFP-N3 que fueron cedidos por el laboratorio del Dr. Borges (Universidad de La Laguna, Tenerife). NPY y CgA estaban insertadas con HindIII-KpnI y EcoRI-KpnI en NPY-EGFP-N1 y CgA-EGFP-N3 respectivamente. La digestión de NPY-EGFP-N1 y CgA-EGFP-N3 con NheI-KpnI generó fragmentos entorno a 350pb y 1600pb que contenían las secuencias de NPY y CgA respectivamente. La inserción directa de estas secuencias en las sondas de Ca<sup>2+</sup> expresadas en pcDNA3.1 no era posible debido a conflictos con los sitios de restricción existentes. Como estrategia a seguir, estos fragmentos se introdujeron en el plásmido pShuttle, donde se pudieron seleccionar sitios de restricción más adecuados. Por otra parte la secuencia del VAMP provino de la sonda VAMP-mAEQ-pcDNA3.1 utilizada previamente en nuestro laboratorio (Moreno et al., 2005), e introducida mediante el sitio de restricción HindIII. La digestión de VAMP-mAEQ-pcDNA3.1 con HindIII generó un fragmento de entorno a 200pb que contenía la secuencia de VAMP.

Con el fin de realizar los registros de Ca<sup>2+</sup> en población celular mediante bioluminiscencia, se han diseñado sondas de Ca<sup>2+</sup> a partir de la secuencia genética de la fotoproteína aequorina.

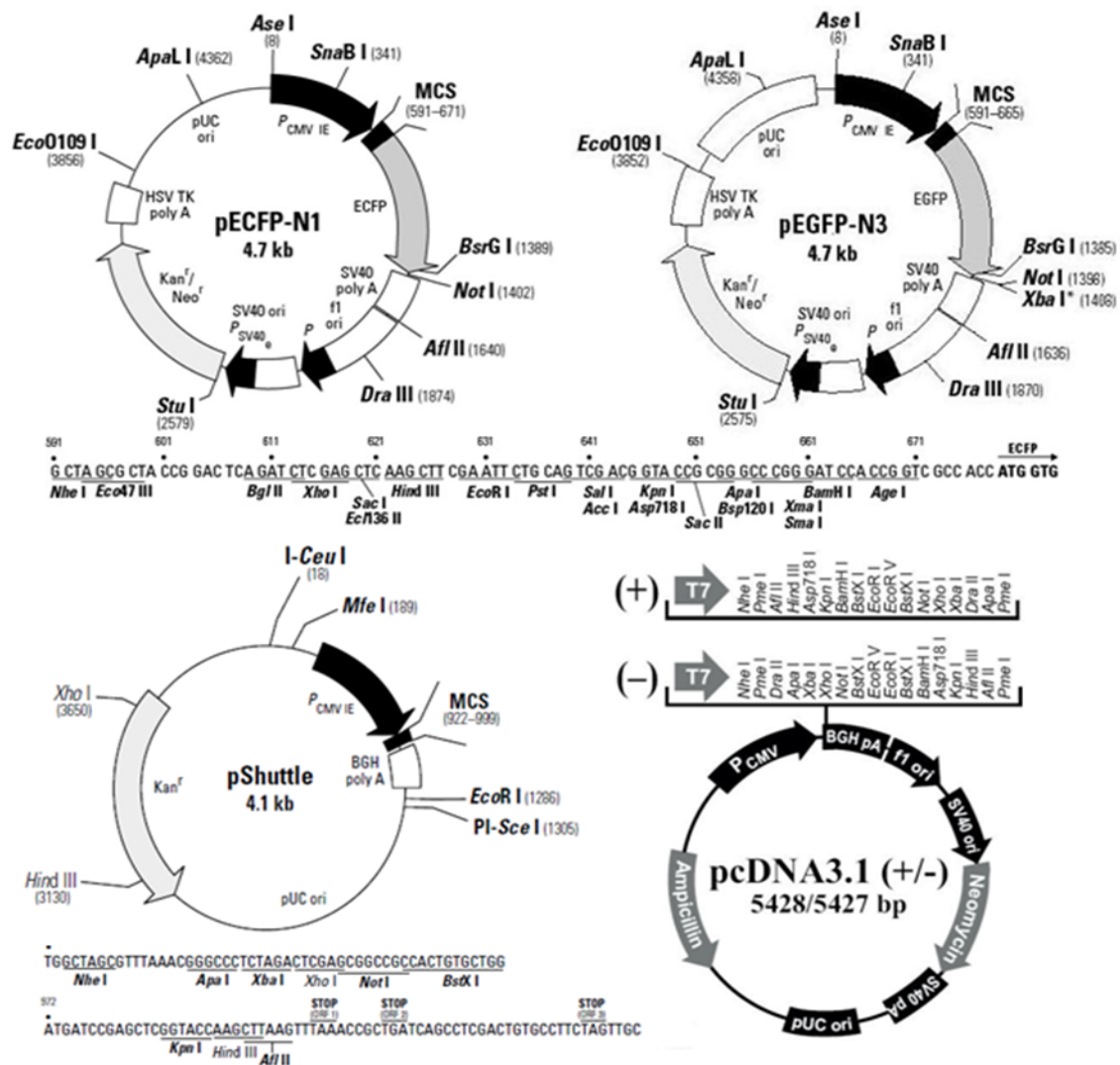


Fig. 13. Diagrama de los diferentes plásmidos utilizados en el presente trabajo, tanto para el diseño de los diferentes constructos como la expresión en células eucariotas. Se muestra en detalle, para cada caso y entre otras áreas, el mapa de restricción del sitio de clonaje múltiple, el gen que codifica resistencia a antibiótico para selección en procariontas, bien kanamicina o ampicilina, y el promotor de citomegalovirus humano para alta expresión de la proteína recombinante. En el caso de pEGFP-N1 (3) además se puede localizar *in vivo* la proteína recombinante de interés al fusionarse con EGFP, adquiriendo así propiedades fluorescentes.

La sonda de AEQ dirigida a los gránulos de secreción VAMP-mAEQ, fue utilizada con anterioridad en el estudio sobre el papel del Ca<sup>2+</sup> en los SG de células MIN6 (Mitchell et al., 2001; 2003) y cromafines bovinas (SantoDomingo et al., 2008). Esta sonda es una quimera de la sinaptobrevina 2 (VAMP), y de una aequorina mutada de menor afinidad por Ca<sup>2+</sup> (mAEQ). El planteamiento de su diseño se utilizó en la generación de los constructos de aequorina CgA-mAEQ y NPY-mAEQ.



Para la obtención de estos constructos se partió de la aequorina mutada dirigida a la mitocondria (mit-mAEQ), insertada en el plásmido pcDNA3.1 mediante el sitio de restricción EcoRI. La digestión HindIII-EcoRI del plásmido mit-mAEQ-pcDNA3.1 generó un fragmento entorno a 700pb que contenía la AEQ mutada sin la secuencia de localización a la mitocondria. Este fragmento se introdujo en pcDNA3.1 y a partir de mAEQ-pcDNA3.1 se crearon las sondas de NPY-mAEQ y CgA-mAEQ. Desde CgA-pShuttle y NPY-pShuttle se insertaron ambas secuencias, NPY y CgA, en mAEQ-pcDNA3.1 a través del sitio de restricción HindIII. Mediante la digestión con EcoRI en el caso de CgA-mAEQ y EcoRI-KpnI para NPY-mAEQ se comprobó el sentido en el que se insertaron ambas secuencias en mAEQ-pcDNA3.1.

Por otra parte, los registros de  $Ca^{2+}$  en célula única mediante fluorescencia se llevaron a cabo con constructos generados a través de las sondas de  $Ca^{2+}$  Pericam ratiométrico (rtPericam) y la familia de Genetically Encoded  $Ca^{2+}$  indicators for Optical imaging (GECO), en concreto RGECO1 y los ratiométricos de doble emisión GEMGECO1 y doble excitación GEXGECO1. En estos casos se añadieron las secuencias de CgA, NPY y VAMP. La sonda rtPericam citosólico estaba introducida en pcDNA3.1 mediante los sitios de restricción HindIII-EcoRI. Las secuencias de localización de NPY y CgA se insertaron desde CgA-pShuttle y NPY-pShuttle respectivamente mediante los sitios de restricción NheI-AflIII. Por otro lado, la secuencia VAMP se introdujo en el sitio HindIII. El sentido de la inserción de VAMP en VAMP-rtPericam-pcDNA3.1 se verificó por digestión con Eco521.

Los diferentes GECO se encontraban insertados en los correspondientes plásmidos del repositorio del que se obtuvieron (RGECO1-32444, GEMGECO1-32442, GEXGECO1-32443; Addgene). La digestión BamHI-EcoRI de estos plásmidos comerciales generó fragmentos en torno a 1200pb que contenían los GECO utilizados, introducidos posteriormente en pcDNA3.1. Las secuencias de localización de NPY y CgA se insertaron desde CgA-pShuttle y NPY-pShuttle respectivamente mediante los sitios de restricción NheI-AflIII. La secuencia VAMP se introdujo en el sitio HindIII. El sentido de la inserción de VAMP en VAMP-GEMGECO1-pcDNA3.1, VAMP-GEXGECO1-pcDNA3.1 y VAMP-RGECO1-pcDNA3.1 se verificó por digestión con Eco521.

### 3.2 Mutagénesis dirigida.

En el caso de los constructos con la secuencia de localización NPY hubo de corregirse el marco de lectura para que la sonda fuera funcional. La técnica utilizada para solucionar el problema fue Mutagénesis Dirigida empleando el kit *QuickChange SiteDirected Mutagenesis Kit* de Stratagene. Este kit se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con parejas de oligonucleótidos que incluyen la mutación de interés. Como pauta general la mezcla de reacción contenía 25ng del plásmido original, 125ng de cada pareja de oligonucleótidos sense y antisense, junto a la polimerasa *QuickChange Lightning Enzyme* y los diferentes tampones salinos y nucleótidos de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La reacción de la PCR se llevó a cabo mediante un Mastercycler® (Eppendorf) siguiendo un programa de ciclos adecuando la temperatura, tiempo y número de ciclos según el constructo utilizado. Tras finalizar la reacción, el DNA molde, previamente metilado al extraerse originalmente de bacterias *E. Coli DH5-α*, se digirió con la enzima DpnI. La mezcla de reacción se incubó en baño 5 minutos a 37°C. El producto final que contenía el DNA con la mutación de interés se transformó y amplificó en bacterias competentes *XL-10 Gold*.

Los oligonucleótidos utilizados en cada caso fueron:

- Para NPY-mAEQ-pcDNA3.1.

**5'- GTGGACGGTACCAAGCTTTTATGATGTTCTGATTATG - 3'**

- Para NPY-rtPericam-pcDNA3.1.

**5'- CGGCCGCCACCATTGGTGAAGAGGC - 3'**

- Para NPY-GEXGECO1-pcDNA3.1 y NPY-GEMGECO1-pcDNA3.1.

**5'- GAGCTCGGATCCACCATTGGTCGACTCATC - 3'**

La corrección del marco de lectura se realizó en todos los casos por adición de una timina en la secuencia linker entre el NPY y la sonda de  $\text{Ca}^{2+}$ . En los constructos con las sondas Pericam y GECO la corrección del marco de lectura generó un nuevo sitio de restricción para NcoI, permitiendo así la identificación de las secuencias corregidas. En el caso del constructo con la sonda de AEQ se recurrió a la determinación funcional, realizando registros de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante bioluminiscencia con constructos de diferentes colonias bacterianas.

### 4. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO EN POBLACIÓN CELULAR. SONDAS DE AEQUORINA.

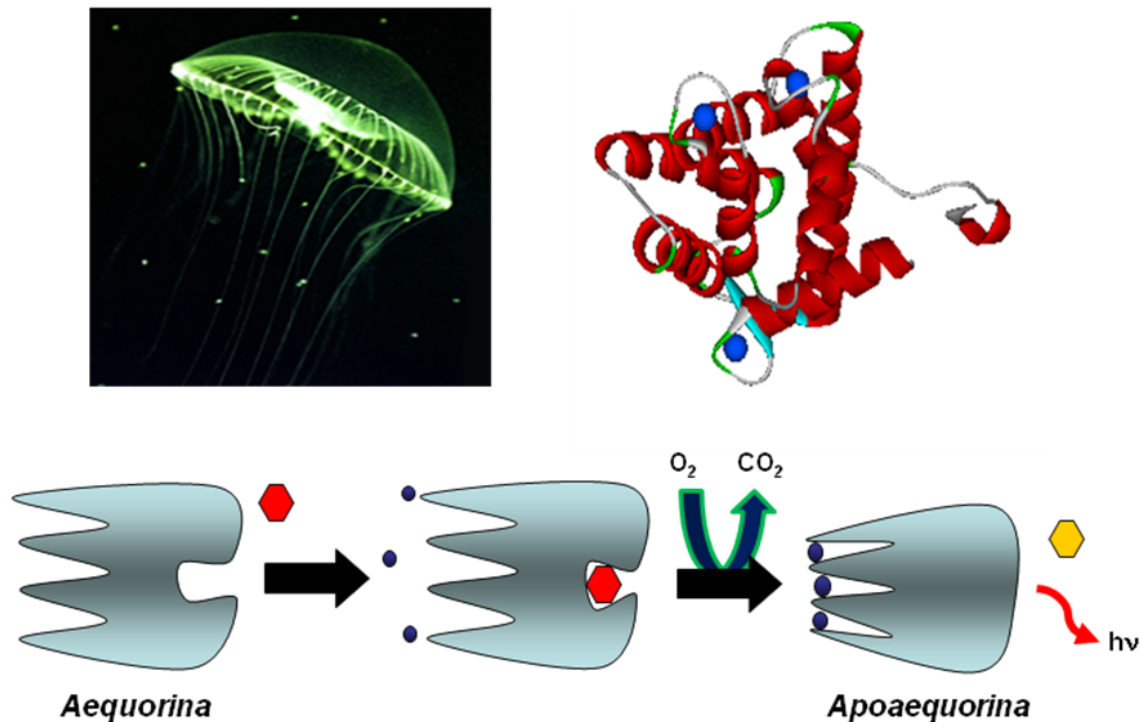
---

#### 4.1 Descripción de la sonda de calcio Aequorina.

Las medidas de  $\text{Ca}^{2+}$  en población celular realizadas en los experimentos del presente trabajo se llevaron a cabo gracias a la fotoproteína aequorina (AEQ), proveniente del cnidario *Aequorea Victoria* (Shimomura et al., 1962). En el propio cnidario la AEQ se encuentra presente junto a la proteína verde fluorescente (GFP) de modo que la energía liberada de la AEQ, como emisión de luz azul, sirve de excitación a la GFP que a su vez emite en el rango de luz verde. Este fenómeno se denomina *Chemoluminescence Resonance Energy Transfer* (CRET) (Morise et al., 1974).

La apoproteína de la AEQ (**Fig. 14**) estructuralmente consta de 189 residuos de aminoácidos con un peso de unos 21Kda. Existen cuatro dominios proteicos, tres de ellos funcionales, denominados *EF-Hand*. Estos dominios tipo hélice-bucle-hélice son capaces de interactuar con iones  $\text{Ca}^{2+}$ . También presenta un sitio catalítico para la interacción con su grupo prostético, la celenteracina, responsable del proceso de bioluminiscencia (Shimomura & Inouye, 1996; Head et al., 2000; Deng et al., 2004). Tras la interacción de la AEQ con su grupo prostético, proceso denominado reconstitución, y en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  unido a la AEQ, ésta cataliza la reacción de peroxidación del propio grupo prostético. El producto generado, la celenteramida, se encuentra en un estado electrónico excitado y emite un fotón en el rango visible a 470nm al pasar al estado fundamental (Vysotski & Lee, 2004).

La velocidad de emisión de fotones es proporcional a la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]$ ), en un rango de concentraciones determinado. Tras la reacción, una nueva unión de la apoproteína al grupo prostético es lenta (Ohmiya & Tsuji, 1993), considerándose la emisión de fotones como un proceso irreversible desde el punto de vista experimental. Esto da lugar a una desaparición progresiva de la sonda que se suele denominar “consumo” de la aequorina.



**Fig. 14. Modelo estructural y funcional de la fotoproteína aequorina.** Se puede visualizar en la parte arriba izquierda el cnidario *Aequorea Victoria*, arriba a la derecha la representación estructural de la apoproteína, destacando los tres dominios funcionales *EF-Hand* (motivo hélice-bucle-hélice) interaccionando con tres iones  $\text{Ca}^{2+}$  (esferas azules, no representadas a escala). En la parte de abajo se representa el fenómeno de bioluminiscencia, en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Como sonda de  $\text{Ca}^{2+}$ , la aequorina tiene una buena relación señal/ruido, y poca capacidad de tamponamiento. Carece de fototoxicidad a diferencia de otros indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$ , en su amplia mayoría fluorescentes, puesto que no necesita excitación previa. Además, presenta baja sensibilidad a cambios de pH (Blinks, 1990), frente a otras sondas basadas en la proteína verde fluorescente (GFP) y calmodulina (CaM) (Miyawaki et al., 1997), permitiendo medidas más fiables en entornos ácidos como el interior de los SG. El uso de quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  en la preparación de medios no tiene efectos directos sobre la funcionalidad de AEQ.

Por otra parte, el “consumo” de la sonda de AEQ supone una limitación temporal de los experimentos con AEQ. Además, la alta afinidad de la AEQ nativa (wtAEQ) por  $\text{Ca}^{2+}$  permite medidas fiables en el rango de  $[\text{Ca}^{2+}]$  0,1 – 5,0 $\mu\text{M}$ , por encima del cual la AEQ se consume prácticamente en su totalidad en pocos segundos.

## ***MATERIAL Y MÉTODOS***

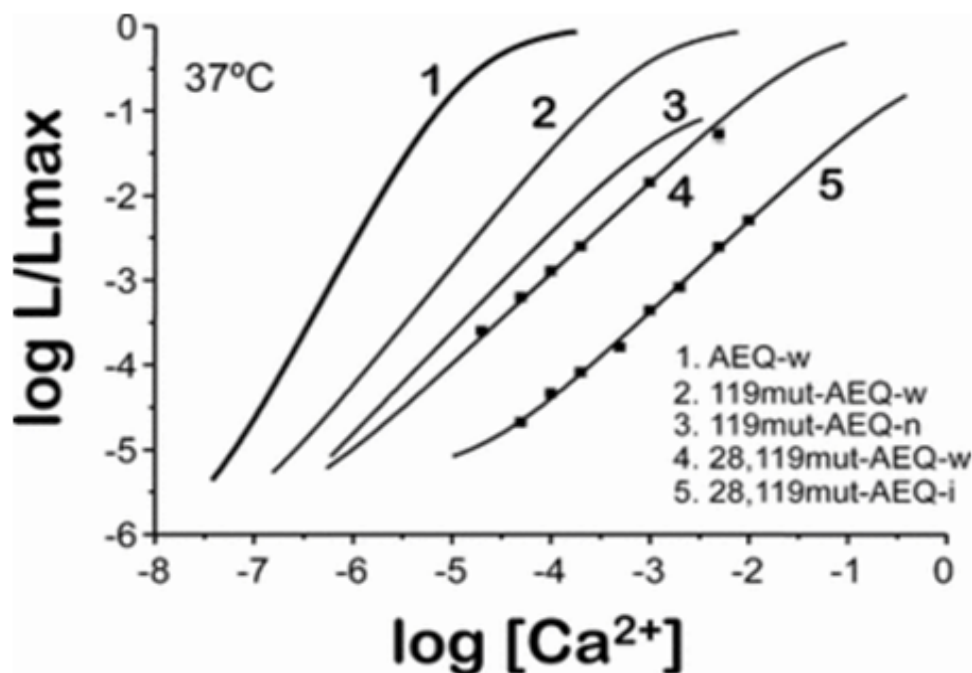
---

Este era el principal inconveniente de la sonda y que limitaba su uso a registros de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, siendo inviables medidas en otros orgánulos como las mitocondrias, el complejo de Golgi (GC), el ER y los SG entre otros, donde están descritos niveles de  $[\text{Ca}^{2+}]$  de varios órdenes de magnitud superiores.

Inicialmente, desde los años 60 a los 80 del siglo pasado, para realizar registros de  $\text{Ca}^{2+}$  la AEQ era aislada de la *Aequorea Victoria* en medio libre de  $\text{Ca}^{2+}$  y micro-inyectada en las células de estudio como el axón gigante del calamar. Este sistema era tedioso y su uso limitado a ciertos tipos celulares, siendo no obstante un buen indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (Ridgway & Ashley, 1967; Ridgway et al., 1977). La clonación del cDNA que codifica para la AEQ (Inouye et al., 1985) ha supuesto un gran avance en el desarrollo de la técnica. Por una parte se sustituyó la microinyección de proteína por la transfección o infección que amplía el estudio a un mayor número de tipos celulares. Además, se puede modificar el cDNA, añadiendo secuencias diana de dirección hacia compartimentos subcelulares, tales como la mitocondria (Rizzuto et al., 1992), el ER (Montero et al., 1997a), la zona submembrana plasmática (Marsault et al., 1997), el GC (Pinton et al., 1998) y los SG (Mitchell et al., 2001), entre otros.

Realizar mutaciones en los dominios *EF-Hand*, permitió disminuir la afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$ . Una primera mutación se realizó en el tercer dominio *EF-Hand*, sustituyendo un residuo de aspartato por otro de alanina en la posición 119 (D119A), que permitió reducir la afinidad un orden de magnitud (Kendall et al., 1992). Así se amplió el rango de medida a  $100\mu\text{M}$  (Montero et al., 1997a). Recientemente, en nuestro laboratorio se ha realizado con éxito una segunda mutación en el primer dominio *EF-Hand*, sustituyendo un residuo de asparagina por otro de leucina en la posición 28 (N28L), que ha permitido reducir aún más la afinidad hasta 2 órdenes de magnitud respecto a la AEQ nativa (De la Fuente et al., 2012; 2013). La utilización de variantes de celenteracina (*wt, i, n...*) que modifican la velocidad de emisión de fotones, permitió también ampliar los rangos de medida de  $[\text{Ca}^{2+}]$  (**Fig. 15**) (Montero et al., 1997b).

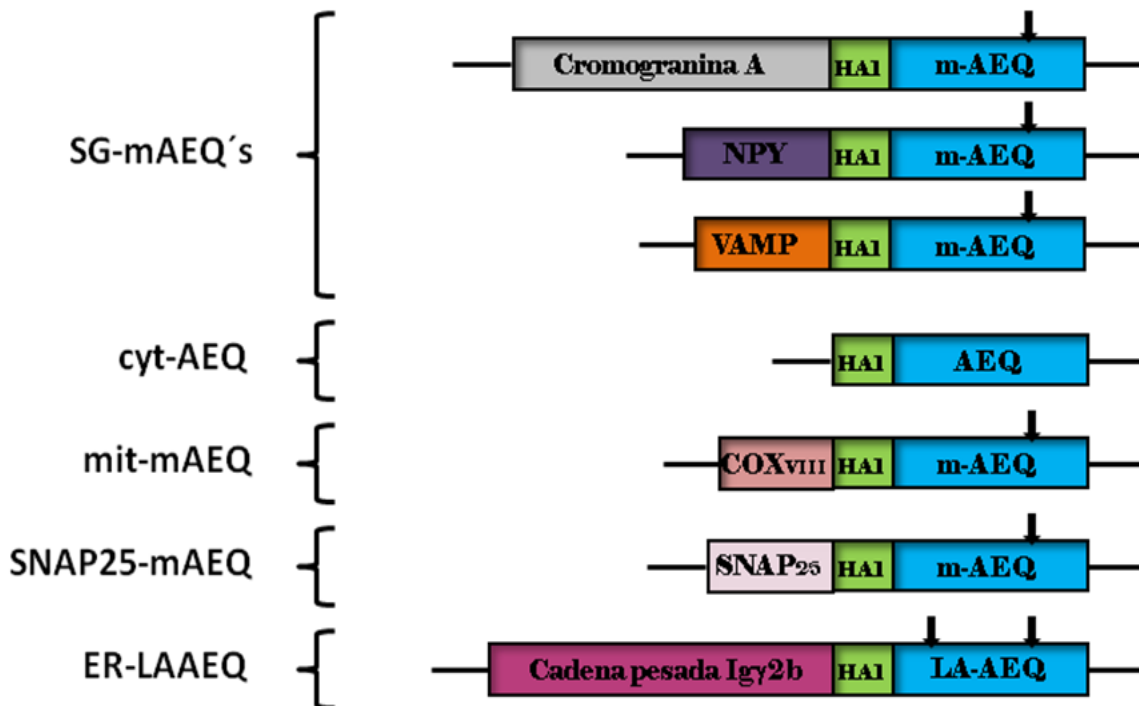
Por último, modificando la temperatura de trabajo de  $37^{\circ}\text{C}$  a  $22^{\circ}\text{C}$  se hace más lenta la reacción, alargando el tiempo de medida, pero con el inconveniente de no ser la temperatura fisiológica (Álvarez & Montero, 2002).



**Fig. 15. Curvas de calibración de las diferentes aequorinas.** Se pueden observar las curvas de calibración de los tipos de AEQ y celenteracinas comúnmente usados en este laboratorio, junto a la 28,119-mAEQ (o LAEQ), recientemente calibrada, todas a 37°C (De la Fuente et al., 2012).

De esta forma se solventa el problema de la saturación de la señal, consecuencia de las diversas magnitudes de  $[Ca^{2+}]$  existentes en los diferentes orgánulos, disponiendo así de varios rangos de medida según el tipo de experimento. En el presente trabajo se han usado diferentes sondas de aequorina dirigidas a citosol (cyt-AEQ), mitocondria (mit-mAEQ), retículo endoplásmico (ER-LAEQ), zona submembrana plasmática (SNAP25-mAEQ), y los gránulos de secreción. En estos últimos la sonda concretamente se ha localizado tanto anclada a la membrana granular con la AEQ en el lado interno de la misma (VAMP-mAEQ), como localizada en la matriz densa (CgA-mAEQ y NPY-mAEQ), como se ha descrito con anterioridad (**Fig. 16**).

El direccionamiento al ER se realizó con la secuencia de la cadena pesada de la inmunoglobulina IgM, el de la matriz mitocondrial con la secuencia que codifica la subunidad VIII del complejo Citocromo Oxidasa (COXVIII), y el de la membrana plasmática mediante SNAP25, una proteína t-SNARE que colabora en el proceso de exocitosis desde el anclaje a la membrana plasmática. Todas las aequorinas presentan un epítipo para localización mediante inmunoensayos (HA1) (Brini et al., 1995).



**Fig. 16.** Esquema de las diferentes sondas bioluminiscentes de aequorina utilizadas en el presente trabajo. En orden descendente se encuentran las aequorinas mutadas dirigidas a los gránulos de secreción (SG), la aequorina citosólica, la aequorina mutada dirigida a la mitocondria, la aequorina mutada anclada a la cara interna de la membrana plasmática y finalmente la aequorina de doble mutación dirigida al retículo endoplásmico (ER). Las flechas muestran las mutaciones realizadas en los respectivos aminoácidos de forma esquemática.

## 4.2 Equipo y sistema de medida.

Para llevar a cabo los experimentos de bioluminiscencia se dispusieron cristales circulares de 13mm de diámetro sembrados con cultivos de células que expresaban las diferentes sondas de AEQ. Las medidas de  $[Ca^{2+}]$  se realizaron entre 24-72 horas después de la transfección, periodo durante el cual se obtuvieron los mejores resultados de expresión de la sonda. Los fotones emitidos derivados de la reacción de bioluminiscencia de la AEQ se recogen en un luminómetro diseñado para tal fin según las indicaciones de Cobbold & Lee (1991).

El sistema en cuestión (**Fig. 17**), consta de una cámara de perfusión de 15mm de diámetro y 2mm de profundidad, de metacrilato negro para minimizar la pérdida de fotones y transferencia de calor.

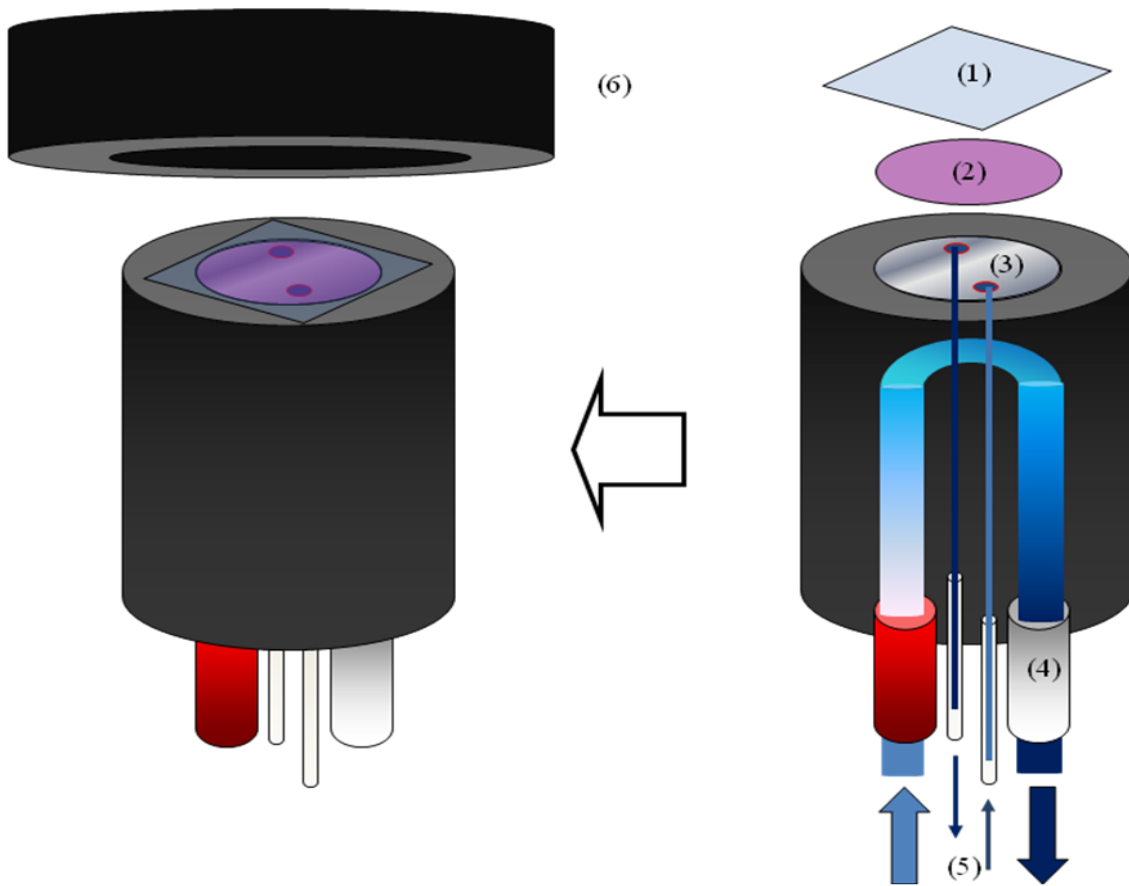


En su parte inferior existe una superficie reflectante de aluminio con el fin de dirigir el mayor número posible de fotones a un tubo fotomultiplicador.

La cámara posee dos orificios, de entrada y salida, para la perfusión de los diferentes medios celulares utilizados en los registros. Esta perfusión se realiza por gravedad, regulada mediante un sistema de electro-válvulas, con un flujo aproximado de 5mL/min. Esta cámara de perfusión se encuentra termostatzada mediante una camisa de agua y, por su parte, los medios celulares fluyen termostatzados mediante un calentador *on line* de Harvard Apparatus. En la superficie reflectante se disponen los cristales de 13mm sembrados con los diferentes cultivos celulares. Este sistema se sella mediante un cubreobjetos cuadrado de 24x24mm.

El tubo fotomultiplicador permite recoger la señal fotónica, traducirla, y amplificarla en una señal eléctrica. Los fotones emitidos inciden en un fotocátodo dándose emisión de electrones por efecto fotoeléctrico, los cuales son acelerados por una diferencia de potencial controlada, incidiendo en una serie de diodos que generan mayor emisión de electrones consecutivamente, hasta llegar al ánodo. Este sistema es muy sensible pudiendo detectar emisión basal aun en completa oscuridad en función de la temperatura y radiación. De ahí, que el sistema fotomultiplicador se mantenga refrigerado a una temperatura óptima de 4°C, y aislado de radiaciones interferentes mediante apantallamiento electromagnético.

En los presentes experimentos se utilizó un fotomultiplicador 9789A de Electron Tubes, de elevada ganancia/ruido y mayor sensibilidad al azul (470nm). El ánodo incluye un Amplificador-Discriminador Thorn EMI AD2, resolviendo espacio-temporalmente cada 50ms los fotones traducidos de anchura y amplitud definida. Estos datos son recogidos en una tarjeta CT2 Counter Timer de Electron Tubes y almacenados en un ordenador, donde se procesan y visualizan en datos de luminiscencia por segundo mediante el programa EM6 counter/timer también de Electron Tubes. Finalmente, mediante un programa de calibración previamente diseñado (Álvarez & Montero, 2002), estos registros serán representados como datos de  $[Ca^{2+}]$ .



**Fig. 17. Esquema de la cámara de perfusión.** En la parte derecha de la figura se pueden apreciar los diversos componentes de la cámara de perfusión: (1) Cubreobjetos 24x24mm. (2) Cristal 13mm de diámetro con los diferentes cultivos celulares sembrados. (3) Superficie reflectante de aluminio. (4) Sistema de termostatación por camisa de agua. (5) Sistema de perfusión de medios termostatizados. A la izquierda de la figura se expone el montaje completo con el (6) tubo fotomultiplicador.

### 4.3 Procedimiento experimental.

A continuación, se describe la composición de los medios más comúnmente utilizados en los registros de  $\text{Ca}^{2+}$ , tanto para luminiscencia como fluorescencia.

- **Medio extracelular  $\text{Ca}^{2+}$  1mM:** NaCl 145mM, KCl 5mM,  $\text{MgCl}_2$  1mM,  $\text{CaCl}_2$  1mM, glucosa 5-10mM, HEPES 10mM; pH 7,4 (NaOH).
- **Medio extracelular libre de  $\text{Ca}^{2+}$ :** NaCl 145mM, KCl 5mM,  $\text{MgCl}_2$  1mM, EGTA 0,2mM, glucosa 5-10mM, HEPES 10mM; pH 7,4 (NaOH).
- **Medio intracelular de permeabilización libre de  $\text{Ca}^{2+}$ :** NaCl 10mM, KCl 130mM,  $\text{MgCl}_2$  2mM,  $\text{H}_2\text{KPO}_4$  1mM, EGTA 0,2mM, succinato 5mM, glutamato 5mM, malato 5mM, HEPES 20mM; pH 7,0 (KOH).

- **Medio intracelular libre de  $Ca^{2+}$ :** NaCl 10mM, KCl 130mM,  $MgCl_2$  2mM,  $H_2KPO_4$  1mM, EGTA 0,2mM, succinato 5mM, glutamato 5mM, malato 5mM, ATP- $K^+$  1mM, ADP- $K^+$  20 $\mu$ M, HEPES 20mM; pH 7,0 (KOH).
- **Tampones intracelulares de  $Ca^{2+}$  libre 100nM (37°C):** NaCl 10mM, KCl 130mM,  $MgCl_2$  1,96mM,  $H_2KPO_4$  1mM,  $CaCl_2$  224 $\mu$ M, EGTA 1mM, succinato 5mM, glutamato 5mM, malato 5mM, ATP- $K^+$  1mM, ADP- $K^+$  20 $\mu$ M, HEPES 20mM; pH 7,0 (KOH).
- **Tampones intracelulares de  $Ca^{2+}$  libre 100nM (22°C):** NaCl 10mM, KCl 130mM,  $MgCl_2$  1,96mM,  $H_2KPO_4$  1mM,  $CaCl_2$  190 $\mu$ M, EGTA 1mM, succinato 5mM, glutamato 5mM, malato 5mM, ATP- $K^+$  1mM, ADP- $K^+$  20 $\mu$ M, HEPES 20mM; pH 7,0 (KOH).

Para poder realizar las medidas de  $[Ca^{2+}]$  mediante bioluminiscencia, se requiere que previamente la sonda de AEQ se reconstituya con su grupo prostético, la celenteracina. Este proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente (15-20°C) y en oscuridad. La celenteracina, lipofílica, difunde a través de las membranas celulares y se asocia a la AEQ. En los distintos experimentos, según el tipo de orgánulo donde se realizan los registros de bioluminiscencia, el protocolo de reconstitución varía. Para los registros de  $Ca^{2+}$  en citocitol, zona submembrana plasmática y mitocondria, las células sembradas en cristales de 13mm de diámetro se incubaron en medio extracelular  $Ca^{2+}$  1mM conteniendo 1 $\mu$ M de celenteracina *wt*, durante 1 hora. Para los registros de  $Ca^{2+}$  en el retículo endoplásmico, la reconstitución de la celenteracina se llevó a cabo en algunos casos depletando los depósitos de  $Ca^{2+}$  y en otros casos sin depletarlos. El proceso de vaciamiento, o depleción, de  $Ca^{2+}$  del retículo se realizó por un tratamiento de 10 minutos con terc-butyl-benzohidroquinona (BHQ) 10 $\mu$ M, inhibidor reversible de la ATPasa del retículo sarco/endoplásmico (SERCA), en medio extracelular libre de  $Ca^{2+}$ . Tras ese tiempo se realizaron dos lavados con medio extracelular libre de  $Ca^{2+}$  y la incubación final en ese mismo medio suplementado con BHQ 10 $\mu$ M. En ambos casos, bien con depleción o sin ella las células se incubaron con celenteracina *i* entre 1,5-2 horas. Finalmente para los registros de  $Ca^{2+}$  en gránulos de secreción se procedió a una depleción más drástica de los depósitos de  $Ca^{2+}$  incubando las células durante 10 minutos con ionomicina 10 $\mu$ M (ionóforo de  $Ca^{2+}$ ), monensina 10 $\mu$ M (ionóforo que intercambia  $Na^+$  por  $H^+$  a través de membranas biológicas) y BHQ 10 $\mu$ M en medio extracelular libre de  $Ca^{2+}$ . De esta forma, se abole totalmente el gradiente y se vacían de  $Ca^{2+}$  los SG. El resto del proceso es similar al visto para la reconstitución del ER, salvo que la reconstitución se realiza incubando 1-2 horas con celenteracina *wt*.

## ***MATERIAL Y MÉTODOS***

---

Tras el periodo de reconstitución se dispusieron las células en la cámara de perfusión, termostaticada a la temperatura deseada, la cual se fijó previamente (37°C o 22°C). Se selló el cubreobjetos con una película de grasa de silicona, y se dispuso la cámara en el fotomultiplicador, refrigerándose antes de comenzar los experimentos. Se perfundió medio extracelular  $\text{Ca}^{2+}$  1mM, o bien en células depletadas medio extracelular libre de  $\text{Ca}^{2+}$ , y se inició el registro de luminiscencia. En el caso de registros con VAMP-mAEQ tras perfundir 2 minutos con medio extracelular libre de  $\text{Ca}^{2+}$ , seguidamente se pasó a medio externo  $\text{La}^{3+}$  0,5mM (suplementado con  $\text{LaCl}_3$ ). De esta forma se consumió la AEQ anclada a la parte externa de la membrana plasmática para evitar su interferencia con las medidas de  $[\text{Ca}^{2+}]$ . Tras esto se perfundió medio extracelular libre de  $\text{Ca}^{2+}$  durante 3-4 minutos, lavando así el  $\text{La}^{3+}$  restante que pudiera interferir en la medida.

En el caso de experimentos en células intactas sin depleción tras perfundir el medio extracelular  $\text{Ca}^{2+}$  1mM durante 2 minutos se probaron los diferentes agonistas o medios utilizados. En los experimentos de células intactas depletadas, y en concreto en las medidas en los SG, se perfundió medio extracelular libre de  $\text{Ca}^{2+}$  durante 4-5 minutos para lavar el BHQ de la reconstitución, y seguidamente se perfundió medio extracelular  $\text{Ca}^{2+}$  1mM. Cuando la señal se estabilizó, proceso que puede durar desde 10 a 30-40 minutos según la temperatura de trabajo fijada, se procedió a perfundir los diferentes agonistas o medios. Para obtener la luminiscencia total necesaria en los cálculos de  $[\text{Ca}^{2+}]$ , al final del experimento se perfundió una solución de  $\text{Ca}^{2+}$  10mM con digitonina 20-100 $\mu\text{M}$ , un glucósido detergente, que solubiliza lípidos y precipita con colesterol, capaz de crear poros en la membrana externa celular sin dañar significativamente orgánulos internos, al menos en tratamientos cortos. Los experimentos en células permeabilizadas se realizaron con una depleción previa. Tras el lavado del BHQ se perfundió durante 1 minuto un medio intracelular de permeabilización libre de  $\text{Ca}^{2+}$  con digitonina 20-100 $\mu\text{M}$ , según el orgánulo y tipo celular del experimento. Seguidamente se procedió al lavado del resto de la digitonina con un medio intracelular libre de  $\text{Ca}^{2+}$  generalmente durante 5 minutos. Por último, se perfundieron tampones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  libre 100nM probando tras estabilizarse la señal diferentes agonistas. En este caso la luminiscencia total se obtiene perfundiendo la solución de  $\text{Ca}^{2+}$  10mM al final del experimento.

#### 4.4 Cálculo de la concentración de calcio a partir de los datos de luminiscencia.

Los datos de luminiscencia obtenidos se transforman, siguiendo el método propuesto por Allen et al. (1977), basado en la relación entre la  $[Ca^{2+}]$  y el cociente del consumo de la sonda de AEQ en cuentas por segundo ( $L$ ) dividido por las cuentas totales ( $L_{max}$ ). Tal cociente se determina, al final de cada registro, consumiendo toda la sonda con una solución de  $Ca^{2+}$  que sature la señal y obteniendo así las cuentas totales ( $L_{max}$ ). En el registro final se sustrae el fondo basal de luminiscencia, y se calcula el cociente ( $L/L_{max}$ ) en cada segundo. El siguiente algoritmo matemático describe la dependencia lumínica  $[Ca^{2+}]$  - AEQ, relacionando también los parámetros de temperatura, y tipo de AEQ y celenteracina usadas (Allen et al., 1977). Los valores de los parámetros usados en el presente trabajo (**Tabla 2**) fueron calculados previamente en nuestro laboratorio (Montero et al., 1997b; Álvarez & Montero, 2002; De la Fuente et al., 2013) y se recogen en el programa de calibración para obtener los datos de  $[Ca^{2+}]$  mediante registros de luminiscencia a través del algoritmo descrito.

$$[Ca^{2+}](M) = \frac{\left[\left(\frac{L}{L_{max} \cdot \lambda}\right)^{\frac{1}{n}} \cdot (1 + K_{TR})\right] - 1}{K_R \cdot \left[1 - \left(\frac{L}{L_{max} \cdot \lambda}\right)^{\frac{1}{n}}\right]}$$

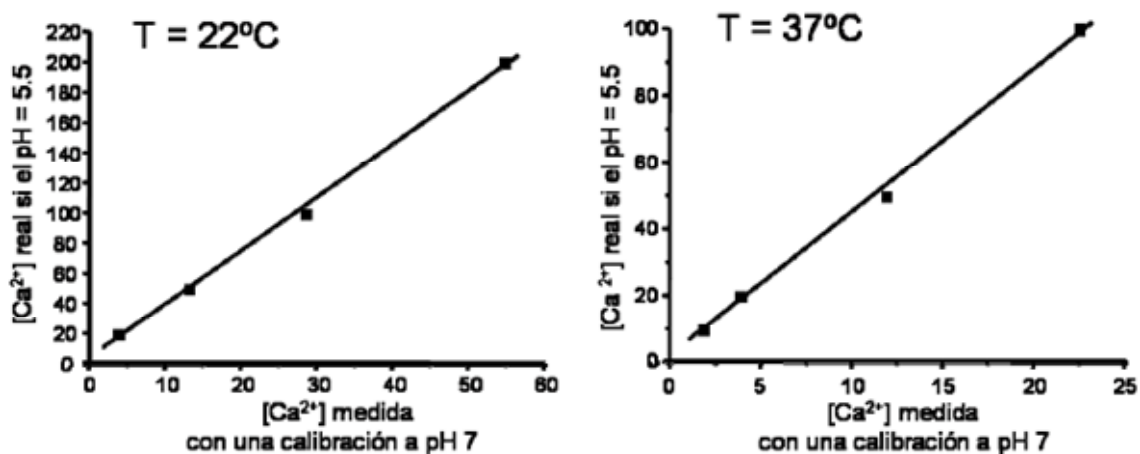
AEQ	Celenteracina	Temperatura	$K_R$ ( $M^{-1}$ )	$K_{TR}$	$\lambda$ ( $s^{-1}$ )	$n$
Normal	<i>wt</i>	37°C	$4.810 \times 10^7$	$6.010 \times 10^2$	1.00	2.300
Mutada	<i>wt</i>	37°C	$2.280 \times 10^7$	$2.200 \times 10^4$	1.00	1.430
LeuAla	<i>i</i>	37°C	$1.979 \times 10^4$	$1.845 \times 10^4$	0.40	1.150
Normal	<i>wt</i>	22°C	$7.230 \times 10^6$	$1.200 \times 10^2$	1.00	2.990
Mutada	<i>wt</i>	22°C	$1.610 \times 10^7$	$2.200 \times 10^4$	1.00	1.430

**Tabla 2. Parámetros del algoritmo matemático de Allen et al. (1977), obtenidos a partir de curvas de calibración de las correspondientes aequorinas y celenteracinas usadas.** El parámetro  $n$  representa el grado de cooperatividad de unión de  $Ca^{2+}$  a los dominios *EF-Hand*, y el parámetro  $\lambda$  da cuenta de la velocidad máxima de consumo de la AEQ. Las constantes  $K_R$  y  $K_{TR}$  dan cuenta de la asociación de  $Ca^{2+}$  a la AEQ y la conformación de la misma para tal asociación.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Por otra parte, en el caso de los registros de luminiscencia efectuados con aequorinas dirigidas a los SG existe una subestimación de los valores de  $[Ca^{2+}]$  obtenidos con respecto a los reales. El pH vesicular es ácido acercándose a un valor promedio de 5,5 (Winker & Westead, 1980), y además, la luminiscencia de la AEQ decrece según lo hace el pH del entorno (Moisescu & Ashley, 1977). Afortunadamente, este medio ácido no tiene mayor efecto en la funcionalidad de la AEQ y, por tanto, los cambios de luminiscencia de la AEQ solo se deben a cambios en la  $[Ca^{2+}]$  intragranular, aparte de un desplazamiento lineal de los valores absolutos de  $Ca^{2+}$  medidos (SantoDomingo et al., 2008).

La calibración de la sonda de AEQ a pH 7,0 y 5,5 realizada en este laboratorio, permitió establecer una correlación de la  $[Ca^{2+}]$  medida a ambos valores de pH. Se observó una variación prácticamente lineal siendo los valores reales de  $[Ca^{2+}]$  a pH 5,5 entre 3-4 veces superiores a los estimados con la calibración realizada a pH 7,0 y a cualquiera de las dos temperaturas de trabajo utilizadas más comúnmente (37°C y 22°C) (**Fig. 18**). Bajo este supuesto los valores de la  $[Ca^{2+}]$  intragranular calculados en el presente trabajo aparecerán ya multiplicados por un factor de 3,5 realizando así la estimación de los valores reales existentes.



**Fig. 18.** Comparación de las calibraciones de la aequorina mutada reconstituida con celenteracina *wt* a pH 7,0 y 5,5. Las gráficas muestran la correlación entre las calibraciones de la aequorina mutada reconstituida con celenteracina *wt* a pH 7,0 y pH 5,5 a las diferentes temperaturas de trabajo. Existe dependencia lineal con unas diferencias de 3-4 veces entre los valores de  $[Ca^{2+}]$  calculados y los reales (SantoDomingo et al., 2008).

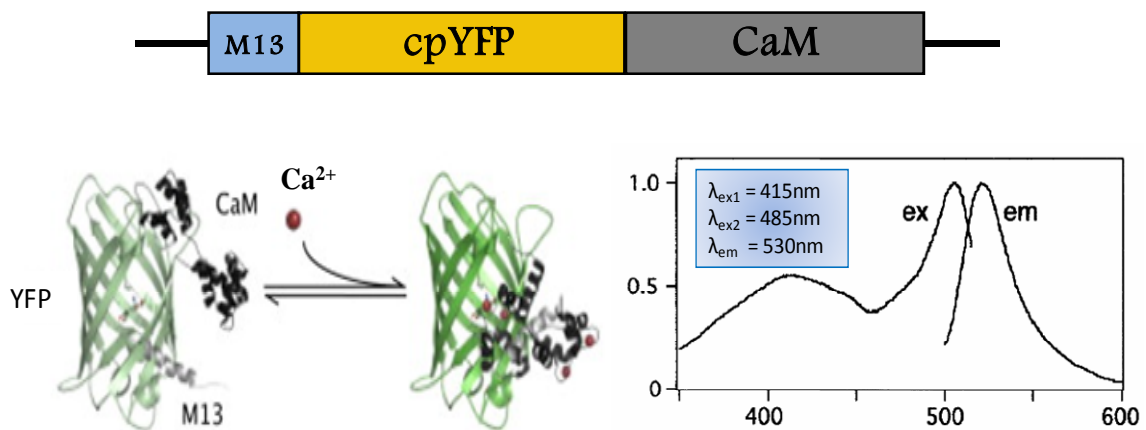
## 5. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO EN CÉLULA ÚNICA. SONDAS DE PERICAM Y GECO.

### 5.1 Descripción de las sondas de calcio Pericam y GECO.

Las medidas de  $\text{Ca}^{2+}$  en célula única mediante fluorescencia realizadas en los experimentos del presente trabajo se llevaron a cabo gracias a las proteínas quiméricas Pericam ratiométrico y la familia de proteínas GECO (*Genetically Encoded  $\text{Ca}^{2+}$  indicators for Optical imaging*), variantes de la proteína GCaMP. De estas últimas se han utilizado concretamente *Red GECO1* (RGECO1) y los ratiométricos *blue-Green Emission ratiometric GECO1* (GEMGECO1) y *Green EXcitation ratiometric GECO1* (GEXGECO1). Todas ellas han sido sintetizadas mediante ingeniería genética.

Los distintos Pericams fueron sintetizados en 2001 por el grupo del Dr. Miyawaki. Estructuralmente, la secuencia codificante presenta tres regiones (**Fig. 19**) (Nagai et al., 2001). La primera es un residuo peptídico de 26 aminoácidos denominado M13, derivado de la región unión a calmodulina (CaM) de la quinasa de cadena ligera que se encuentra integrada en la miosina de músculo esquelético. La segunda se trata de la *circularly permuted Yellow Fluorescent Protein* (cp-YFP) y finalmente la secuencia de CaM del *Xenopus* responsable de la unión a  $\text{Ca}^{2+}$ . En presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  la CaM y el péptido M13 interactúan provocando un cambio de conformación en la cpYFP y de ahí la intensidad de fluorescencia emitida.

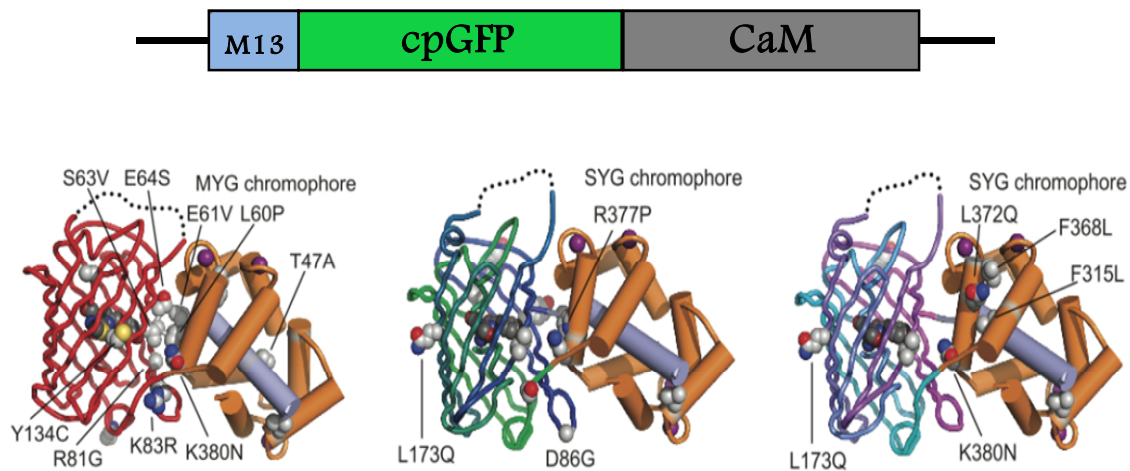
Mediante modificaciones en la secuencia genética se aumentó el rango dinámico de fluorescencia y finalmente se pudo conseguir un Pericam de doble excitación, ratiométrico (rtPericam). La sonda rtPericam presenta una constante de disociación ( $K_d$ ) de  $1,7\mu\text{M}$  (Palmer & Tsien, 2006) con excitación a 415nm y 494nm, ambas sensibles a  $\text{Ca}^{2+}$ , y emisión a 517nm. El hecho de poder realizar medidas ratiométricas de  $[\text{Ca}^{2+}]$  tiene la ventaja de que estas medidas eliminan muchos posibles “artefactos” de fluorescencia, no debidos a la propia medida de  $[\text{Ca}^{2+}]$ , que afectan por igual a ambas longitudes de onda.



**Fig. 19. Secuencia codificante, estructura y espectros de excitación y emisión del rtPericam.** Arriba de la figura se visualiza la secuencia de cDNA con las diferentes regiones (M13, cpYFP, y CaM). Abajo a la izquierda se observan estructuralmente los dominios proteicos que configuran la sonda rtPericam, así como el cambio conformacional en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . A la derecha se muestran los espectros de excitación y emisión con las longitudes de onda usadas en nuestro laboratorio (Nagai et al., 2001).

Por otra parte, en el año 2011 se presentaban unos nuevos indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescentes, los GECO, que pertenecen a la familia de proteínas GCaMP. Estructuralmente GCaMP es una quimera análoga a la sonda Pericam que presenta *circularly permuted Green Fluorescent Protein* (cp-GFP) en lugar de cp-YFP (Nakai et al., 2001). Su comportamiento es similar a Pericam, si bien presenta algunas desventajas frente a éste (sensibilidad frente a pH, plegamiento...) (Palmer & Tsien, 2006). Las siguientes modificaciones genéticas que se fueron realizando solventaron estas desventajas a la vez que se aumentaba el rango dinámico de fluorescencia llevando a la creación de la sonda GCaMP2 (Tallini et al., 2006) y finalmente GCaMP3 (Tian et al., 2009). Mediante un sistema de introducción de mutaciones al azar y selección de las colonias más fluorescentes frente a un entorno en presencia o ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  se generaron los GECO (Zhao et al., 2011). Dentro de estos se obtuvo RGECO1 sustituyendo la cpGFP por una variante cpmApple (sonda roja). Finalmente por recombinación entre mutaciones de GGECO1 (Verde) y BGECO1 (Azul), los ratiométricos de doble emisión GEMGECO1 y excitación GEXGECO1 (**Fig. 20**). La sonda RGECO1 presenta una  $K_d$  de 482nM con excitación a 562nm y emisión a 624nm. Las sondas GEMGECO1 y GEXGECO1, por su parte, poseen  $K_d$  de 340nM y 318nM respectivamente. La sonda GEMGECO1 se excita a 377nm con dos longitudes de emisión a 447nm y 520nm.

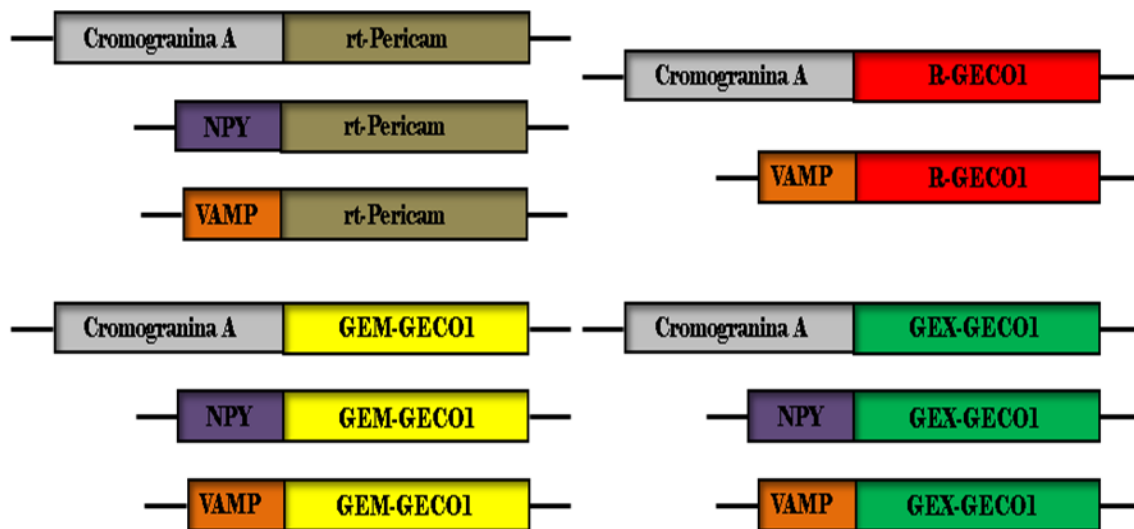




**Fig. 20. Representación esquemática de GCaMP y sus variantes GECO.** Se muestra arriba la secuencia codificante de GCaMP con las diferentes regiones (M13, cpYFP, y CaM). Abajo, la estructura proteica de las sondas RGECO1 (izquierda), GEMGECO1 (centro), y GEXGECO1 (derecha), donde se muestran los diferentes dominios proteicos (Zhao et al., 2011).

La sonda GEXGECO tiene dos longitudes de excitación a 475nm y 365nm con emisión a 520nm. Tanto las longitudes de emisión en GEMGECO1 como de excitación en GEXGECO1 son sensibles a  $Ca^{2+}$ . Ciertas longitudes de onda se encuentran próximas al UV así que ambas sondas ratiométricas pueden presentar un moderado fotoblanqueo y cierta fototoxicidad. No obstante, suponen una ventaja con respecto a la sonda rtPericam ya que poseen un mayor rango dinámico en la medida de  $[Ca^{2+}]$ , así como menor sensibilidad al pH. Además, el hecho de existir varios cromóforos permite obtener registros de  $Ca^{2+}$  simultáneos en varios compartimentos celulares.

En el presente trabajo se han usado sondas de rtPericam y GECO dirigidas a los SG tanto con anclaje en la membrana granular, mediante la señal de VAMP como en la matriz densa a través de las señales de CgA y NPY (**Fig. 21**). Por tanto VAMP-rtPericam, VAMP-RGECO1, VAMP-GEMGECO1 y VAMP-GEXGECO1 se quedarían ancladas a la membrana granular y finalmente a la membrana plasmática, con la sonda de  $Ca^{2+}$  correspondiente en el lado extracelular, tras la fusión vesicular en la exocitosis. Las sondas con la señal CgA (CgA-rtPericam, CgA-RGECO1, CgA-GEMGECO1 y CgA-GEXGECO1) y con la señal NPY (NPY-rtPericam, NPY-GEMGECO1 y NPY-GEXGECO1), por el contrario, se liberarían al medio extracelular durante la exocitosis.



**Fig. 21.** Esquema de las diferentes sondas fluorescentes de rtPericam y los GECO, R-GECO1, y GEMGECO1 y GEXGECO1 utilizadas en el presente trabajo. Se muestran las diferentes secuencias codificantes de las sondas fluorescentes, dirigidas tanto a la matriz (NPY y CgA) como a la parte interna de la membrana (VAMP) de los SG.

## 5.2 Protocolo de imagen por microscopía confocal.

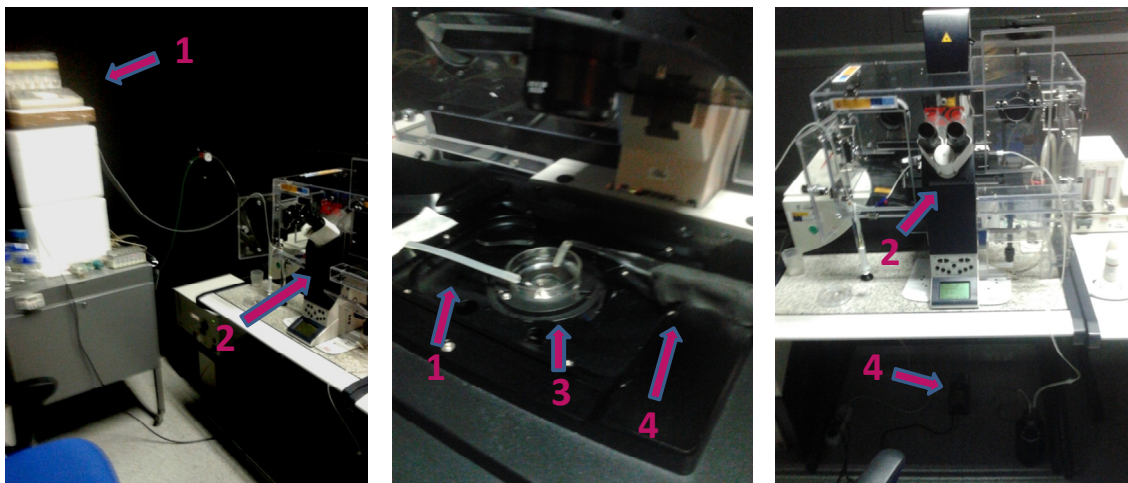
Las **imágenes** de células PC12, INS-1 e INS-1E, tanto marcadas con colorantes como expresando constructos basados en GFP y sondas de  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescentes fueron obtenidas mediante un microscopio confocal Leica TCS SP2, o bien un microscopio confocal Leica TCS SP5, utilizando en ambos un objetivo 63x con aceite de inmersión.

Mediante el microscopio confocal Leica TCS SP2 se tomaron imágenes celulares expresando constructos basados en la proteína GFP (mit-EGFP para la localización en la mitocondria, y VAMP-EGFP, CgA-EGFP y NPY-EGFP para la localización en los SG) la cual se excitó a 488nm mediante láser de Argon con emisión de fluorescencia recogida entre 500-600nm. En otro conjunto de experimentos las células PC12 que expresaban NPY-EGFP se cargaron simultáneamente con el marcador de mitocondrias MitoTracker Deep Red. La carga se realizó incubando las células en una solución extracelular  $\text{Ca}^{2+}$  1mM suplementada con MitoTracker Deep Red 50nM, durante 1-2 minutos a temperatura ambiente, evitando acumulaciones inespecíficas del colorante.

Inmediatamente después de la carga las células se observaron de forma secuencial para NPY-EGFP y para MitoTracker Deep Red, excitando este último a una longitud de onda de 633nm mediante láser de Diodo Rojo y recogiendo la emisión entre 650-750nm. Por otra parte tanto en las imágenes obtenidas con sondas de rtPericam (VAMP-rtPericam, CgA-rtPericam y NPY-rtPericam) como en las generadas a partir de GEXGECO1 (VAMP-GEXGECO1, CgA-GEXGECO1 y NPY-GEXGECO1) se realizó únicamente excitación a la longitud de onda de 488nm igualmente mediante láser de Argon, recogiendo la emisión entre 500-600nm. Finalmente, en las imágenes tomadas con sondas de  $\text{Ca}^{2+}$  de RGECO1 (VAMP-RGECO1, y CgA-RGECO1) la excitación fue a 543nm mediante láser de He-Ne verde, recogiendo la fluorescencia de emisión entre 600-700nm.

El microscopio confocal Leica TCS SP5 permitió tomar imágenes celulares expresando sondas basadas en GEXGECO1 (VAMP-GEXGECO1, CgA-GEXGECO1 y NPY-GEXGECO1) con doble excitación a 408nm mediante diodo Azul y a 480nm mediante láser supercontinuo visible, con una emisión recogida entre 500-575nm. Se tomaron imágenes de células que expresan sondas de  $\text{Ca}^{2+}$  basadas en GEMGECO1 (VAMP-GEMGECO1, CgA-GEMGECO1 y NPY-GEMGECO1) con excitación a 408nm mediante diodo Azul, y emisiones de fluorescencia recogidas entre 430-480nm y 500-550nm. En todos los experimentos se tuvo especial cuidado en optimizar los parámetros de potencia del láser, ganancia, zoom, resolución y toma de imágenes entre otros, de cara a minimizar el fotoblanqueo de las sondas fluorescentes.

En ciertos experimentos se dispuso un sistema de perfusión de diferentes medios celulares. En el caso del microscopio confocal Leica TCS SP2 dicha perfusión se realizó por gravedad mediante un control por electro-válvulas con un flujo aproximado de 6-7mL/min. Se reguló la temperatura de los medios perfundidos por un calentador *on line* de Harvard Apparatus hasta un adaptador específico del propio microscopio que permite el recambio óptimo del medio en las placas de confocal donde se encuentran sembradas las células, con aspiración del medio sobrante mediante bomba de vacío. Para el microscopio confocal Leica TCS SP5 se diseñó un sistema similar como se describe en la **Fig. 22**.



**Fig. 22.** Sistema de perfusión de medios celulares adaptado al microscopio confocal Leica TCS SP5. En la figura se pueden observar los diferentes componentes: (1) Sistema de electro-válvulas para la perfusión de medios celulares. (2) Microscopio confocal. (3) Placas de los diferentes cultivos celulares. (4) Sistema de recogida de medios celulares por bomba de vacío.

Tanto las imágenes obtenidas como los registros realizados se visualizaron mediante el software *LCS* para el microscopio confocal Leica TCS SP2 y el software *LAS AF Lite* para el microscopio confocal Leica TCS SP5, ambos desarrollados por Leica. La deconvolución de las imágenes se realizó a través del programa *ImageJ* (Wayne Rasband; National Institutes of Health, Bethesda, USA) o bien *Confocal Uniovi ImageJ v1.5*, una compilación del programa *ImageJ* con una serie de funciones y “plugins” orientadas al trabajo con imágenes de microscopía confocal.

### 5.3 Procedimiento experimental de los registros de fluorescencia.

Para llevar a cabo los experimentos de fluorescencia se dispusieron placas de cultivo circulares de 35mm de diámetro con fondo de cristal de 14mm de diámetro sembradas con cultivos de células que expresaban las diferentes sondas diseñadas con los GECO. Las medidas de  $[Ca^{2+}]$  se realizaron a las 48-72 horas después de la transfección, periodo durante el cual se obtuvieron mejores resultados de expresión de las sondas. Tal como se detalla en el apartado anterior, unos experimentos se realizaron en el microscopio confocal Leica TCS SP2 y otros en el microscopio confocal Leica TCS SP5.

En el microscopio confocal Leica TCS SP2 se realizaron registros de  $\text{Ca}^{2+}$  con VAMP-GEXGECO1 y VAMP-RGECO1. Las células PC12 que expresaban VAMP-RGECO1 fueron incubadas en medio de cultivo suplementado con glicerol al 5%(v/v), 24 horas antes del experimento. La adición del glicerol se realizó con el objeto de mejorar la distribución y localización celular de las respectivas sondas de  $\text{Ca}^{2+}$  (Sato et al., 1996). Se procedió posteriormente al lavado *off-line* con medio extracelular  $\text{Ca}^{2+}$  1mM y se dispusieron en el adaptador perfundiendo el mismo medio a temperatura ambiente controlada de 22°C. Se seleccionó un conjunto de células o bien una única célula idónea, que presentase buen patrón granular con expresión de la sonda en la parte externa de la membrana plásmatica y, a continuación, se inició el registro perfundiendo diferentes medios extracelulares.

Por su parte, en el microscopio confocal Leica TCS SP5 se realizaron registros de  $\text{Ca}^{2+}$  con VAMP-GEMGECO1, NPY-GEMGECO1 y VAMP-GEXGECO1. Las células PC12 e INS-1 que expresaban VAMP-GEMGECO1 fueron incubadas, bien en medio de cultivo suplementado con glicerol al 5%(v/v) 24 horas antes del experimento, o bien se dispusieron sin el tratamiento con glicerol. En el caso de células PC12 e INS-1 que expresaban VAMP-GEXGECO1 o NPY-GEMGECO1 no hubo tratamiento previo con glicerol.

En un conjunto de experimentos las células fueron lavadas con medio extracelular  $\text{Ca}^{2+}$  1mM y se dispusieron en el sistema de perfusión a temperatura ambiente perfundiendo diferentes medios extracelulares con diversos agonistas. En otro grupo de experimentos las células se depletaron de  $\text{Ca}^{2+}$  previamente por incubación durante 10 minutos con medio extracelular libre de  $\text{Ca}^{2+}$  suplementado con ionomicina 10 $\mu$ M, monensina 10 $\mu$ M, y BHQ 10 $\mu$ M. Tras ese periodo fueron lavadas dos veces con medio extracelular libre de  $\text{Ca}^{2+}$  y se las dispuso en la perfusión con el mismo medio, en presencia o ausencia de BHQ 10 $\mu$ M según el tipo de experimento. En ambos casos, se seleccionó un conjunto de células o bien una única célula idónea, que presentase buen patrón granular, y se realizaron registros de imágenes simultáneas para cada longitud de onda y tiempo determinados.

### 5.4 Representación de datos de los registros de fluorescencia.

Tras obtener los registros de imágenes de fluorescencia de los experimentos con perfusión, se seleccionaron regiones de interés en las células obteniendo así un espectro de intensidades de fluorescencia en la región seleccionada.

Para los experimentos con la sonda de  $\text{Ca}^{2+}$  VAMP-RGECO1, estos datos gráficos fueron representados directamente como intensidad de fluorescencia normalizada ( $F/F_0$ ), donde  $F_0$  y  $F$  representan la fluorescencia media al principio ( $F_0$ ) y en cada punto temporal ( $F$ ) del experimento, respectivamente. En el caso de los experimentos con las sondas ratiométricas de GEMGECO1 y GEXGECO1, se realizó el cociente de ambas representándose como el ratio de intensidades de fluorescencia normalizada ( $R/R_0$ ), tanto de emisión ( $R_{EM}$ ) como de excitación ( $R_{EX}$ ), definiendo  $R_0$  y  $R$  como el ratio medio al principio ( $R_0$ ) y en cada punto temporal ( $R$ ) del experimento.

$$R_{EM} = \frac{F_{455}^{EM}}{F_{525}^{EM}} \qquad R_{EX} = \frac{F_{455}^{EX}}{F_{405}^{EX}}$$

$F^{EM}$  y  $F^{EX}$  representan la variación de intensidad de fluorescencia emitida, recogida a una longitud de onda determinada, y de intensidad de fluorescencia de excitación respectivamente, en función de la interacción con  $\text{Ca}^{2+}$ . Tanto en los registros con la sonda de RGECO1 como las ratiométricas GEMGECO1 y GEXGECO1 se les restó previamente la señal basal correspondiente a los registros de cada una de la longitudes de onda.

## 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.

---

Todos los análisis gráficos y estadísticos se realizaron con los programas *Origin7.0* y *Origin8.5* de OriginLab. Los datos fueron representados como media  $\pm$  error estandar. Las diferencia entre distintos grupos de análisis se calcularon mediante análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significación representado como \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,005$ .







# *RESULTADOS*

---



---

# 1. OBTENCIÓN Y DISTRIBUCIÓN CELULAR DE LAS SONDAS BIOLUMINISCENTES Y FLUORESCENTES.

---

## 1.1 Distribución celular de las sondas de aequorina CgA-mAEQ y VAMP-mAEQ en las líneas neurosecretoras PC12, INS-1 e INS-1E.

El estudio de la localización subcelular de las sondas CgA-mAEQ y VAMP-mAEQ en células secretoras ha sido abordado de dos formas diferentes. En primer lugar, mediante microscopía confocal se ha evaluado la distribución celular de los constructos CgA-EGFP y VAMP-EGFP. En segundo lugar, y como evidencia funcional de la distribución de las sondas CgA-mAEQ y VAMP-mAEQ, se recurrió a las características de luminiscencia emitida de la aequorina, en particular al denominado “consumo” de la sonda.

En cuanto a la primera cuestión, la localización vesicular de la sonda VAMP-mAEQ ya fue probada con anterioridad en nuestro laboratorio a través del análisis de células cromafines bovinas y PC12 que expresaban VAMP-EGFP (Moreno et al., 2005; SantoDomingo et al., 2008). Esta distribución granular también se evidenció en células PC12 que expresaban las sondas CgA-EGFP (Moreno et al., 2010). Por lo tanto, se decidió ampliar el estudio a otro tipo de líneas celulares como las derivadas de células  $\beta$ -pancreáticas de insulinoma de rata INS-1 e INS-1E. Las imágenes de células INS-1 e INS-1E expresando tanto VAMP-EGFP (**Fig. 23**), como CgA-EGFP (**Fig. 24**) también mostraron un patrón de distribución granular para ambos constructos.

En el caso de la expresión de VAMP-EGFP tanto en células INS-1 como en INS-1E se observó una fuerte señal en el contorno celular, sugiriendo que una porción significativa de VAMP-EGFP se localizaba en la membrana plasmática. Estos resultados obtenidos son consistentes con datos previos de nuestro laboratorio, así como de los publicados por otros autores.

## RESULTADOS

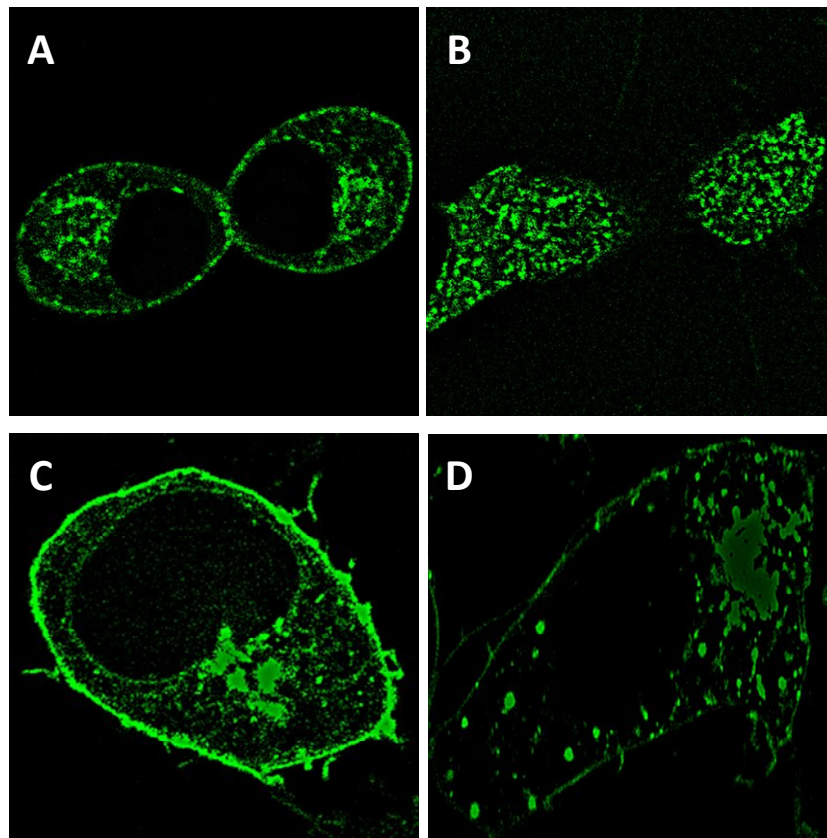
---

En cuanto a los patrones granulares, fueron similares a los obtenidos con otras quimeras que utilizan VAMP para la dirección a gránulos de secreción (SG), por ejemplo la proteína de fusión con una GFP sensible a pH (VAMP-pHlourin) en células INS-1 (Obermüller et al., 2005). Además, esta sonda colocaliza con los SG en otros tipos celulares como cromafines (Allersma et al., 2004) y células PC12 (Moreno et al., 2005). La localización de la sonda de  $\text{Ca}^{2+}$  VAMP-mAEQ en las vesículas de secreción se ha evidenciado mediante inmunofluorescencia y microscopía electrónica en células MIN-6, línea celular derivada de células  $\beta$ -pancreáticas de insulinoma de ratón (Mitchell et al., 2001) y en células de insulinoma de rata INS-1E (Iezzi et al., 2005).

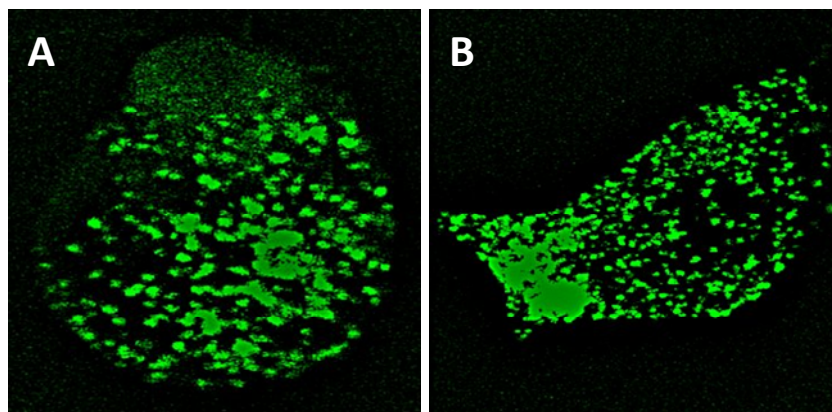
Por otra parte, los constructos CgA-EGFP (Kaether & Gerdes, 1995; Inomoto et al., 2007) y NPY-EGFP (Lang et al., 1997; Ravier et al., 2008) han sido comúnmente utilizados para visualizar los SG en diversos tipos celulares. Al igual que la sonda VAMP-mAEQ, la proteína de fusión de cromogranina A con la aequorina nativa (CgA-AEQ) fue localizada en los SG mediante inmunomicroscopía confocal en la línea celular PC12 (Mahapatra et al., 2004).

Abordando la segunda cuestión, estudios previos en este laboratorio con VAMP-mAEQ tanto en células cromafines (SantoDomingo et al., 2008) como PC12 (Moreno et al., 2005) estimaron que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  de los gránulos de secreción ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$ ) se sitúa en el rango de 10-100 $\mu\text{M}$ . Este hecho se vislumbró gracias a las diversas maniobras de reconstitución de la sonda con su grupo prostético, bien utilizando celenteracina nativa *wt*, o un derivado semi-sintético de baja afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  denominado celenteracina *n*.

En este rango de concentraciones el protocolo de reconstitución establecido como óptimo comienza por el vaciamiento de los SG mediante un tratamiento con BHQ (inhibidor reversible de la SERCA), ionomicina (ionóforo que intercambia  $\text{H}^+$  por  $\text{Ca}^{2+}$ ), y monensina (ionóforo que intercambia  $\text{Na}^+$  por  $\text{H}^+$ ) y prosigue mediante reconstitución de la sonda con celenteracina *wt*, en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, lo que permite monitorizar la dinámica de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$  con una mayor sensibilidad.



**Fig. 23. Localización de VAMP-EGFP mediante microscopía confocal de fluorescencia en células INS-1 e INS-1E.** Las células INS-1 e INS-1E expresando el constructo VAMP-EGFP fueron excitadas con un haz láser utilizando la línea de 488nm del Ar. La fluorescencia emitida se recogió entre 500-600nm. Los paneles superiores muestran dos planos confocales diferentes de unas células INS-1 (A y B). Los paneles inferiores muestran dos planos confocales de dos células INS-1E diferentes (C y D). Las imágenes fueron tomadas 48-72 horas después de la transfección.



**Fig. 24. Localización de CgA-EGFP mediante microscopía confocal de fluorescencia en células INS-1 e INS-1E.** Las células INS-1 e INS-1E expresando el constructo CgA-EGFP fueron excitadas con un haz láser utilizando la línea de 488nm del Ar. La fluorescencia emitida se recogió entre 500-600nm. Se muestran los planos confocales de dos células INS-1 (A) y INS-1E (B) respectivamente. Las imágenes fueron tomadas 48-72 horas después de la transfección.

## RESULTADOS

---

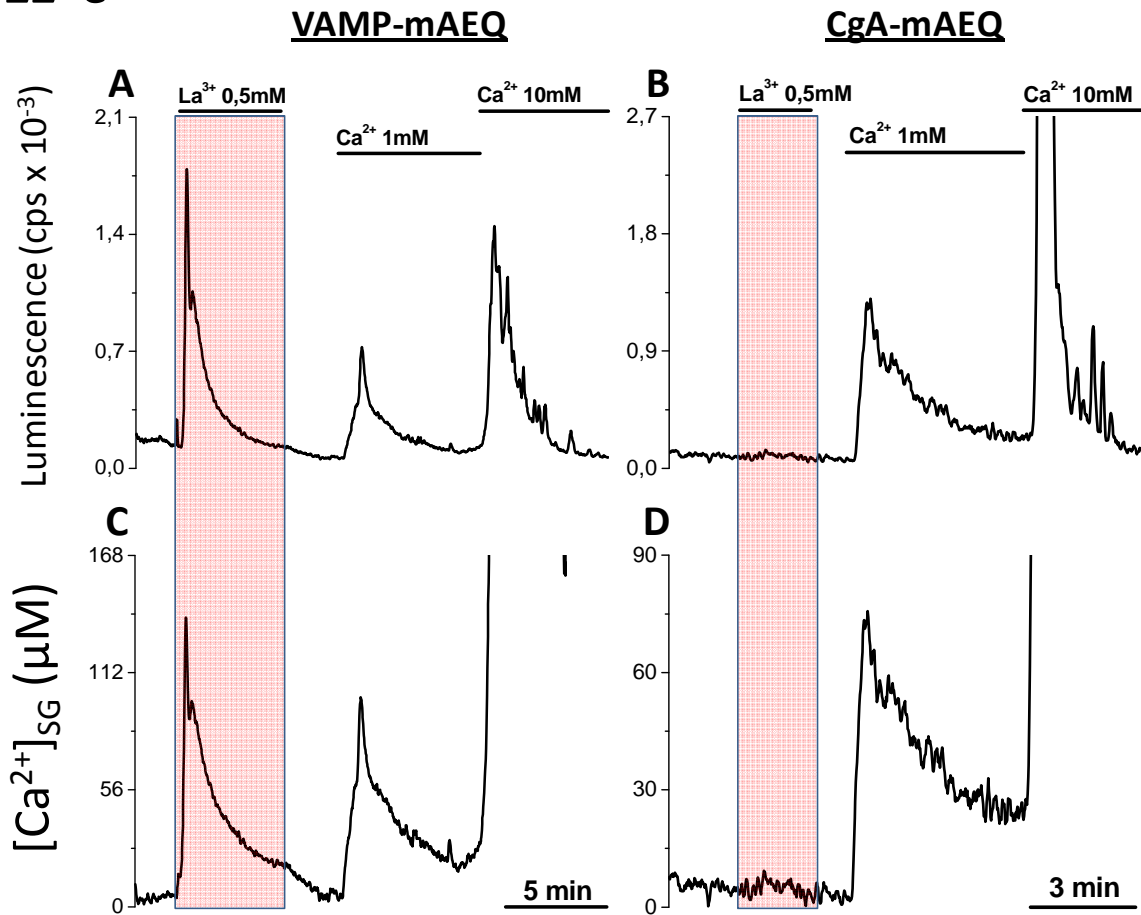
Además bajar la temperatura de trabajo a 22°C reduce aún más el consumo de la sonda, alargando el tiempo de experimentación.

En un principio, los experimentos llevados a cabo con la sonda VAMP-mAEQ mostraron una distribución heterogénea del  $\text{Ca}^{2+}$  en dos compartimentos mayoritariamente. Uno de ellos son los propios SG y el otro corresponde al lado extracelular de la membrana plasmática como consecuencia de presencia de gránulos fusionados a ella. Este hecho se corroboró con las imágenes de microscopía confocal de células expresando VAMP-EGFP. Para eliminar la señal de la membrana plasmática se decidió dar un pulso breve de  $\text{La}^{3+}$  previamente al registro de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$ . El ion  $\text{La}^{3+}$  no penetra en las células, pero sí induce la luminiscencia de la aequorina. De esta forma, se puede consumir la sonda VAMP-mAEQ existente en la membrana plasmática sin afectar a la señal de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$ .

En los experimentos con la sonda de CgA-mAEQ, puesto que la cromogranina se expresa en la matriz densa de los SG, sería de esperar que el registro de  $[\text{Ca}^{2+}]$  fuese similar al obtenido con VAMP-mAEQ tras eliminar la interferencia de la señal de la membrana plasmática. En la **Fig. 25** se muestra como la perfusión del medio suplementado con  $\text{La}^{3+}$  desencadenó un pico en el registro de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$  en células PC12 que expresaban VAMP-mAEQ (**Fig. 25 A y C**), mientras que el pico no se observó en las células que expresaban CgA-mAEQ (**Fig. 25 B y D**). Tras la re-adición de  $\text{Ca}^{2+}$  el registro de captación es similar para ambos constructos, consistiendo en un pequeño pico que decrece hasta un nivel estacionario de  $[\text{Ca}^{2+}]$ .

Se puede por tanto, concluir que la sonda CgA-mAEQ se localiza en el interior de los SG. Además, la utilización de la sonda CgA-mAEQ supone una importante ventaja experimental ya que elimina la necesidad de realizar el pulso previo de  $\text{La}^{3+}$ . Los valores de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$  presentados en la **Fig. 25**, así como los que se mostrarán de ahora en adelante en los registros con sondas de aequorina tienen aplicada la corrección de pH ácido vesicular que ha sido mencionada con anterioridad (ver Materiales y Métodos).

22°C



**Fig. 25.** Comparación de los registros de  $[Ca^{2+}]$  basal en gránulos de secreción de línea celular PC12 depletadas de  $Ca^{2+}$ , medidos con las sondas VAMP-mAEQ y CgA-mAEQ. Las células PC12 expresando los constructos VAMP-mAEQ (A y C) y CgA-mAEQ (B y D) fueron depletadas de  $Ca^{2+}$  y reconstituidas con celenteracina *wt* según el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Inicialmente, la luminiscencia se monitorizó bajo perfusión continua con un medio libre de  $Ca^{2+}$ . A continuación, se perfundió un medio extracelular estándar conteniendo  $La^{3+}$  0,5mM, liberando así la posible luminiscencia de la sonda presente en la membrana plasmática y posteriormente se perfundió medio externo estándar  $Ca^{2+}$  1mM según se indica en la figura. Finalmente, se perfundió un medio de  $Ca^{2+}$  10mM suplementado con digitonina 100 $\mu$ M para cuantificar la luminiscencia restante de la sonda. Los paneles superiores A y B muestran los registros de luminiscencia y los inferiores C y D sus correspondientes valores de  $[Ca^{2+}]$  tras la calibración. Todos los registros se realizaron a 22°C. Estos experimentos son representativos de 3-5 similares de cada tipo.

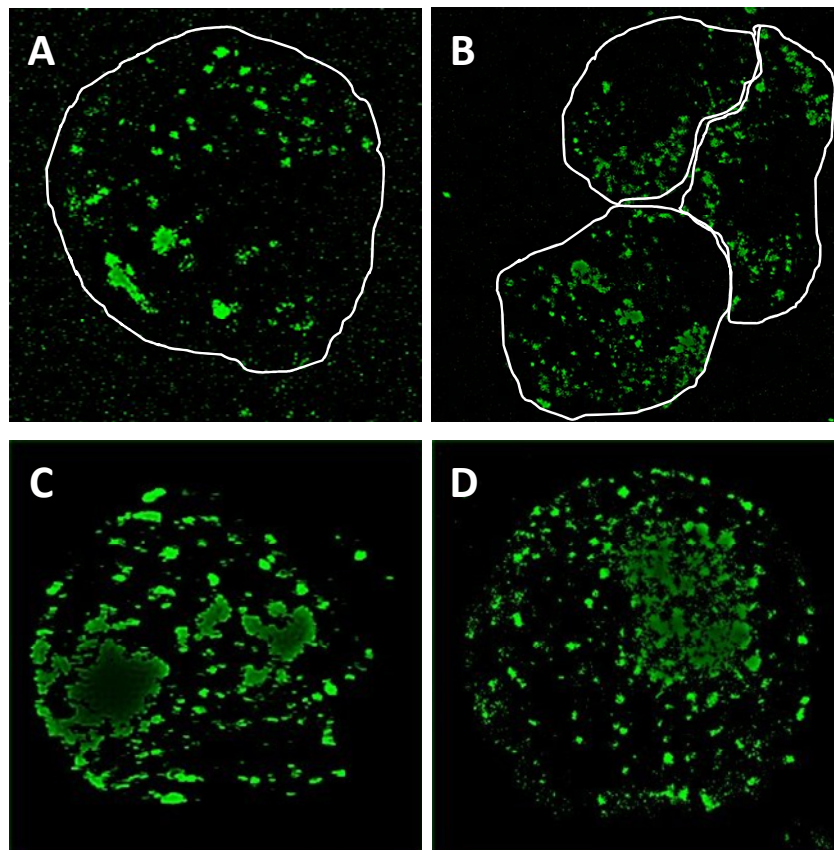
### 1.2 Distribución celular de las sondas de rtPericam y GECO dirigidas a gránulos de secreción en las líneas neurosecretoras PC12 e INS-1.

Para el estudio de la dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$  en vesículas de secreción en célula única se han diseñado constructos basados en la sonda de  $\text{Ca}^{2+}$  rtPericam (Nagai et al., 2001) y la familia de proteínas derivadas de la sonda de  $\text{Ca}^{2+}$  GCaMP, GECO (Zhao et al., 2011). En el apartado anterior se demostró la expresión y localización en los SG de las sondas de  $\text{Ca}^{2+}$  basadas en aequorina CgA-mAEQ y VAMP-mAEQ, así como su funcionalidad.

En cuanto a la expresión tanto de VAMP-rtPericam como de CgA-rtPericam en células PC12, las imágenes de microscopía confocal mostraron un patrón granular con una intensidad de señal observada muy baja y con una tasa de expresión mínima, si bien en principio dicho patrón granular era similar al obtenido en células PC12 transfectadas con VAMP-EGFP y CgA-EGFP (**Fig. 26**). Se realizaron diferentes maniobras con el fin de determinar si el origen de la fluorescencia era debido a la expresión de VAMP-rtPericam y CgA-rtPericam en los SG de células PC12 e INS-1.

En primer lugar, se probó la alcalinización con carbonilcianuro-p-trifluorometoxi fenilhidrazona (FCCP) que abole el gradiente protónico existente entre los SG y el citosol (Camacho et al., 2006). En segundo lugar se realizó la adición de Glicil-L-fenilalanina- $\beta$ -naftilamida (GPN), un péptido que permeabiliza selectivamente los lisosomas disipando así el gradiente de  $\text{H}^+$  existente y permitiendo el paso de compuestos de bajo peso molecular a través de la membrana de estos orgánulos (Haller et al., 1996; Moreno et al., 2010). En último lugar, se procedió a incubar las células PC12 e INS-1 expresando VAMP-rtPericam o CgA-rtPericam con Brefeldina A (BrA) 24-30 horas antes de realizar el experimento. La BrA inhibe el transporte de proteínas desde el retículo endoplásmico (ER) al complejo de Golgi (GC) indirectamente mediante la prevención de la formación de vesículas (Pahl & Baeuerle, 1995; Kober et al., 2012). En ninguno de los casos hubo respuesta alguna en la intensidad de fluorescencia descrita, concluyéndose que tanto VAMP-rtPericam como CgA-rtPericam no se expresan correctamente en los SG de células PC12 e INS-1, al menos bajo nuestras condiciones experimentales.



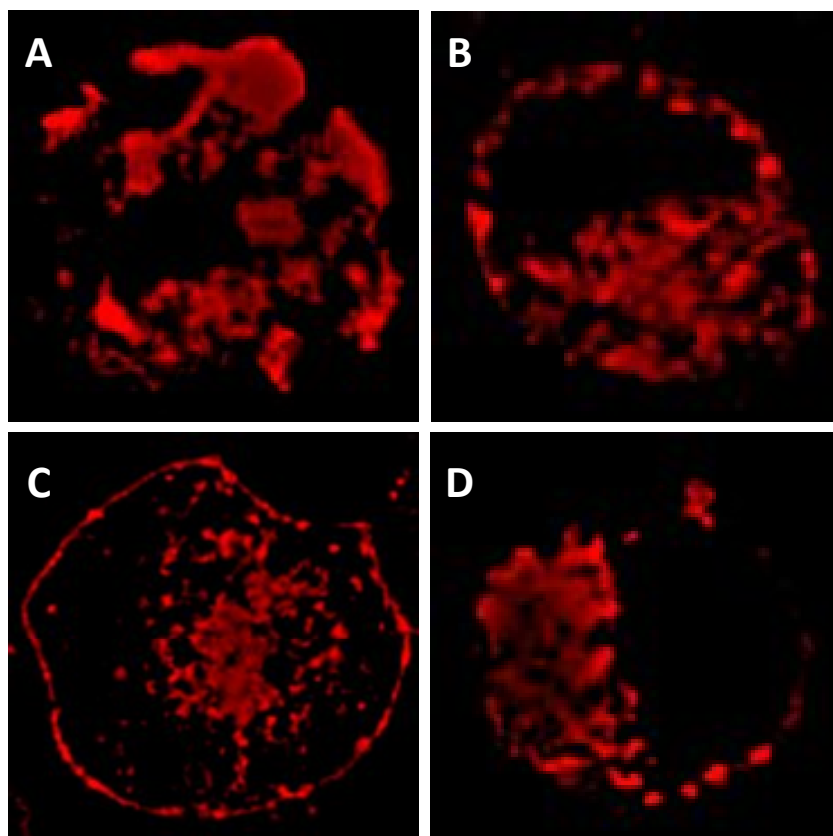


**Fig. 26. Localización mediante microscopía confocal de fluorescencia de VAMP-rtPericam y CgA-rtPericam frente a la distribución granular obtenida con VAMP-EGFP y CgA-EGFP en células PC12.** Las células PC12 expresando los constructos VAMP-rtPericam (A), CgA-rtPericam (B), VAMP-EGFP (C) y CgA-EGFP (D), fueron excitadas con un haz láser utilizando la línea de 488nm del Ar. La fluorescencia emitida se recogió entre 500-600nm. Las imágenes muestran planos confocales de una o varias células PC12 diferentes. En trazado blanco se delimita el contorno de las células correspondientes en el caso de la expresión con rtPericam. Las imágenes fueron tomadas 48 horas después de la transfección.

En vista de estos resultados se decidió pasar directamente al estudio de expresión y distribución en los SG de las sondas basadas en la familia de proteínas GECO. De la gama de sondas GECO disponibles se escogieron para el estudio el RGECO1, y los ratiométricos de doble emisión GEMGECO1 y de doble excitación GEXGECO1. Las imágenes de microscopía confocal de células PC12 expresando VAMP-RGECO1 mayoritariamente mostraron un patrón de distribución granular poco definido, sin ningún tipo de señal en la membrana plasmática, baja intensidad de fluorescencia y con una tasa de expresión del constructo pequeña (**Fig. 27 A**), si bien la alcalinización de los vesículas de secreción con FCCP desencadenó un aumento de dicha intensidad de fluorescencia.

## RESULTADOS

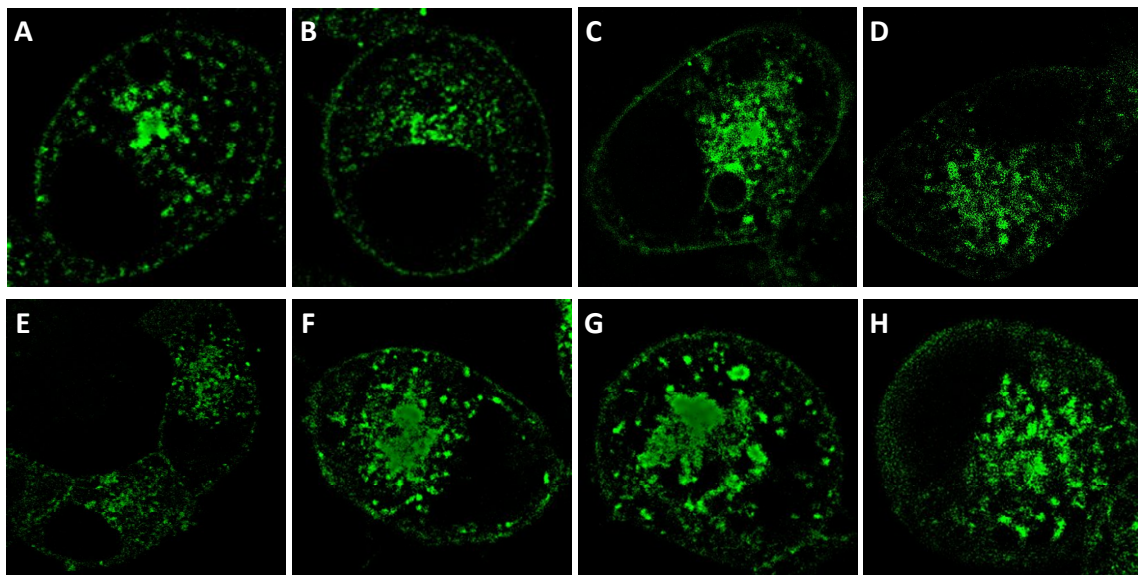
Con el fin de mejorar la expresión y distribución en los SG de la sonda, las células PC12 expresando VAMP-RGECO1 se incubaron en medio de cultivo suplementado con glicerol al 5%(v/v). En la literatura existen diversos trabajos donde se expone que el glicerol ayuda al empaquetamiento y procesamiento de proteínas a nivel celular (Sato et al., 1996; LaConte et al., 2014). Como se puede apreciar en las imágenes de confocal, conforme aumenta el tiempo de incubación de las células en medio con glicerol se observa un patrón de distribución granular más nítido, ya desde las 7-8 horas de incubación (**Fig. 27 B**). A las 24 horas de incubación las imágenes mostraron un patrón granular similar al descrito en células PC12 expresando VAMP-EGFP, con una fuerte localización de VAMP-RGECO1 en la membrana plasmática (**Fig. 27 C**).



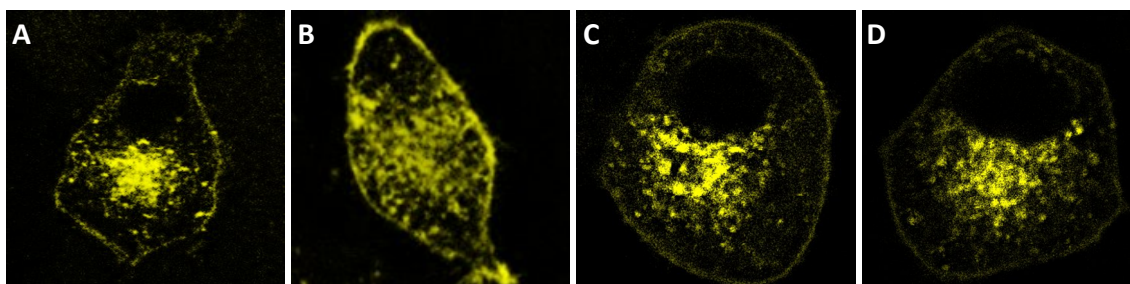
**Fig. 27. Efecto del glicerol sobre la distribución de VAMP-RGECO1 en gránulos de secreción de células PC12.** Las células PC12 expresando el constructo VAMP-RGECO1 fueron incubadas en medio de cultivo suplementado con glicerol al 5%(v/v) a las 24 horas previas al experimento. Las células se excitaron con un haz láser utilizando la línea de 543nm del He-Ne, recogiendo la fluorescencia emitida entre 600-700nm. Se muestran imágenes de células PC12 control (A), e incubadas con glicerol durante 7-8 horas (B) y 24 horas (C) respectivamente. Tras 24 horas de tratamiento con glicerol, se retiró el medio y los cultivos celulares se mantuvieron 8 horas adicionales de incubación en medio sin glicerol (D).

Este patrón de distribución granular revirtió a las 8 horas de suprimir el tratamiento con glicerol (**Fig. 27 D**). A partir de estos resultados todos los registros de fluorescencia con la sonda VAMP-RGECO1 se realizaron con el tratamiento de glicerol al 5%(v/v), 24 horas antes del experimento, tal y como se describe en Materiales y Métodos. En el caso de la expresión de CgA-RGECO1 en células PC12, al igual que ocurrió con la expresión de VAMP-rtPericam y CgA-rtPericam, no se observó patrón alguno de distribución granular, independientemente de que las células fueran o no tratadas previamente con glicerol.

Las imágenes de confocal de células PC12 expresando VAMP-GEMGECO1 (**Fig. 28**) y VAMP-GEXGECO1 (**Fig. 29**), muestran un patrón de distribución granular con una fuerte señal en la membrana plasmática y una buena expresión del constructo. En estos casos el tratamiento previo con glicerol no mejoró significativamente la expresión (**Fig. 28 E, F, G y H**), ni tampoco supuso una diferencia en el estudio posterior de la dinámica de  $Ca^{2+}$  vesicular con estas sondas.

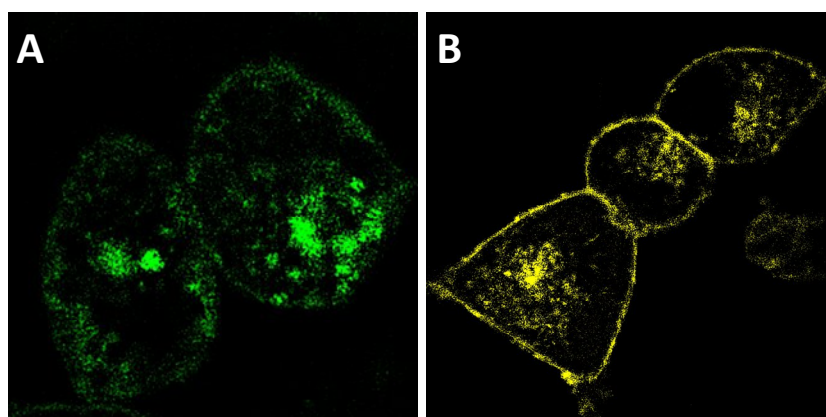


**Fig. 28. Localización mediante microscopía confocal de fluorescencia de VAMP-GEMGECO1 en células PC12.** Las células PC12 expresando el constructo VAMP-GEMGECO1 se excitaron con un haz láser utilizando la línea de 408nm del diodo azul, recogiendo la fluorescencia emitida entre 430-480nm y entre 500-550nm respectivamente, mostrándose solo la correspondiente a 500-550nm. Los paneles superiores (A-D) muestran 4 planos confocales de diferentes células PC12. En los paneles inferiores (E-H) las células fueron incubadas en medio de cultivo suplementado con glicerol al 5%(v/v) durante las 24 horas previas al experimento. Las imágenes fueron tomadas 48 horas después de la transfección.



**Fig. 29. Localización mediante microscopía confocal de fluorescencia de VAMP-GEXGECO1 en células PC12.** Las células PC12 expresando el constructo VAMP-GEXGECO1 se excitaron con un haz láser utilizando la línea de 405nm del diodo azul y a 480nm con el láser supercontinuo visible, o bien solamente utilizando la línea de 488nm del Ar. La fluorescencia emitida se recogió entre 500-575nm mostrándose solo la correspondiente a la excitación a 480-488nm. Se muestran 4 planos confocales de diferentes células PC12. Las imágenes fueron tomadas 48 horas después de la transfección.

Las imágenes de células INS-1 expresando VAMP-GEMGECO1 y VAMP-GEXGECO1 (**Fig. 30**) también mostraron un patrón de distribución granular y en la membrana plasmática similar al observado en células PC12. Sin embargo en ninguno de los casos se observó expresión de las sondas CgA-GEMGECO1 ni CgA-GEXGECO1 en ambos tipos celulares.



**Fig. 30. Localización mediante microscopía confocal de fluorescencia de VAMP-GEMGECO1 y VAMP-GEXGECO1 en células INS-1.** Las células INS-1 fueron transfectadas con los constructos VAMP-GEMGECO1 (A) y VAMP-GEXGECO1 (B), tomando imágenes a las 48 horas después. En el caso de VAMP-GEMGECO1 las células se excitaron con un haz láser utilizando la línea de 408nm del diodo azul, recogiendo la fluorescencia emitida entre 430-480nm y entre 500-550nm respectivamente, mostrándose solo la correspondiente a 500-550nm. En el caso de VAMP-GEXGECO1 las células se excitaron con un haz láser utilizando la línea de 405nm del diodo azul y a 480nm con el láser supercontinuo visible. La fluorescencia emitida se recogió entre 500-575nm mostrándose solo la correspondiente a la excitación a 480nm. Se muestran planos confocales de diferentes células INS-1.

### 1.3 Distribución celular de sondas luminiscentes y fluorescentes con la señal de localización del Neuropeptido Y (NPY).

Al igual que las sondas de  $\text{Ca}^{2+}$  con la secuencia de localización correspondiente a la Cromogranina A (CgA), se han diseñado sondas de  $\text{Ca}^{2+}$  dirigidas a la matriz de los SG a partir de la secuencia del Neuropeptido Y (NPY). En el apartado anterior ninguna de las sondas de  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescentes con CgA, tanto basadas en rtPericam como GECO, se expresaron en células PC12 e INS-1, al contrario que las sondas de  $\text{Ca}^{2+}$  basadas en EGFP o aequorina, CgA-EGFP y CgA-mAEQ.

Durante el estudio de la expresión de NPY-rtPericam en células PC12, las imágenes de confocal mostraron, sorprendentemente, una fuerte señal fluorescente en una pequeña parte de la población celular (**Fig. 31 A y B**). Sin embargo el patrón de distribución no pareció ser granular en ningún caso, sino más bien formar una red tubular similar al patrón de red mitocondrial obtenido en células PC12 expresando mit-EGFP (**Fig. 31 C y D**). Más aun, las imágenes de células PC12 expresando el constructo NPY-EGFP mostraron una población celular con el típico patrón de distribución granular, así como una pequeña pero no despreciable población que presentaba una posible localización mitocondrial de la sonda. Dicha distribución mitocondrial de la sonda NPY-EGFP se ha demostrado mediante la colocalización con el marcador de mitocondrias *MitoTracker Deep Red* (**Fig. 32**).

Profundizando sobre el tema, en la literatura se describe la existencia de una posible secuencia kozak de inicio de traducción, denominada *kozak-2*, dentro de la secuencia codificante del propio NPY humano. Esta señal de inicio de traducción generaría un pequeño péptido para la localización mitocondrial (Kaipio et al., 2005; Kaipio & Pesonen, 2009). Puesto que la posible expresión mitocondrial, incluso parcial, de las sondas de  $\text{Ca}^{2+}$  con NPY impediría el estudio de la dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular, tanto en población celular como en célula única, se optó por la eliminación de dicha secuencia *kozak-2*. Mediante mutagénesis dirigida se substituyó el residuo de metionina del codón de inicio de la secuencia por uno de valina, cambiando para ello la adenina por una guanina en la secuencia de DNA.



## RESULTADOS

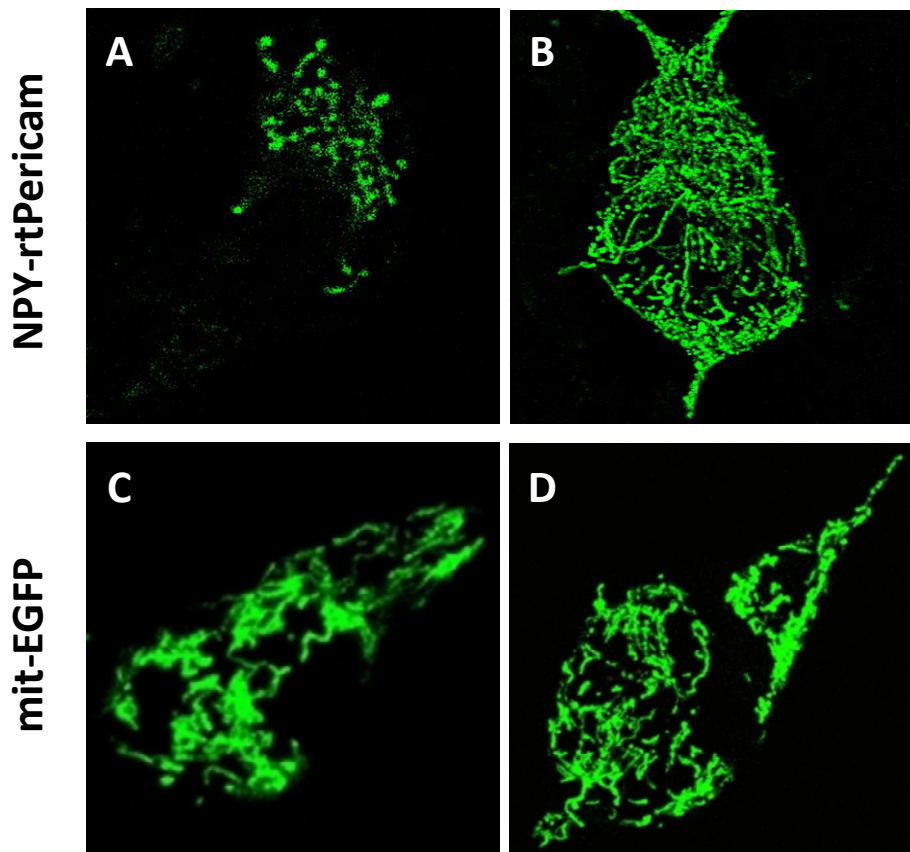
Se puede observar esquemáticamente tal sustitución en la secuencia de mRNA.

*Kozak-2*

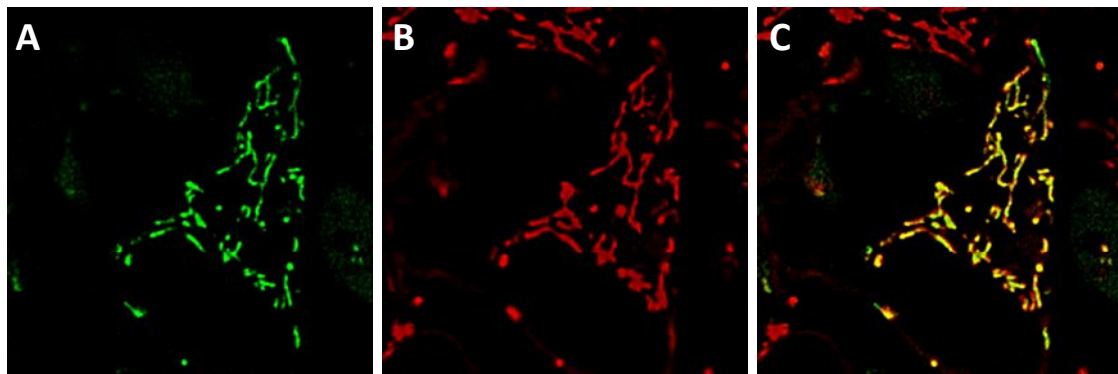
CCAGCG **GAGG ACAUGG**CCAG → CCAGCG **GAGG ACGUGG**CCAG

El oligonucleótido utilizado fue el mismo en todos los constructos realizados ya que solo afecta a la secuencia del propio NPY. En concreto fue el siguiente:

5'- CACCAGCGGAGGACGTGGCCAGATATCAC - 3'



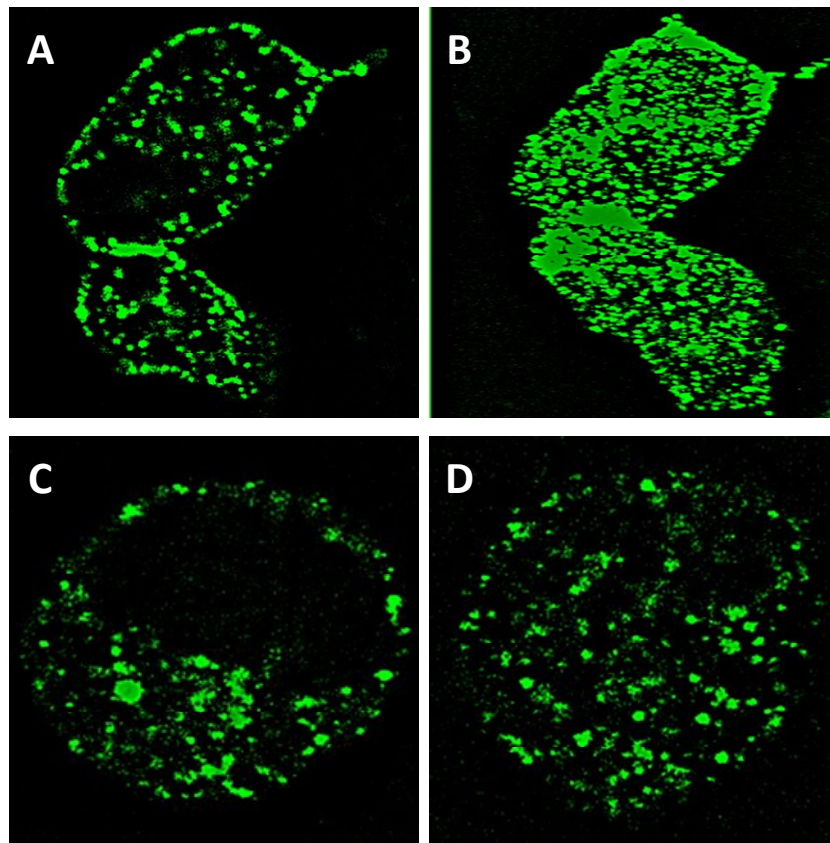
**Fig. 31. Localización mediante microscopía confocal de fluorescencia de NPY-rtPericam en células PC12.** Las células PC12 expresando tanto el constructo NPY-rtPericam (A y B) como el constructo mit-EGFP (C y D) fueron excitadas con un haz láser utilizando la línea de 488nm del Ar. La fluorescencia emitida se recogió entre 500-600nm. Se muestran planos confocales de células PC12 diferentes. Las imágenes fueron tomadas 48 horas después de la transfección.



**Fig. 32. Estudio de colocalización mediante microscopía confocal de fluorescencia de la sonda NPY-EGFP con el colorante MitoTracker Deep Red en células PC12.** Las células PC12 expresando el constructo NPY-EGFP fueron incubadas con el colorante MitoTracker Deep Red durante 1-2 minutos previos al experimento. Para la visualización del NPY-EGFP (Panel A) las células fueron excitadas con un haz láser utilizando la línea de 488nm del Ar, recogiendo la fluorescencia emitida entre 500-600nm. Para la visualización del MitoTracker Deep Red (Panel B) las células fueron excitadas a 633nm con el Diodo Rojo, recogiendo la fluorescencia emitida entre 650-750nm. En todos los casos se muestra el mismo plano confocal de una célula, observando la superposición de las dos fluorescencias en el panel C. Las imágenes fueron tomadas 48 horas después de la transfección.

Esta mutación se introdujo en las sondas de  $Ca^{2+}$  tanto basadas en aequorina (NPY-mAEQ) como basadas en rt-Pericam (NPY-rtPericam) y GECO (NPY-GEMGECO1 y NPY-GEXGECO1). De igual forma se introdujo en un nuevo constructo de NPY-EGFP. La eliminación de la señal *kozak-2* se verificó a través del análisis de secuencia de cada uno de los constructos generados, así como mediante imagen de microscopía confocal.

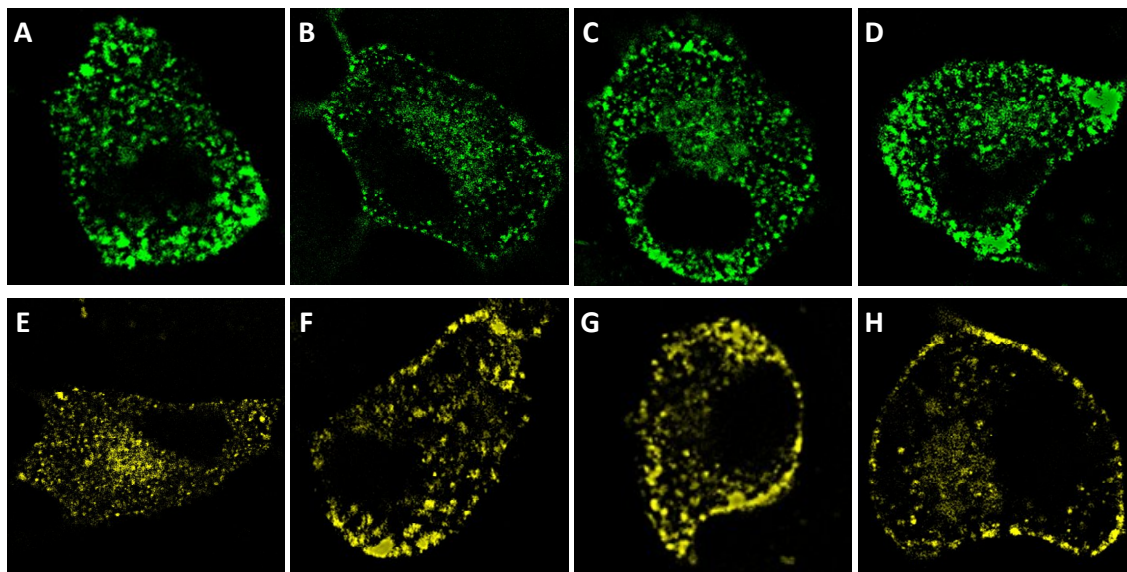
Las imágenes confocales de células INS-1 e INS-1E expresando el nuevo constructo NPY-EGFP (**Fig. 33**), mostraron un claro patrón de distribución granular, similar al observado previamente en nuestro laboratorio en células PC12 (Moreno et al., 2010) así como por otros autores, según se mencionó con anterioridad. Este hecho sugiere también que la sonda NPY-mAEQ debe localizarse adecuadamente en la matriz de los SG. Tanto EGFP como aequorina tienen tamaños similares y se asume habitualmente que su distribución intracelular es similar. Sin embargo, en el caso de la sonda NPY-rtPericam sin la secuencia de direccionamiento *kozak-2* expresada en células PC12 no se observó ningún tipo de expresión, granular o mitocondrial, lo que confirma que la expresión mitocondrial de dicha sonda se debía solamente a esa secuencia.



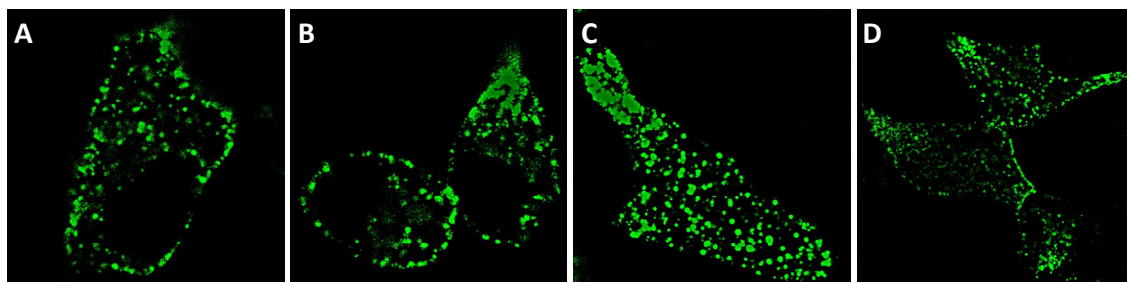
**Fig. 33. Localización de NPY-EGFP sin la secuencia *kozak-2* de direccionamiento a la mitocondria mediante microscopía confocal de fluorescencia en células INS-1 e INS-1E.** Las células INS-1 e INS-1E expresando el nuevo constructo NPY-EGFP, sin la secuencia *kozak-2* de direccionamiento a la mitocondria, fueron excitadas con un haz láser utilizando la línea de 488nm del Ar. La fluorescencia emitida se recogió entre 500-600nm. Los paneles superiores muestran un plano confocal (A) y la superposición de varios planos (B) respectivamente de dos células INS-1 diferentes (A y B). Los paneles inferiores muestran dos planos confocales de dos células INS-1E (C y D).

En cuanto a las imágenes de microscopía confocal de las células PC12 expresando NPY-GEMGECO1 y NPY-GEXGECO1 (**Fig. 34**), así como las células INS-1 expresando NPY-GEMGECO1 (**Fig. 35**) se mostraron patrones de distribución granular similares al obtenido con NPY-EGFP en estas mismas células, y con una buena tasa de expresión. Al igual que con la expresión de VAMP-GEMGECO1 y VAMP-GEXGECO1, el tratamiento previo con glicerol de las células PC12 e INS-1E expresando NPY-GEMGECO1 y NPY-GEXGECO1 no supuso una mejora significativa en la expresión granular de la sonda, ni ninguna diferencia funcional en el estudio posterior de la dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular con estas sondas.





**Fig. 34. Localización mediante microscopía confocal de fluorescencia de NPY-GEMGECO1 y NPY-GEXGECO1 en células PC12.** Las células PC12 fueron transfectadas con los constructos NPY-GEMGECO1 (A-D) y NPY-GEXGECO1 (E-H), ambos sin la secuencia *kozak-2* de direccionamiento a la mitocondria, tomando imágenes a las 48 horas después. En el caso de NPY-GEMGECO1 las células se excitaron con un haz láser utilizando la línea de 408nm del diodo azul, recogiendo la fluorescencia emitida entre 430-480nm y entre 500-550nm respectivamente, mostrándose solo la correspondiente a 500-550nm. En el caso de NPY-GEXGECO1 las células se excitaron con un haz láser utilizando la línea de 405nm del diodo azul y a 480nm con el láser supercontinuo visible. La fluorescencia emitida se recogió entre 500-575nm mostrándose solo la correspondiente a la excitación a 480nm. Se muestran planos focales de diferentes células PC12.



**Fig. 35. Localización mediante microscopía confocal de fluorescencia de NPY-GEMGECO1 en células INS-1.** Las células INS-1 expresando el constructo NPY-GEMGECO1, sin la secuencia *kozak-2* de direccionamiento a la mitocondria, se excitaron con un haz láser utilizando la línea de 408nm del diodo azul, recogiendo la fluorescencia emitida entre 430-480nm y entre 500-550nm respectivamente, mostrándose solo la correspondiente a 500-550nm. Se muestran planos focales de diferentes células INS-1. Las imágenes fueron tomadas 48 horas después de la transfección.

## 2. DINÁMICA DEL CALCIO EN GRÁNULOS DE SECRECIÓN EN LAS LINEAS NEUROENDOCRINAS PC12, INS-1 E INS-1E. REGISTROS EN POBLACIÓN CELULAR.

---

### 2.1 Mecanismos que participan en la captación de calcio en los gránulos de secreción.

Los mecanismos de acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en los SG son diversos y su relevancia ha dependido del tipo celular estudiado. En células MIN6 (Mitchell et al., 2001) se ha descrito que la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  tiene lugar a través de ATPasas de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo P insensibles a tapsigargina (SPCA), similares a las observadas en el GC (Vangheluwe et al., 2009). En células cromafines (SantoDomingo et al., 2008) la captación también se produce a través de bombas de  $\text{Ca}^{2+}$ , pero en este caso sensibles a tapsigargina y BHQ, por tanto similares a la SERCA del ER. La presencia de este sistema sensible a tapsigargina y BHQ se ha observado también en otros tipos celulares como PC12 e INS-1 (SantoDomingo et al., 2010). Otros sistemas de transporte alternativos descritos son los intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  y/o  $\text{Na}^+-\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Krieger-Brauer & Gratzl., 1998; Wegrzyn et al., 2010) e intercambiadores  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  que aprovechan la energía del gradiente de  $\text{H}^+$  para acumular  $\text{Ca}^{2+}$  (Goncalves et al., 2000).

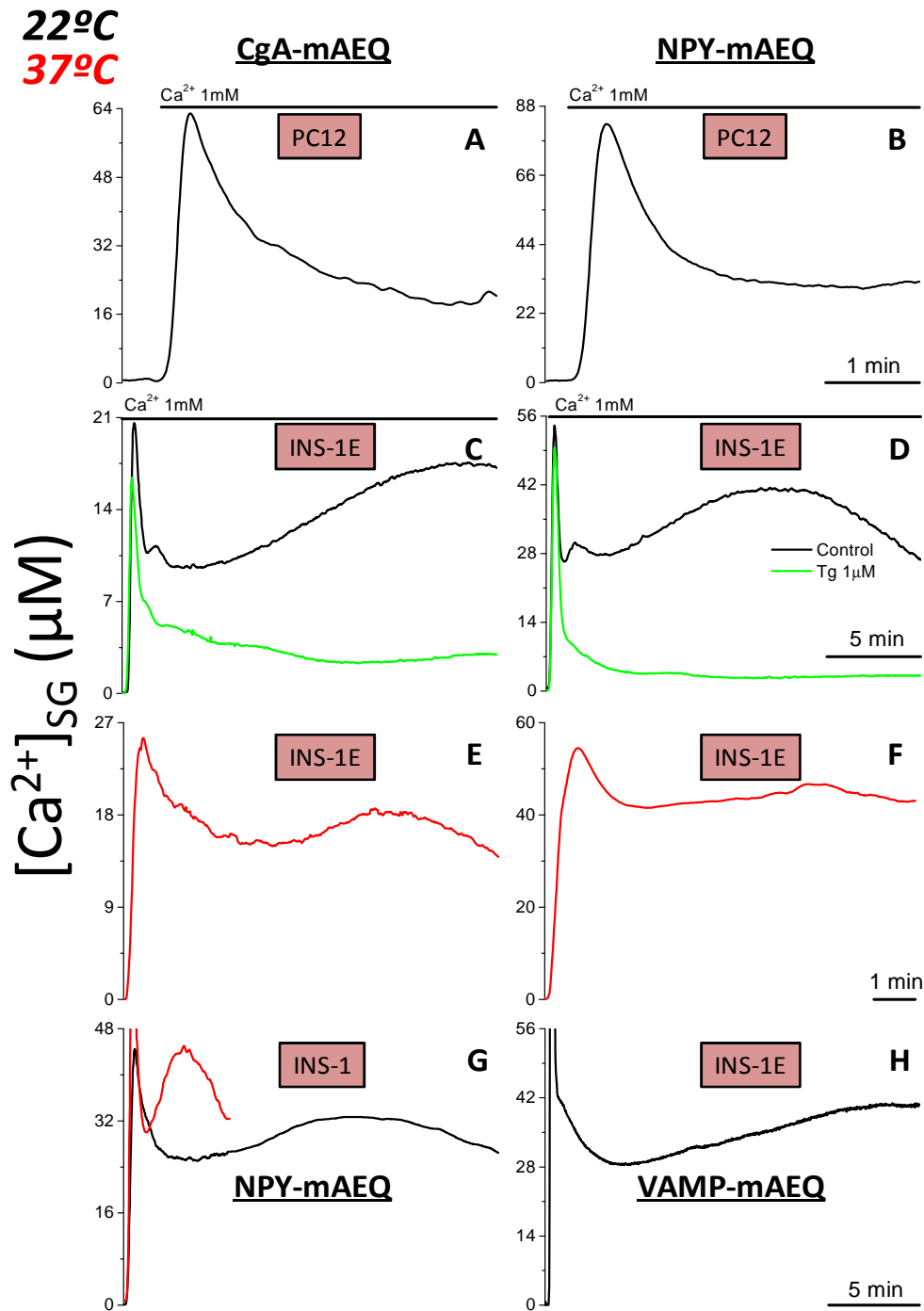
En este estudio se ha querido profundizar en las características de los sistemas de acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular en los tipos celulares PC12, INS-1 e INS-1E, aprovechando las ventajas que ofrecen las nuevas sondas de aequorina CgA-mAEQ y NPY-mAEQ, en particular el hecho de que tras la fusión de las vesículas con la membrana plasmática la sonda desaparece en el medio extracelular, al contrario de lo que ocurre con sondas como VAMP-mAEQ, que permanecen ancladas en la membrana plasmática e interfieren en la señal de luminiscencia granular (SantoDomingo et al., 2010).

Primeramente, se procedió a comparar la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  granular de los tipos celulares citados en células intactas.

Estos experimentos se han realizado siempre con células previamente depletadas de  $\text{Ca}^{2+}$ . En los registros a 22°C de células PC12, la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  al medio extracelular generó un pequeño pico de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$  que posteriormente disminuyó hasta alcanzar un nivel estacionario estable de  $[\text{Ca}^{2+}]$  en torno a 20-30 $\mu\text{M}$  (**Fig. 36 A y B**). Sin embargo en células INS-1E (**Fig. 36 C, D y H**), aunque los valores de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  fueron similares, la cinética resultó diferente, ya que tras el pico inicial apareció un hombro más lento antes de alcanzar la zona estacionaria.

La diferencia observada entre los registros realizados en los tipos celulares PC12 e INS-1E posiblemente pudo deberse a la diferencia de luminiscencia total emitida por la sonda de aequorina (ver Materiales y Métodos), siempre mucho mayor en el caso de las preparaciones de células INS-1E como consecuencia de una mejor expresión de la sonda en estas células. En vista de los resultados obtenidos en los registros de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$  en células INS-1E a 22°C, se decidió monitorizar la dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular a 37°C, condiciones más fisiológicas.

A 37°C el proceso de captación de  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular en células INS-1E transcurrió más rápidamente, alcanzándose enseguida el estado estacionario tras el pequeño pico inicial (**Fig. 36 E y F**). Comportamientos similares se apreciaron en la línea celular INS-1 comparando los registros a ambas temperaturas (**Fig. 36 G**). Los valores de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$  medidos con la sonda CgA-mAEQ fueron siempre inferiores a los obtenidos con la sonda NPY-mAEQ. Tomando el nivel estacionario de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$  en cada caso como medida, se obtuvieron en células PC12 valores en torno a 20 $\mu\text{M}$  (18,8 $\pm$ 1,3 $\mu\text{M}$ , media  $\pm$  error estándar, n=31) para CgA-mAEQ y 30-40 $\mu\text{M}$  (34,2 $\pm$ 4,8 $\mu\text{M}$ , media  $\pm$  error estándar, n=34) para NPY-mAEQ. En células INS-1E, tanto a 22°C como a 37°C, las diferencias fueron similares con valores en torno a 20 $\mu\text{M}$  (17,7 $\pm$ 0,6 $\mu\text{M}$ , media  $\pm$  error estándar, n=15, 22°C; 18,3 $\pm$ 1,1 $\mu\text{M}$ , n=15, 37°C) para CgA-mAEQ y 40 $\mu\text{M}$  (44,2 $\pm$ 1,7 $\mu\text{M}$ , media  $\pm$  error estándar, n=21, 22°C; 49,3 $\pm$ 1,6 $\mu\text{M}$ , n=26, 37°C) para NPY-mAEQ, siendo este último valor similar al obtenido en estas células con VAMP-mAEQ (**Fig. 36 H**) (41,1 $\pm$ 0,8 $\mu\text{M}$ , media  $\pm$  error estándar, n=4, 22°C) y en células INS-1 expresando NPY-mAEQ (40,9 $\pm$ 0,4 $\mu\text{M}$ , media  $\pm$  error estándar, n=6, 22°C; 44,0 $\pm$ 2,2 $\mu\text{M}$ , n=5, 37°C).



**Fig. 36. Medida de la  $[Ca^{2+}]_{SG}$  basal en gránulos de secreción de líneas celulares PC12, INS-1 e INS-1E con las sondas CgA-mAEQ, NPY-mAEQ y VAMP-mAEQ.** Las células PC12 e INS-1E expresando los constructos CgA-mAEQ (A, C y E) y NPY-mAEQ (B, D y F), y las células INS-1 expresando NPY-mAEQ (G) e INS-1E expresando VAMP-mAEQ (H) fueron depletadas de  $Ca^{2+}$  antes de la reconstitución, iniciando el registro de luminiscencia en medio libre de  $Ca^{2+}$ . A continuación, se perfundió medio externo estándar con  $Ca^{2+}$  1mM, como se indica en la figura. En el caso del registro con la sonda VAMP-AEQ (H), antes de añadir  $Ca^{2+}$  al medio externo se perfundió un medio extracelular estándar con  $La^{3+}$  0,5mM, liberando la luminiscencia de la sonda presente en la membrana plasmática (no mostrado). Los paneles A y B muestran registros de  $[Ca^{2+}]_{SG}$  en células PC12. Los paneles C, D, E, F y H muestran registros de  $[Ca^{2+}]_{SG}$  en células INS-1E. En los trazados verdes las células fueron tratadas con tapsigargina 1µM 5 minutos previos al inicio del registro (C y D). Los registros se realizaron a 22°C (negro) y a 37°C (rojo). En el panel G se aprecia la cinética de ambos registros para células INS-1. En el panel H se muestra un registro de  $[Ca^{2+}]_{SG}$  en células INS-1E expresando VAMP-mAEQ. Estos experimentos son representativos de 3-34 similares de cada tipo.

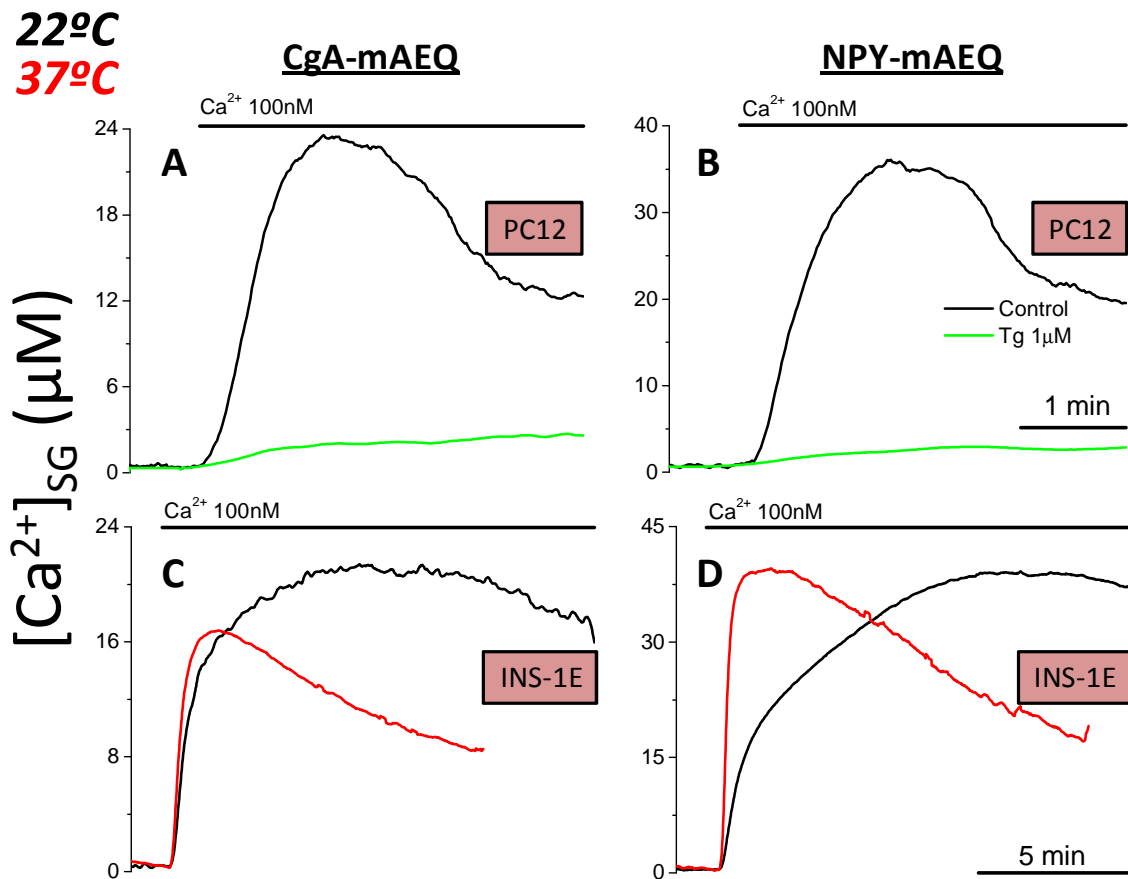
La diferencia entre estos valores puede deberse a cambios en la sensibilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  de la propia sonda CgA-mAEQ. Debido a la mayor  $[\text{Ca}^{2+}]$  medida, el consumo de la sonda en los experimentos con NPY-mAEQ llegó a ser un 60-80% mientras que con la sonda CgA-mAEQ fue solo en torno a 20-40% (datos no mostrados). Sin embargo los registros presentaron un comportamiento similar en términos de dinámica de los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  para ambas sondas. Puesto que la cromogranina A puede interactuar con  $\text{Ca}^{2+}$ , la expresión de CgA-mAEQ podría haber generado un “micro-entorno” donde la  $[\text{Ca}^{2+}]$  estuviera más tamponada. Alternativamente, interacciones entre la cromogranina, una proteína de elevado peso molecular y la AEQ podrían haber alterado la sensibilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  de la AEQ, generando las diferencias observadas. Dado su menor tamaño, esto es menos probable en el caso del NPY.

En células permeabilizadas la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular fue más homogénea, sin presentar el pico inicial y alcanzando directamente un nivel estacionario de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$ , que posteriormente decreció debido al consumo de aequorina. Este proceso de captación fue más rápido en células PC12 (**Fig. 37 A y B**) que en células INS-1E (**Fig. 37 C y D**) y en estas últimas más rápido a 37°C que a 22°C. Las diferencias de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$  en el nivel estacionario entre los registros de células PC12 con CgA-mAEQ ( $21,1 \pm 1,9 \mu\text{M}$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=22$ ) y NPY-mAEQ ( $29,9 \pm 1,9 \mu\text{M}$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=34$ ) fueron algo menores que en células intactas. En células INS-1E se observaron valores similares a los medidos en células intactas tanto para CgA-mAEQ ( $18,2 \pm 0,6 \mu\text{M}$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=8$ , **22°C**;  $18,5 \pm 1,1 \mu\text{M}$ ,  $n=10$ , **37°C**) como para NPY-mAEQ ( $43,1 \pm 2,7 \mu\text{M}$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=10$ , **22°C**;  $39,9 \pm 1,1 \mu\text{M}$ ,  $n=16$ , **37°C**).

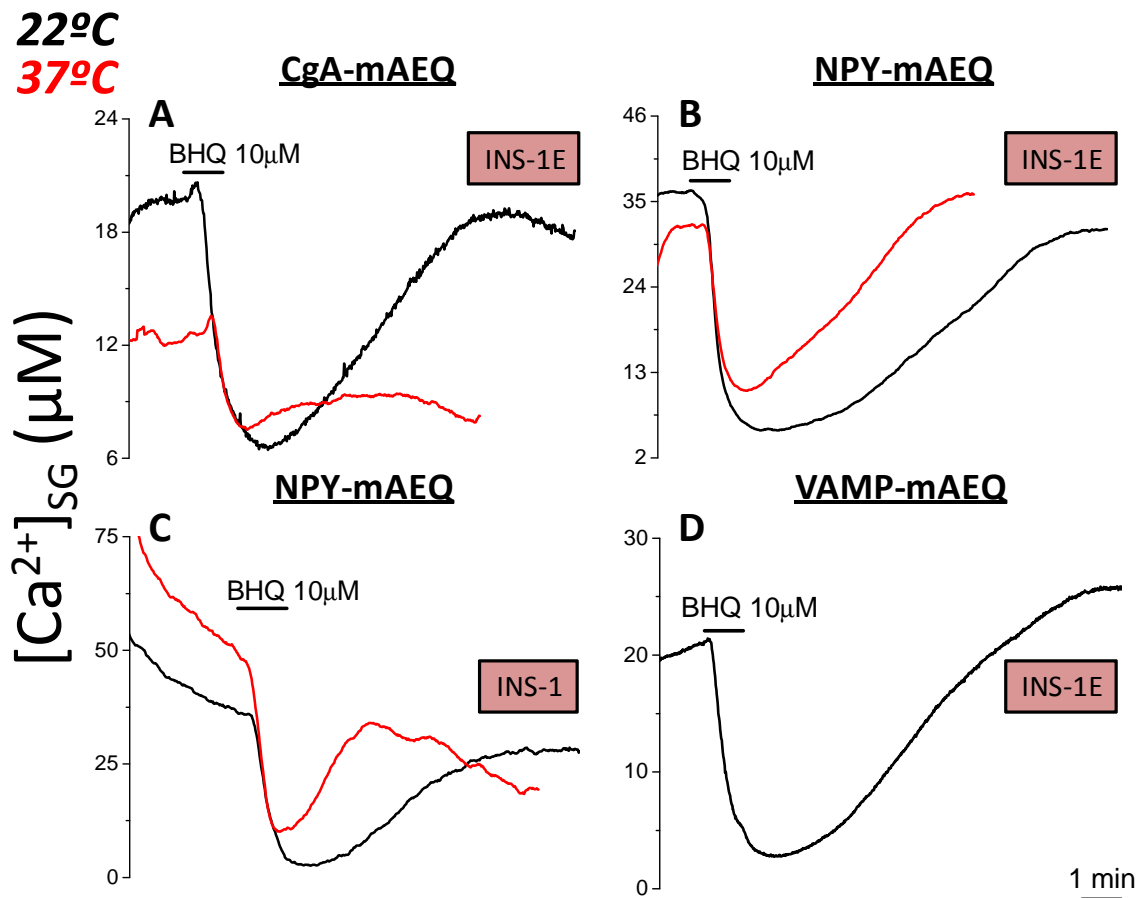
Estos procesos de captación de  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular podrían estar mediados por bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo SERCA, sensibles a tapsigargina y BHQ, por bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo SPCA insensibles a estos inhibidores, o por alguno de los sistemas de intercambio mencionados anteriormente. La incubación de las células con el inhibidor irreversible de la SERCA tapsigargina  $1 \mu\text{M}$ , 5 minutos antes del experimento, produjo una fuerte inhibición de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  tanto en células INS-1E (**Fig. 36 C y D**, trazado verde), como en células PC12 (**Fig. 37 A y B**, trazado verde).

## RESULTADOS

La captación de  $\text{Ca}^{2+}$  por los SG se redujo drásticamente tanto para células INS-1E (niveles estacionarios: CgA-mAEQ;  $2,7 \pm 0,2 \mu\text{M}$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=4$ ,  $22^\circ\text{C}$ ; NPY-mAEQ;  $2,5 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ,  $n=3$ ,  $22^\circ\text{C}$ ) como células PC12 (CgA-mAEQ;  $2,6 \pm 0,4 \mu\text{M}$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=3$ ; NPY-mAEQ;  $3,0 \pm 0,7 \mu\text{M}$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=3$ ). En base a la inhibición con taspigargina se determinó que la contribución de la captación vía SERCA se sitúa en torno al 80% para ambos tipos celulares. De igual forma el inhibidor reversible de la SERCA terc-butyl-benzohidroquinona (BHQ) administrado tras el relleno de  $\text{Ca}^{2+}$ , en el nivel estacionario, fue capaz de vaciar de forma reversible el compartimento vesicular tanto en células intactas (**Fig. 38**) como permeabilizadas (**Fig. 39**).



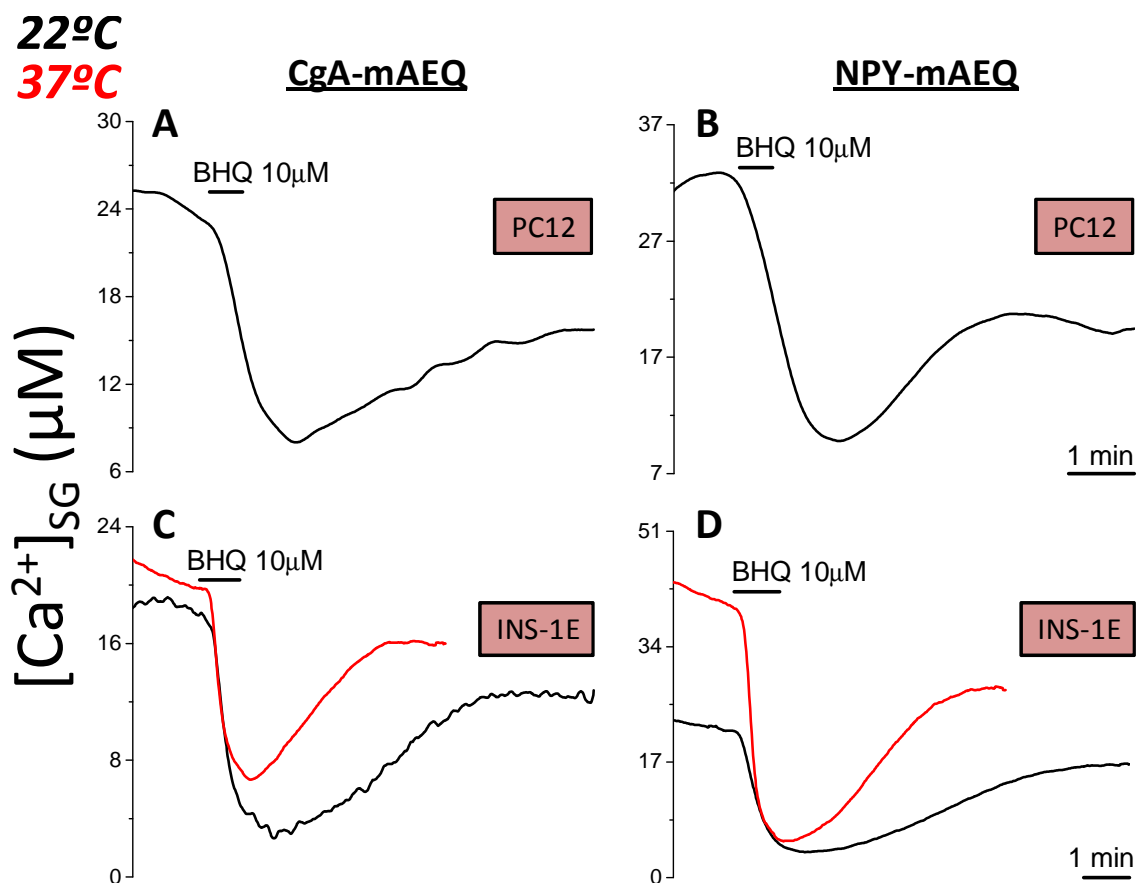
**Fig. 37. Medida de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  basal en gránulos de secreción de líneas celulares PC12 e INS-1E con las sondas CgA-mAEQ y NPY-mAEQ en células permeabilizadas.** Las células PC12 e INS-1E expresando los constructos CgA-mAEQ (A y C) y NPY-mAEQ (B y D) fueron depletadas de  $\text{Ca}^{2+}$  antes de la reconstitución, iniciando el registro de luminiscencia en medio libre de  $\text{Ca}^{2+}$ . A continuación, se perfundieron los medios internos de permeabilización según el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Posteriormente, se perfundió una solución intracelular tamponada de  $[\text{Ca}^{2+}]$  libre 100nM según se indica en la figura. Los paneles A y B muestran registros de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$  en células PC12, los paneles C y D muestran registros en células INS-1E. En el trazado verde las células fueron tratadas con taspigargina  $1 \mu\text{M}$  en los 5 minutos previos a iniciar el registro (A y B). Los registros se realizaron a  $22^\circ\text{C}$  (trazado negro) y a  $37^\circ\text{C}$  (trazado rojo). Estos experimentos son representativos de 3-34 similares de cada tipo.



**Fig. 38. Efecto del inhibidor reversible de la SERCA terc-butil-benzohidroquinona (BHQ) en la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  por los gránulos de secreción.** Las células INS-1E expresando los constructos CgA-mAEQ (A), NPY-mAEQ (B) y VAMP-mAEQ (D) y las células INS-1 expresando el constructo NPY-mAEQ (C) fueron depletadas de  $\text{Ca}^{2+}$  antes de la reconstitución, iniciando el registro de luminiscencia en medio libre de  $\text{Ca}^{2+}$ . A continuación, se perfundió un medio extracelular estándar con  $\text{La}^{3+}$  0,5mM en el caso de VAMP-mAEQ liberando la luminiscencia de la sonda presente en la membrana plasmática y, posteriormente, se perfundió en todos los casos medio externo estándar  $\text{Ca}^{2+}$  1mM (no mostrados). Tras estabilizarse la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  se perfundió medio externo estándar  $\text{Ca}^{2+}$  1mM suplementado con BHQ 10 $\mu\text{M}$  como se indica en la figura. Los registros se realizaron a 22°C (trazado negro) y a 37°C (trazado rojo). Estos experimentos son representativos de 3-10 similares de cada tipo.

Este proceso transcurrió más rápidamente a 37°C con una inhibición similar en torno al 70%-90% para INS-1E tanto en células intactas (CgA-mAEQ; 66,7 $\pm$ 1,1%, media  $\pm$  error estándar, n=4, 22°C; 64,6 $\pm$ 1,9%, n=6, 37°C; NPY-mAEQ; 83,6 $\pm$ 1,9%, n=10, 22°C; 71,9 $\pm$ 1,7%, n=8, 37°C; VAMP-mAEQ; 87,5 $\pm$ 1,4%, n=3, 22°C) como en células permeabilizadas (CgA-mAEQ; 77,8 $\pm$ 2,6%, media  $\pm$  error estándar, n=3, 22°C; 64,4 $\pm$ 1,6%, n=3, 37°C y NPY-mAEQ; 89,2 $\pm$ 3,0%, n=4, 22°C; 81,3 $\pm$ 4,5%, n=6, 37°C).





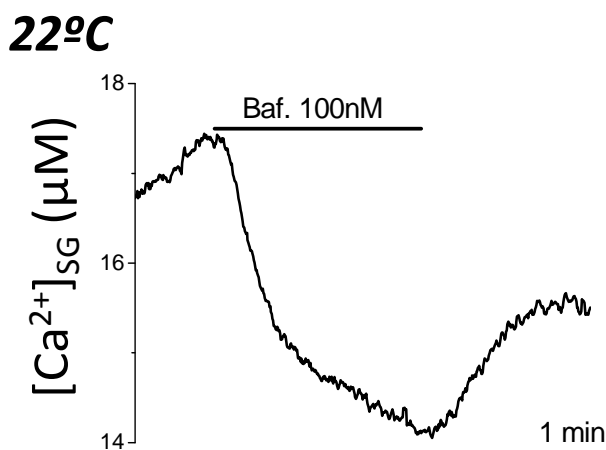
**Fig. 39. Efecto del inhibidor reversible de la SERCA terc-butil-benzohidroquinona (BHQ) en la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  por los gránulos de secreción en células permeabilizadas.** Las células PC12 e INS-1E expresando los constructos CgA-mAEQ (A y C) y NPY-mAEQ (B y D) fueron depletadas de  $\text{Ca}^{2+}$  antes de la reconstitución, iniciando el registro de luminiscencia en medio libre de  $\text{Ca}^{2+}$ . A continuación, se perfundieron los medios internos de permeabilización y seguidamente una solución intracelular tamponada de  $[\text{Ca}^{2+}]$  libre 100nM (no mostrados). Tras estabilizarse la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  se perfundió la solución  $[\text{Ca}^{2+}]$  100nM suplementado con BHQ 10 $\mu\text{M}$  como se indica en la figura. Los registros se realizaron a 22°C (trazado negro) y a 37°C (trazado rojo). Estos experimentos son representativos de 3-6 similares de cada tipo.

En los registros de INS-1 en célula intacta la inhibición con BHQ alcanzó valores del 80-90% con NPY-mAEQ (87,1 $\pm$ 0,2%, media  $\pm$  error estándar, n=4, 22°C; 79,3 $\pm$ 1,6%, n=3, 37°C) y en células PC12 permeabilizadas se observó una inhibición del 70-80% (CgA-mAEQ; 70,7 $\pm$ 4,1%, media  $\pm$  error estándar, n=6 y NPY-mAEQ; 73,7 $\pm$ 4,1%, n=4). Estos valores son consistentes con los obtenidos con la sonda VAMP-mAEQ en estos mismos tipos celulares (SantoDomingo et al., 2010) e indican que la mayor parte del  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular es captado vía SERCA. No obstante, se quiso explorar la posibilidad de que algún porcentaje de  $\text{Ca}^{2+}$  fuera captado por vías independientes de la SERCA.



Estudios en células cromafines bovinas (SantoDomingo et al., 2008) demostraron que el candidato a captar este pequeño porcentaje podría ser un sistema intercambiador  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  energizado por el bajo pH intravesicular (pH entre 5,5 - 6,0), a su vez generado mediante la bomba de  $\text{H}^+$  vacuolar V-ATPasa.

En células INS-1E intactas, la perfusión de bafilomicina, inhibidor específico de la V-ATPasa, disminuyó de forma lenta y reversible los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en los SG (**Fig. 40**). Por otro lado, la exposición a protonóforos como FCCP  $2\mu\text{M}$ , durante 2-5 minutos, produjo efectos similares (datos no mostrados). Los valores de inhibición alcanzados se situaron en torno al 20%, medidos con CgA-mAEQ ( $23,3\pm 0,8\%$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=3$ ). Se debe tener en cuenta que estos compuestos desencadenan un incremento del pH vesicular (Camacho et al., 2006; 2008), que podría aumentar algo la luminiscencia emitida por las sondas de aequorina (ver Material y Métodos). La disminución en la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$  entonces podría ser mayor, enmascarada por la variación en el pH. En las medidas con NPY-mAEQ no se encontraron datos significativos, quizá debido a este hecho. Con estos resultados se puede afirmar que en estos tipos celulares la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  por los SG está mediada fundamentalmente por bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo SERCA, junto a una pequeña contribución de un sistema intercambiador  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  energizado gracias al gradiente protónico generado mediante la bomba de  $\text{H}^+$  vacuolar, V-ATPasa.



**Fig. 40. Efecto de la bafilomicina (Baf.) en la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  por los gránulos de secreción.** Las células INS-1E expresando el constructo CgA-mAEQ fueron depletadas de  $\text{Ca}^{2+}$  antes de la reconstitución, iniciando el registro de luminiscencia en medio libre de  $\text{Ca}^{2+}$ . Seguidamente, se perfundió medio externo estándar  $\text{Ca}^{2+}$   $1\text{mM}$  (no mostrado) y tras estabilizarse la señal se perfundió medio externo estándar  $\text{Ca}^{2+}$   $1\text{mM}$  suplementado con Baf.  $100\text{nM}$  como se indica en la figura. Los registros se realizaron a  $22^\circ\text{C}$ . Este experimento es representativo de 3 similares.

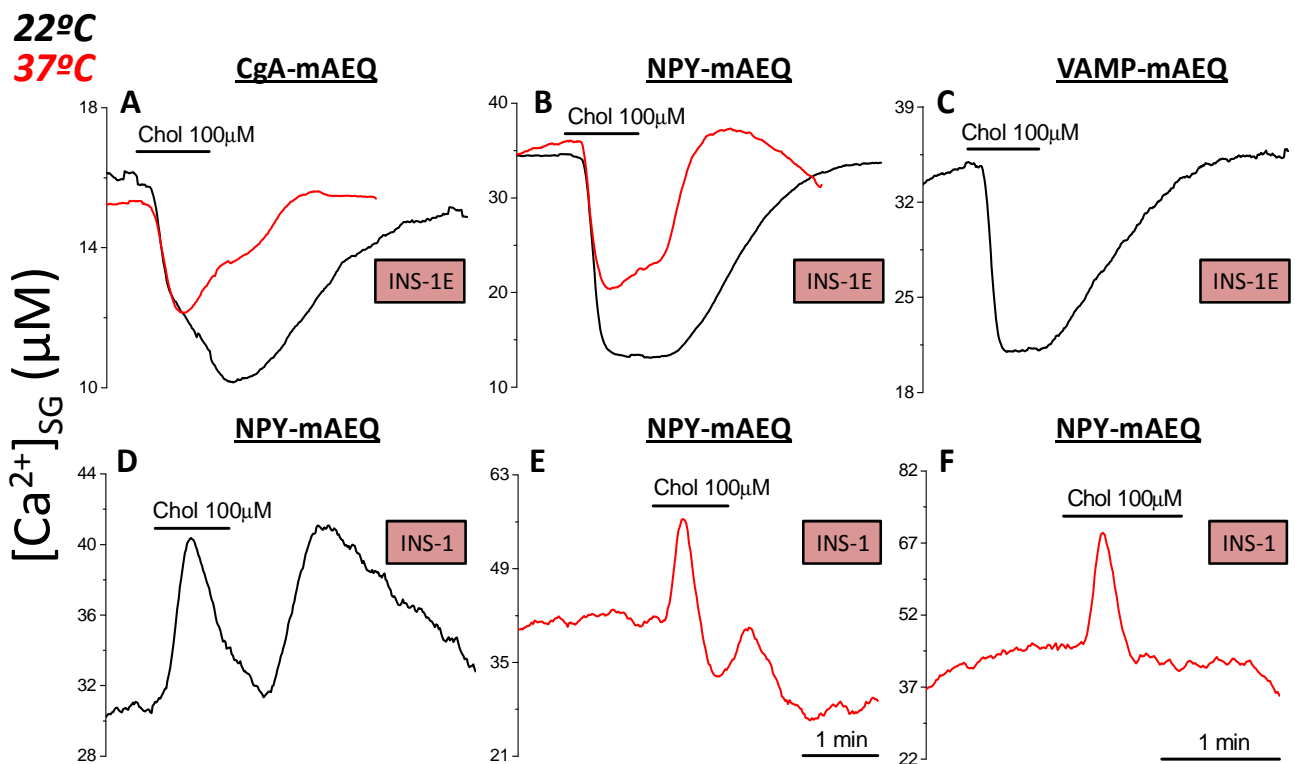
### 2.2 Mecanismos que participan en la liberación de calcio en los gránulos de secreción.

Los SG constituyen unos de los orgánulos más abundantes en células neuroendocrinas, siendo uno de sus principales reservorios intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  ya que su concentración total en las vesículas es incluso mayor que en el ER (Winker & Westhead, 1980; Haigh et al., 1989). A pesar de ello, son uno de los compartimentos subcelulares menos conocidos en términos de la dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$ , en concreto en el ámbito de la activación celular. Entre los posibles mecanismos de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los SG tenemos receptores de inositol(1,4,5)trifosfato ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) y receptores de rianodina ( $\text{RyR}$ ), además de otros posibles sistemas de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular sensibles a ácido nicotínico-adenín-dinucleótido-fosfato (NAADP) y ADP ribosa cíclica (cADPR). La presencia de estos sistemas de liberación ha generado un amplio debate en donde la mayoría de los estudios se basan en evidencias funcionales, evaluando la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular frente a diferentes agonistas conocidos (cafeína, alto  $\text{K}^+$ ...). Nuestro laboratorio ha descrito previamente la presencia de  $\text{IP}_3\text{R}$  y  $\text{RyR}$  en las vesículas de secreción, tanto en células cromafines como PC12 e INS-1 (SantoDomingo et al., 2008, 2010).

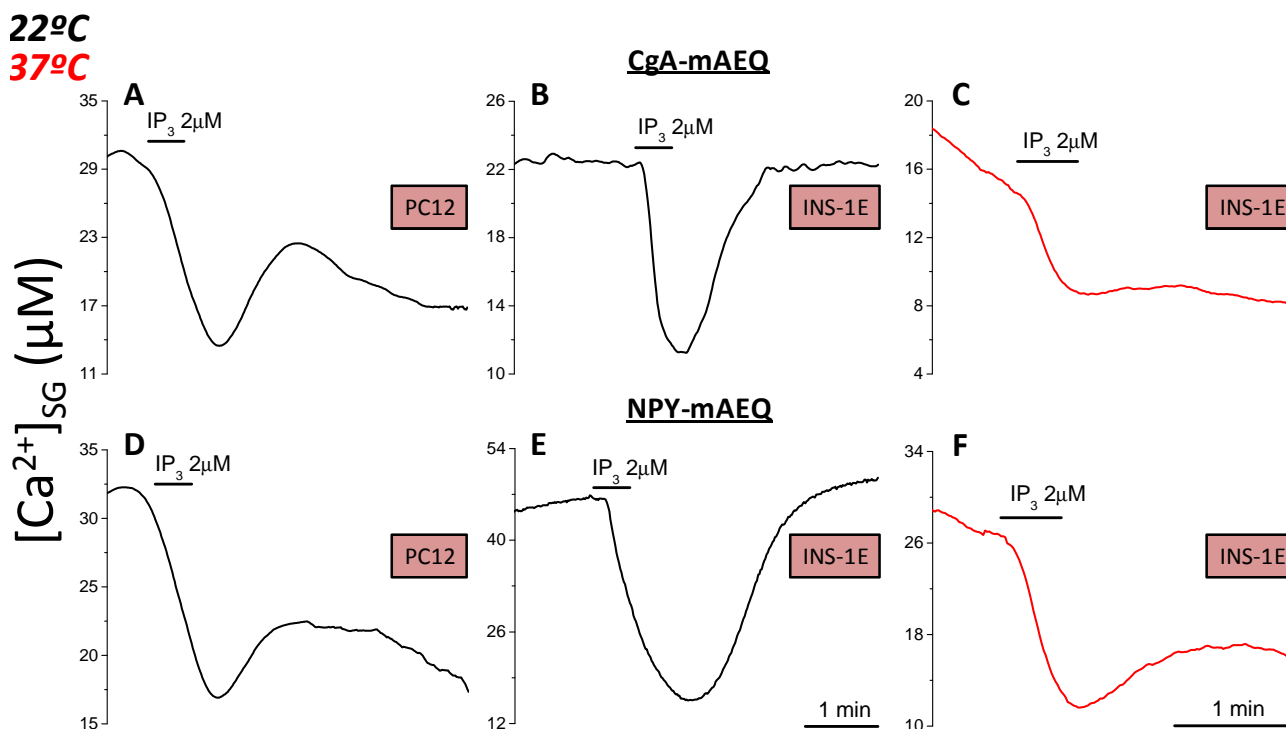
En el presente trabajo se han abordado más detalladamente estos mecanismos de liberación en las líneas celulares PC12, INS-1 e INS-1E. En primer lugar se ha evaluado el efecto del carbacol, agonista colinérgico de células neuroendocrinas análogo al agente fisiológico acetilcolina, que puede actuar tanto en receptores nicotínicos como receptores muscarínicos. El estímulo con carbacol condujo a un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, bien por despolarización de la membrana y apertura de receptores nicotínicos y canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje-dependientes (VOCC), o bien a través receptores muscarínicos con producción de  $\text{IP}_3$  y liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares vía  $\text{IP}_3\text{R}$ .

En células INS-1E se registró en todos los casos una disminución transitoria de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$  tras la adición de carbacol (**Fig. 41 A, B y C**) en torno al 40-60% (CgA-mAEQ;  $37,1 \pm 2,3\%$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=10$ , **22°C**;  $36,0 \pm 6,6\%$ ,  $n=8$ , **37°C**; NPY-mAEQ;  $58,7 \pm 4,5\%$ ,  $n=16$ , **22°C**;  $31,4 \pm 2,3\%$ ,  $n=16$ , **37°C**; VAMP-mAEQ;  $36,8 \pm 3,7\%$ ,  $n=5$ , **22°C**).

Sin embargo, en el caso de las células INS-1 en los registros con NPY-mAEQ se observaron respuestas heterogéneas al carbacol y en general de menor magnitud que las observadas en células INS-1E (**Fig. 41 D, E y F**). A 22°C se observaron dos picos consecutivos (**Fig. 41 D**) mientras que a 37°C apareció ocasionalmente una respuesta bifásica (**Fig. 41 E**) (aumento;  $38,8 \pm 2,3\%$ , media  $\pm$  error estándar; disminución;  $28,6 \pm 1,1\%$ , n=3) y en otras solamente un aumento transitorio de la  $[Ca^{2+}]_{SG}$  (**Fig. 41 F**) ( $56,8 \pm 4,6\%$ , media  $\pm$  error estándar, n=3). Profundizando en el tema, se realizó un estudio comparativo entre las líneas celulares PC12 e INS-1E con el propio  $IP_3$  como agonista. En células permeabilizadas el  $IP_3$  indujo una disminución transitoria de la  $[Ca^{2+}]_{SG}$  en ambos tipos celulares (**Fig. 42**), en concordancia con otros resultados en células INS-1 obtenidos en nuestro laboratorio (SantoDomingo et al., 2010).



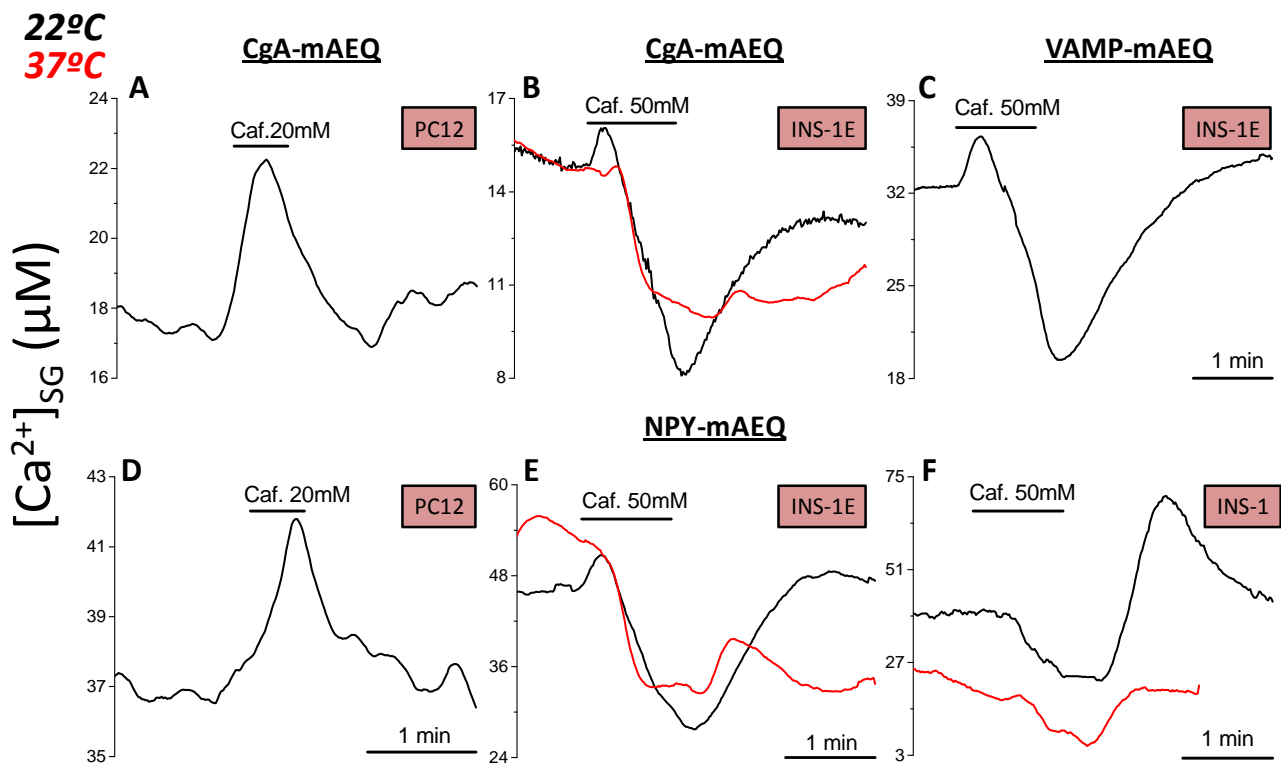
**Fig. 41. Efecto del carbacol (Chol) sobre la  $[Ca^{2+}]_{SG}$  en células INS-1 e INS-1E.** Las células INS-1E expresando los constructos CgA-mAEQ (A), NPY-mAEQ (B) y VAMP-mAEQ (C) y las células INS-1 expresando el constructo NPY-mAEQ (D, E y F) fueron depletadas de  $Ca^{2+}$  antes de la reconstitución, iniciando el registro de luminiscencia en medio libre de  $Ca^{2+}$ . A continuación, se perfundió un medio extracelular estándar con  $La^{3+}$  0,5mM en el caso de VAMP-mAEQ liberando la luminiscencia de la sonda presente en la membrana plasmática y posteriormente medio externo estándar  $Ca^{2+}$  1mM (no mostrados). Tras estabilizarse la captación de  $Ca^{2+}$  se perfundió medio externo estándar  $Ca^{2+}$  1mM suplementado con Chol 100 $\mu$ M como se indica en la figura. Los registros se realizaron a 22°C (trazado negro) y a 37°C (trazado rojo). Estos experimentos son representativos de 3-16 similares de cada tipo.



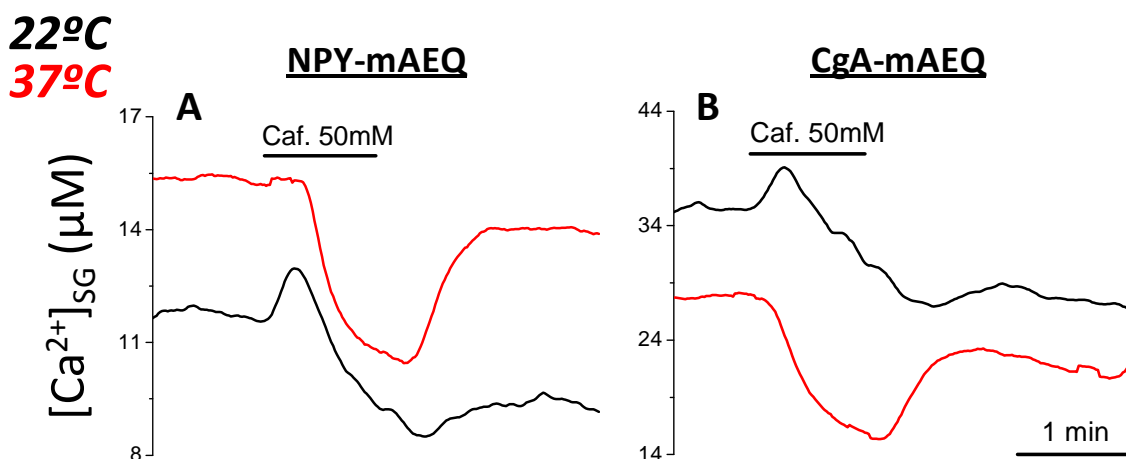
**Fig. 42. Efecto del inositol-trifosfato ( $IP_3$ ) sobre la  $[Ca^{2+}]_{SG}$  en células PC12 e INS-1E permeabilizadas.** Las células PC12 e INS-1E expresando los constructos CgA-mAEQ (A, B y C) y NPY-mAEQ (D, E y F) fueron depletadas de  $Ca^{2+}$  antes de la reconstitución, iniciando el registro de luminiscencia en medio libre de  $Ca^{2+}$ . Posteriormente, se perfundieron los medios internos de permeabilización y después una solución intracelular tamponada de  $[Ca^{2+}]$  libre 100nM (no mostrados). Tras estabilizarse la captación de  $Ca^{2+}$  se perfundió la solución de  $[Ca^{2+}]$  100nM suplementada con  $IP_3$  2 $\mu$ M como se indica en la figura. Los registros se realizaron a 22°C (trazado negro) y a 37°C (trazado rojo). Estos experimentos son representativos de 3-8 similares de cada tipo.

La velocidad de liberación de  $Ca^{2+}$  de las vesículas inducida por  $IP_3$  fue superior en células INS-1E que en células PC12, aunque la disminución total fue similar, en torno a un 50-60% en ambos casos: PC12 (CgA-mAEQ;  $62,2 \pm 1,6\%$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=3$ ; NPY-mAEQ;  $51,9 \pm 2,4\%$ ,  $n=4$ ) (Fig. 42 A y D) e INS-1E (CgA-mAEQ;  $60,0 \pm 2,5\%$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=7$ ; NPY-mAEQ;  $54,9 \pm 1,6\%$ ,  $n=8$ ) (Fig. 42 B y E). Al subir la temperatura a 37°C la liberación inducida por  $IP_3$  se visualizó peor debido al mayor consumo previo de aequorina, de forma que la disminución observada fue ligeramente menor, alrededor del 40-50% (CgA-mAEQ;  $43,9 \pm 1,8\%$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=3$ ; NPY-mAEQ;  $45,4 \pm 3,3\%$ ,  $n=5$ ) (Fig. 42 C y F). En cuanto a los RyR, el agonista no fisiológico cafeína indujo una disminución transitoria de la  $[Ca^{2+}]_{SG}$  en la línea celular INS-1E, tanto en células intactas (Fig. 43 B, C y E) como permeabilizadas (Fig. 44 A y B). En los registros obtenidos a 22°C se observó además siempre un pequeño aumento inicial de la  $[Ca^{2+}]_{SG}$  previo a la disminución.

Los valores de la disminución transitoria inducida por cafeína se situaron entre un 30-40% para células INS-1E intactas (CgA-mAEQ;  $39,0 \pm 2,8\%$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=7$ ,  $22^\circ\text{C}$ ;  $34,7 \pm 2,8\%$ ,  $n=7$ ,  $37^\circ\text{C}$ ; NPY-mAEQ;  $45,3 \pm 2,2\%$ ,  $n=11$ ,  $22^\circ\text{C}$ ;  $30,2 \pm 3,1\%$ ,  $n=12$ ,  $37^\circ\text{C}$ ; VAMP-mAEQ;  $33,8 \pm 3,7\%$ ,  $n=4$ ,  $22^\circ\text{C}$ ), y 20-30% en células INS-1E permeabilizadas (CgA-mAEQ;  $25,5 \pm 1,5\%$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=6$ ,  $22^\circ\text{C}$ ;  $28,4 \pm 6,5\%$ ,  $n=3$ ,  $37^\circ\text{C}$ ; NPY-mAEQ;  $24,8 \pm 1,6\%$ ,  $n=8$ ,  $22^\circ\text{C}$ ;  $35,5 \pm 1,7\%$ ,  $n=8$ ,  $37^\circ\text{C}$ ). En el caso de los registros con NPY-mAEQ en células INS-1 intactas a  $22^\circ\text{C}$  se apreciaron dos tipos de respuestas a la cafeína (**Fig. 43 F**): una monofásica consistente en un decremento similar al visto en células INS-1E, y otra bifásica, más frecuente, con un primer decremento seguido de un aumento transitorio (disminución;  $44,5 \pm 4,7\%$ , media  $\pm$  error estándar; aumento;  $56,3 \pm 9,6\%$ ,  $n=4$ ).



**Fig. 43. Efecto de la cafeína (Caf.) sobre la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$  en células PC12, INS-1 e INS-1E.** Las células PC12 e INS-1E expresando los constructos CgA-mAEQ (A y B), NPY-mAEQ (D y E) y VAMP-mAEQ (C) y las células INS-1 expresando el constructo NPY-mAEQ (F) fueron depletadas de  $\text{Ca}^{2+}$  antes de la reconstitución, iniciando el registro de luminiscencia en medio libre de  $\text{Ca}^{2+}$ . A continuación, se perfundió un medio extracelular estándar con  $\text{La}^{3+}$   $0,5\text{mM}$  en el caso de VAMP-mAEQ liberando la luminiscencia de la sonda presente en la membrana plasmática y posteriormente medio externo estándar  $\text{Ca}^{2+}$   $1\text{mM}$  (no mostrados). Tras estabilizarse la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  se perfundió medio externo estándar  $\text{Ca}^{2+}$   $1\text{mM}$  suplementado con Caf.  $50\text{mM}$  durante un minuto, o bien Caf.  $20\text{mM}$  medio minuto en el caso de células PC12, como se indica en la figura. Los registros se realizaron a  $22^\circ\text{C}$  (trazado negro) y a  $37^\circ\text{C}$  (trazado rojo). Estos experimentos son representativos de 4-12 similares de cada tipo.

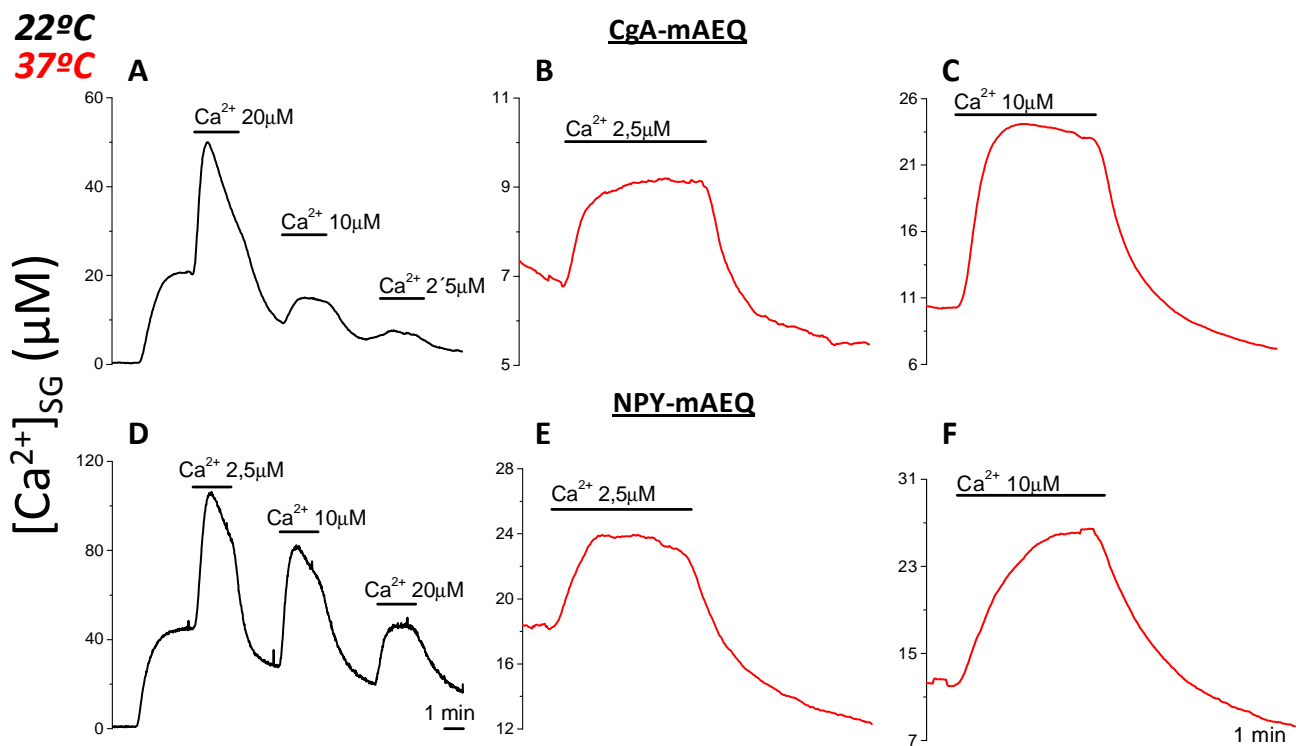


**Fig. 44. Efecto de la cafeína (Caf.) sobre la  $[Ca^{2+}]_{SG}$  en células INS-1E permeabilizadas.** Las células INS-1E expresando los constructos CgA-mAEQ (A) y NPY-mAEQ (B) fueron depletadas de  $Ca^{2+}$  antes de la reconstitución, iniciando el registro de luminiscencia en medio libre de  $Ca^{2+}$ . A continuación, se perfundieron los medios internos de permeabilización y seguidamente una solución intracelular tamponada de  $[Ca^{2+}]$  libre 100nM (no mostrados). Tras estabilizarse la captación de  $Ca^{2+}$  se perfundió la solución  $[Ca^{2+}]$  100nM suplementado con Caf. 50mM como se indica en la figura. Los registros se realizaron a 22°C (trazado negro) y a 37°C (trazado rojo). Estos experimentos son representativos de 3-8 similares de cada tipo.

A 37°C se observó solamente la disminución transitoria de la  $[Ca^{2+}]_{SG}$  ( $41,2 \pm 0,3\%$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=3$ ). En el caso de células PC12 intactas (**Fig. 43 A y D**), la administración de cafeína resultó en un aumento transitorio de la  $[Ca^{2+}]_{SG}$  en torno al 20-30% del nivel previo de  $[Ca^{2+}]$  de los gránulos de secreción (CgA-mAEQ;  $27,1 \pm 8,6\%$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=6$ ; NPY-mAEQ;  $20,7 \pm 4,3\%$ ,  $n=7$ ). Datos previos obtenidos con la sonda VAMP-mAEQ en células PC12 permeabilizadas mostraban en cambio una liberación de  $Ca^{2+}$  de las vesículas en presencia de cafeína (SantoDomingo et al., 2010). Estos resultados, como muchas de las cinéticas bifásicas, se pueden explicar en base a los dos efectos antagónicos del  $IP_3$  o la cafeína sobre el  $Ca^{2+}$  vesicular, liberación de  $Ca^{2+}$  de las vesículas por un lado y activación de la SERCA por otro lado como consecuencia de la liberación de  $Ca^{2+}$  del ER y el consiguiente aumento de  $Ca^{2+}$  citosólico.

Durante el proceso de exocitosis estimulada por agonistas, la activación celular conlleva la aparición de un aumento local de la  $[Ca^{2+}]$  bajo la membrana plasmática, comúnmente denominado microdominio de alto  $Ca^{2+}$ , que en última instancia es el desencadenante de la secreción.

En vista de las evidencias de la presencia relevante de IP<sub>3</sub>R y de RyR a nivel de las vesículas de secreción en la línea celular INS-1E, se quiso evaluar el comportamiento fisiológico de estos receptores en presencia de niveles altos de Ca<sup>2+</sup> para comprobar si eran capaces de activarse por el mecanismo *Calcium-Induced Calcium Release* (CICR). Para ello se perfundieron soluciones tamponadas de diferentes [Ca<sup>2+</sup>] en células INS-1E permeabilizadas. Sin embargo, ninguna de las soluciones perfundidas provocó directamente la liberación de Ca<sup>2+</sup> vesicular ni a 22°C ni a 37°C. En su lugar se observó en todos los casos un aumento transitorio de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>SG</sub> que fue similar tanto en células que expresaban CgA-mAEQ como NPY-mAEQ y a ambas temperaturas 22°C y 37°C (**Fig. 45**). Posiblemente estos aumentos transitorios, cuyos valores van del 60% al 150% para Ca<sup>2+</sup> 2,5μM, del 80% al 170% para Ca<sup>2+</sup> 10μM y en torno al 200% para Ca<sup>2+</sup> 20μM, se deban a la estimulación de la vía SERCA de entrada de Ca<sup>2+</sup> a las vesículas, predominando siempre frente a la posible liberación a través de RyR.



**Fig. 45. Efecto del Ca<sup>2+</sup> sobre la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>SG</sub> en células INS-1E permeabilizadas.** Las células INS-1E expresando los constructos CgA-mAEQ (A, B y C) y NPY-mAEQ (D, E y F) fueron depletadas de Ca<sup>2+</sup> antes de la reconstitución, iniciando el registro de luminiscencia en medio libre de Ca<sup>2+</sup>. A continuación, se perfundieron los medios internos de permeabilización y seguidamente una solución intracelular tamponada de [Ca<sup>2+</sup>] libre 100nM (no mostrados). Tras estabilizarse la captación de Ca<sup>2+</sup> se perfundió una solución interna tamponada de [Ca<sup>2+</sup>] libre 2,5μM, 10μM o 20μM como se indica en la figura. Los registros se realizaron a 22°C (trazado negro) y a 37°C (trazado rojo). Estos experimentos son representativos de 3-4 similares de cada tipo.

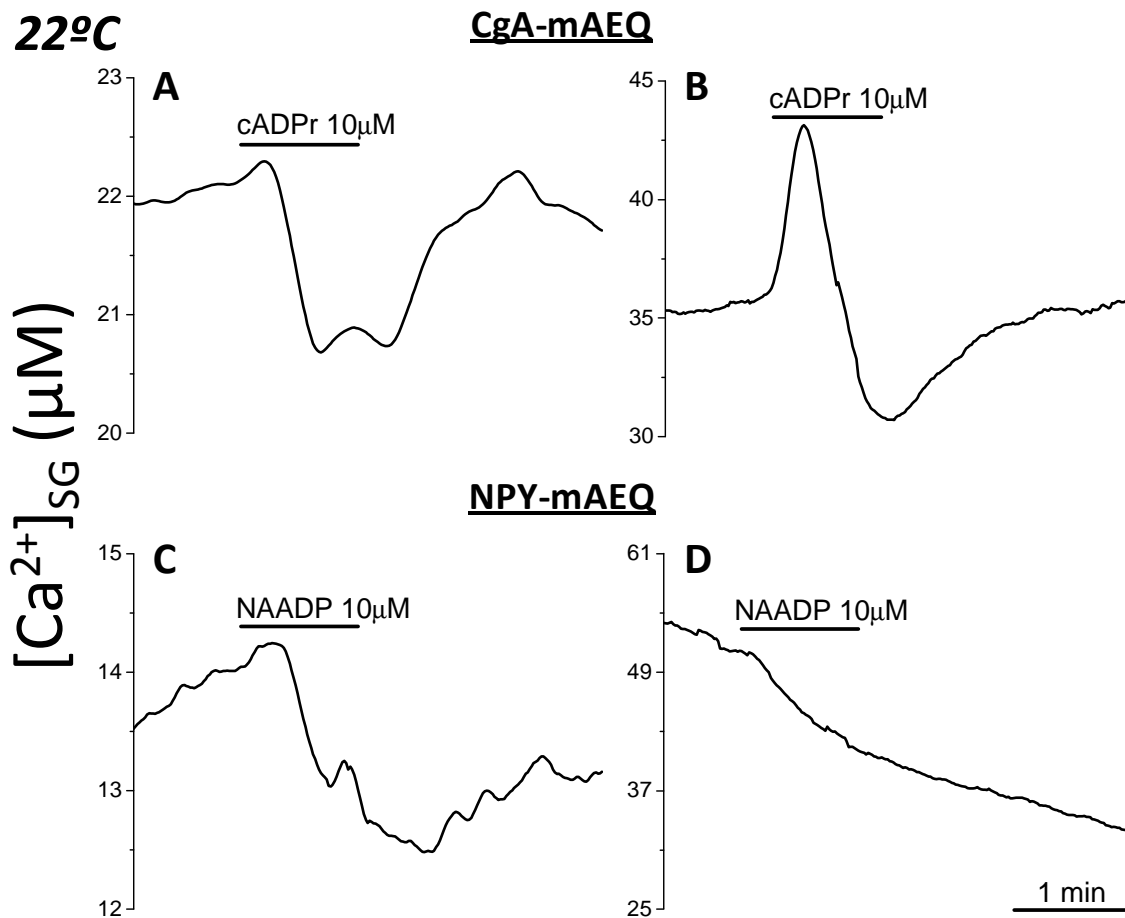
## RESULTADOS

---

Según los datos obtenidos podemos afirmar que las líneas celulares estudiadas poseen, todas ellas, IP<sub>3</sub>R en la membrana de los SG. Además, al menos las líneas celulares INS-1 e INS-1E también tienen RyR. No obstante, en la literatura se han descrito otros sistemas de liberación de Ca<sup>2+</sup> de depósitos ácidos a través de los agonistas NAADP y cADPR tales como el GC, lisosomas y los SG (Gerasimenko et al., 2006; Brailoiu et al., 2006; Morita et al., 2006; Rosado, 2011). Se ha propuesto que el receptor de estos agonistas podría ser el propio RyR, aunque en el caso del NAADP existen otros candidatos como los *Transient Receptor Potential channels* (TRP) y los *Two Pore Channels* (TPC) (Zhang & Li, 2007; Brailoiu et al., 2009; Calcraft et al., 2009). En los SG de células cromafines, PC12 e INS-1, no se apreció ningún efecto de cADPR ni NAADP (SantoDomingo et al., 2008; 2010). En el caso de células INS-1E a 22°C, sin embargo, se observaron respuestas para ambos estímulos, aunque de pequeña magnitud (**Fig. 46**). La perfusión de cADPR 10µM, por una parte, generó dos tipos de respuestas: Una leve disminución transitoria (**Fig. 46 A**) y una respuesta bifásica consistiendo en un aumento con posterior disminución de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>SG</sub> (**Fig. 46 B**). Por otro lado, el efecto del NAADP no fue apreciable a concentraciones inferiores a 10µM, a partir de la cual la respuesta consistió en una disminución transitoria de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>SG</sub> (**Fig. 46 C y D**). No se observó ningún efecto del NAADP ni cADPR a la temperatura de 37°C. La disminución de Ca<sup>2+</sup> vesicular se situó alrededor de un 10% tanto para cADPR (10,9±1,9%, media ± error estándar, n=4) como NAADP (CgA-mAEQ; 10,4±2,0%, media ± error estándar, n=3; NPY-mAEQ; 13,8±3,3%, n=7). En cuanto a la respuesta bifásica de la cADPR, que se situó en un rango del 10% del nivel basal de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>SG</sub> (aumento; 9,0±1,9%, media ± error estándar; disminución; 7,1±1,3%, n=8), una posible explicación podría ser que predominase primeramente una liberación de Ca<sup>2+</sup> de otros depósitos sensibles a cADPR como el ER, y éste fuera luego captado en los gránulos a través de bombas tipo SERCA. Nuestros datos sin embargo revelaron que en células INS-1E ni la cADPR ni el NAADP liberaron Ca<sup>2+</sup> del ER (datos no mostrados).

Finalmente según estos resultados se evaluó el comportamiento en respuesta a un estímulo fisiológico de glucosa en la línea celular INS-1E. Frente a la heterogeneidad en la población celular INS-1, la línea clonal INS-1E ha sido seleccionada en base a su contenido de insulina y su mejor respuesta secretora frente a variaciones en la concentración de glucosa, similar a la obtenida en islotes β-pancreáticos de rata (Merglen et al., 2004).



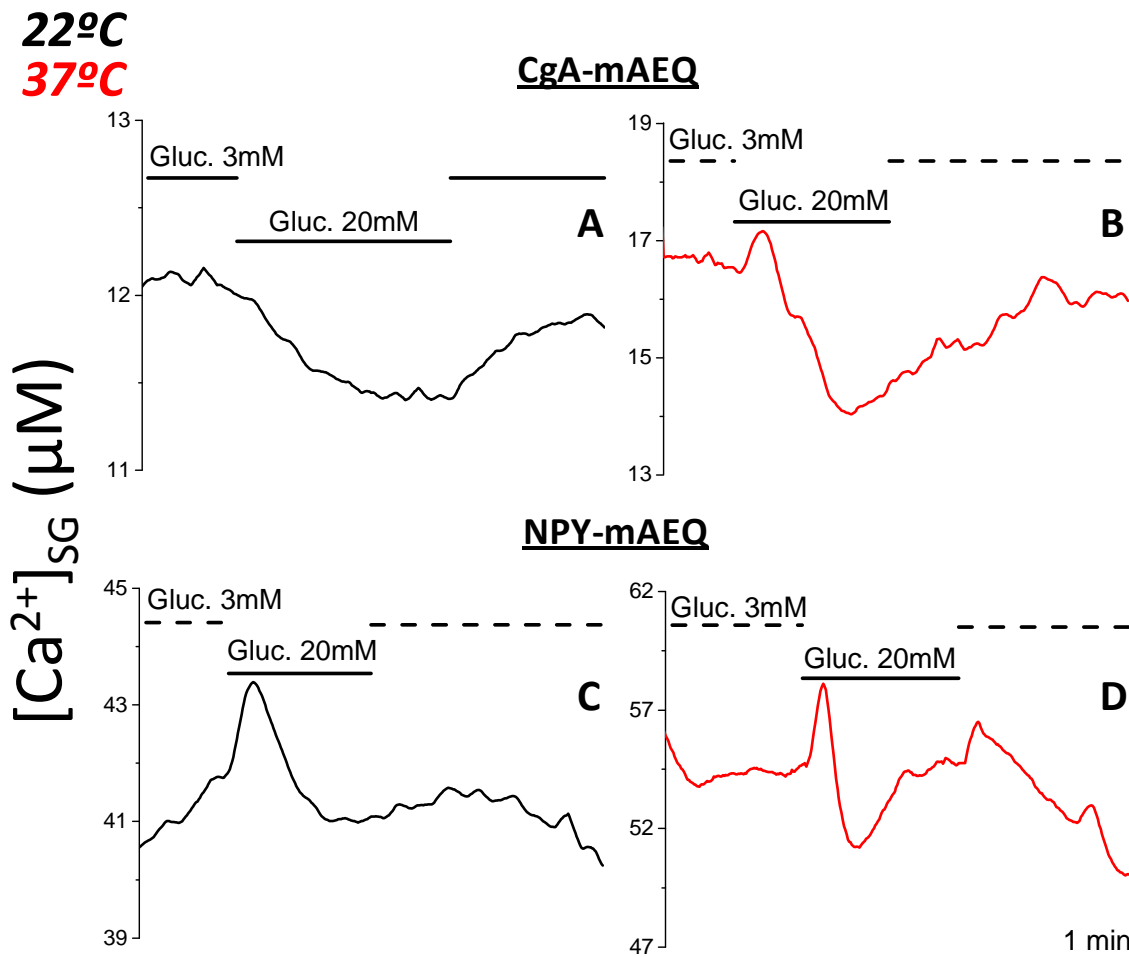


**Fig. 46. Efecto del ácido nicotínico-adenín-dinucleótido-fosfato (NAADP) y la ADP ribosa cíclica (cADPR) sobre la  $[Ca^{2+}]_{SG}$  en células INS-1E permeabilizadas.** Las células INS-1E expresando los constructos CgA-mAEQ (A y C) y NPY-mAEQ (B y D) fueron depletadas de  $Ca^{2+}$  antes de la reconstitución, iniciando el registro de luminiscencia en medio libre de  $Ca^{2+}$ . A continuación, se perfundieron los medios internos de permeabilización y seguidamente una solución intracelular tamponada de  $[Ca^{2+}]$  libre 100nM (no mostrados). Tras estabilizarse la captación de  $Ca^{2+}$  se perfundió la solución  $[Ca^{2+}]$  100nM suplementado, bien con cADPR  $10\mu M$ , o bien NAADP  $10\mu M$  como se indica en la figura. Los registros se realizaron a  $22^{\circ}C$ . Estos experimentos son representativos de 3-8 similares de cada tipo.

En células  $\beta$ -pancreáticas se ha desarrollado un modelo que explica el acoplamiento estímulo-secreción frente al aumento de concentración de glucosa (Wiederkehr & Wollheim, 2012). La glucosa es transportada al citosol donde se transforma en piruvato a través de la glucólisis. El piruvato se integra en el ciclo de Krebs, dentro de la matriz mitocondrial, aumentando la producción de NADH /  $FADH_2$  y, consecuentemente, la transferencia de electrones a la cadena respiratoria. Esto genera hiperpolarización de la membrana interna mitocondrial ( $\Delta\Psi_M$ ) y producción de ATP.

## RESULTADOS

El incremento de la relación ATP/ADP en el citosol provoca el cierre de canales de  $K^+$  sensibles a ATP ( $K_{ATP}$ ) despolarizándose la membrana plasmática. Se abren los VOCC, aumentando la  $[Ca^{2+}]_C$  y, finalmente, se desencadena la exocitosis. Para evaluar el efecto de una concentración alta de glucosa en células INS-1E, estas se incubaron 24-48 horas previas al experimento en un medio con glucosa 3mM. Así mismo tanto el proceso de reconstitución como los pasos previos al estímulo se realizaron en esta concentración de glucosa. La perfusión de glucosa 20mM durante 2-3 minutos produjo, o bien un efecto bifásico de un aumento de la  $[Ca^{2+}]_{SG}$  seguido de una disminución (**Fig. 47 B, C y D**), o bien directamente una disminución de la  $[Ca^{2+}]_{SG}$  (**Fig. 47 A**).



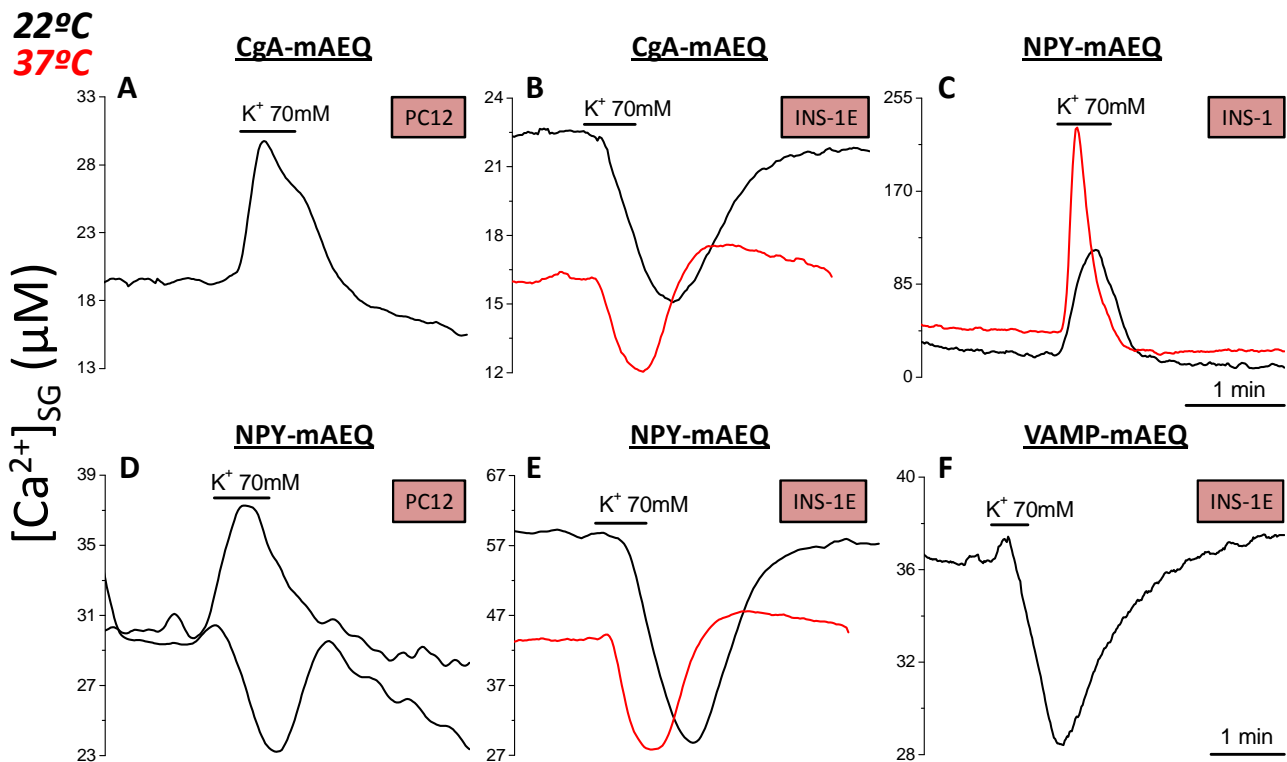
**Fig. 47. Efecto del cambio en la concentración de glucosa sobre la  $[Ca^{2+}]_{SG}$  en células INS-1E.** Las células INS-1E expresando los constructos CgA-mAEQ (A y B) y NPY-mAEQ (C y D) fueron depletadas de  $Ca^{2+}$  antes de la reconstitución, iniciando el registro de luminiscencia en medio libre de  $Ca^{2+}$ . Todos los medios contenían una concentración de glucosa 3mM. A continuación, se perfundió medio externo estándar  $Ca^{2+}$  1mM y glucosa 3mM, y tras estabilizarse la captación de  $Ca^{2+}$  se incrementó la glucosa a 20mM (trazado rojo) como se indica en la figura. Los registros se realizaron tanto a 22°C (A y C) como a 37°C (B y D). Estos experimentos son representativos de 3-12 similares de cada tipo.

La disminución de la  $[Ca^{2+}]_{SG}$  fue mayor a la temperatura de 37°C, con valores alrededor del 20% del nivel de  $Ca^{2+}$  vesicular (CgA-mAEQ; 18,4±1,6%, media ± error estándar, n=10; NPY-mAEQ; 16,0±1,2%, n=12). A la temperatura de 22°C los valores apenas llegaron al 10% (CgA-mAEQ; 7,8±0,4%, media ± error estándar, n=3; NPY-mAEQ; 6,0±0,2%, n=3). Los niveles de  $Ca^{2+}$  vesicular se recuperaron tras pasar el estímulo de alta glucosa. Estos datos son similares a los vistos en la línea celular INS-1 con anterioridad en nuestro laboratorio (SantoDomingo et al., 2010).

### 2.3 Acoplamiento de los gránulos de secreción a canales de calcio voltaje-dependientes (VOCC) en células INS-1E.

Como se ha observado a lo largo del estudio, el comportamiento fisiológico frente a un agonista concreto puede variar de un tipo celular a otro. Centrándose en un estímulo concreto, se decidió evaluar el efecto de la perfusión de un medio de alto  $K^+$  sobre los diferentes tipos celulares estudiados: PC12, INS-1 e INS-1E. La despolarización de la membrana plasmática por efecto del alto  $K^+$  desencadena la apertura de los canales de  $Ca^{2+}$  operados por voltaje (VOCC), produciendo un incremento del flujo de entrada de  $Ca^{2+}$  desde el medio extracelular al citosol a través de gradiente electroquímico.

Las respuestas a la despolarización con alto  $K^+$  fueron variables en los tres tipos celulares utilizados. En células PC12 se observaron dos tipos de respuestas; en la mayor parte de los casos se produjo un aumento de la  $[Ca^{2+}]_{SG}$  en respuesta al alto  $K^+$ , pero en algunos casos, en cambio, se observó una disminución transitoria de la misma (**Fig. 48 A y D**). En el caso de las células INS-1E, la respuesta fue más homogénea, siendo en todos los casos una disminución transitoria de la  $[Ca^{2+}]_{SG}$  (**Fig. 48 B, E y F**), ligeramente más rápida a 37°C pero de similar amplitud. Sin embargo, un hecho sorprendente fue que en células INS-1 el estímulo despolarizante de alto  $K^+$  provocó un gran aumento transitorio en la  $[Ca^{2+}]_{SG}$  y especialmente acusado a 37°C (**Fig. 48 C**). Las variaciones sobre el nivel de  $Ca^{2+}$  vesicular en cada caso fueron en células PC12 un 30-40% para el aumento transitorio (CgA-mAEQ; 44,1±5,9%, media ± error estándar, n=16; NPY-mAEQ; 30,0±3,2%, n=13) y en torno a 20% para la disminución (NPY-mAEQ; 22,9±1,2%, media ± error estándar, n=3).



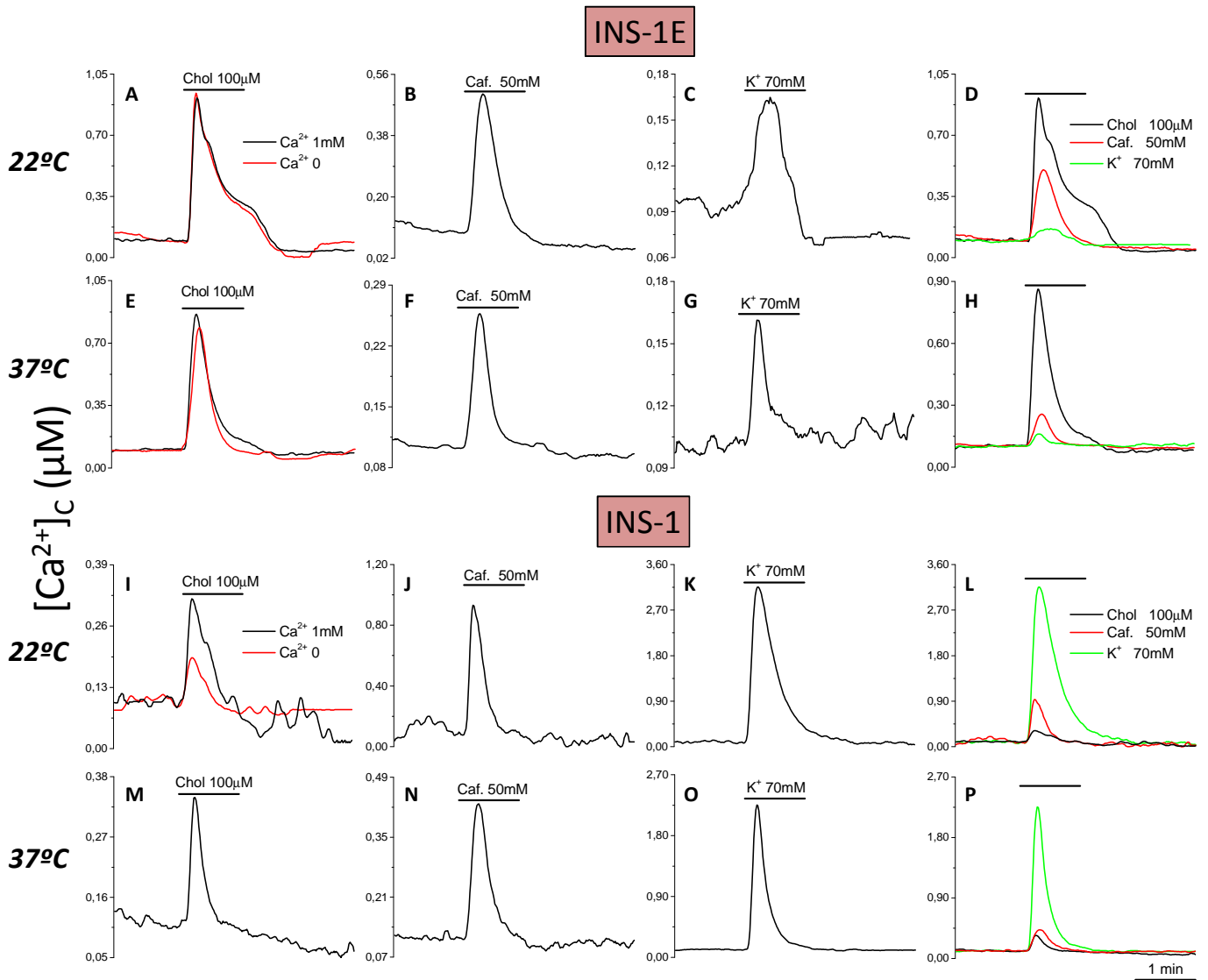
**Fig. 48.** Efecto de la despolarización con alto  $K^+$  sobre la  $[Ca^{2+}]_{SG}$  en células PC12, INS-1 e INS-1E. Las células PC12 e INS-1E expresando los constructos CgA-mAEQ (A y B), NPY-mAEQ (D y E) y VAMP-mAEQ (F) y las células INS-1 expresando el constructo NPY-mAEQ (C) fueron depletadas de  $Ca^{2+}$  antes de la reconstitución, iniciando el registro de luminiscencia en medio libre de  $Ca^{2+}$ . A continuación, se perfundió un medio extracelular estándar con  $La^{3+}$  0,5mM en el caso de VAMP-mAEQ liberando la luminiscencia de la sonda presente en la membrana plasmática y posteriormente medio externo estándar  $Ca^{2+}$  1mM (no mostrados). Tras estabilizarse la captación de  $Ca^{2+}$  se perfundió medio externo  $K^+$  70mM (ver Materiales y Métodos), como se indica en la figura. Los registros se realizaron a 22°C (trazado negro) y a 37°C (trazado rojo). Estos experimentos son representativos de 3-17 similares de cada tipo.

En células INS-1E se alcanzaron valores entre 30-40% para la disminución transitoria (CgA-mAEQ;  $37,8 \pm 1,0\%$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=12$ , 22°C;  $35,6 \pm 1,9\%$ ,  $n=11$ , 37°C; NPY-mAEQ;  $37,3 \pm 2,5\%$ ,  $n=22$ , 22°C;  $33,3 \pm 3,4\%$ ,  $n=17$ , 37°C; VAMP-mAEQ;  $33,8 \pm 3,7\%$ ,  $n=4$ , 22°C), y el aumento transitorio en células INS-1 representó prácticamente un 500% (NPY-mAEQ;  $505,8 \pm 11,3\%$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=8$ , 22°C;  $548,8 \pm 24,5\%$ ,  $n=5$ , 37°C).

Pese a que la línea celular INS-1E es una línea clonal de INS-1, su comportamiento fisiológico frente a agonistas como carbacol (Fig. 41), cafeína (Fig. 43) y en especial despolarización por alto  $K^+$  ha resultado ser muy diferente (Fig. 48).

Se quiso por tanto evaluar cómo afectarían estos estímulos a la dinámica de  $[Ca^{2+}]_i$  en otros compartimentos celulares, en primer lugar, en el citosol. Mediante la sonda de aequorina dirigida a citosol (cyt-AEQ), se realizaron mediciones de  $Ca^{2+}$  en células INS-1 e INS-1E frente a diferentes estímulos de cafeína, alto  $K^+$  y carbacol, y este último tanto en presencia como ausencia de  $Ca^{2+}$  en el medio extracelular. Todas las medidas se realizaron a ambas temperaturas de 22°C y 37°C.

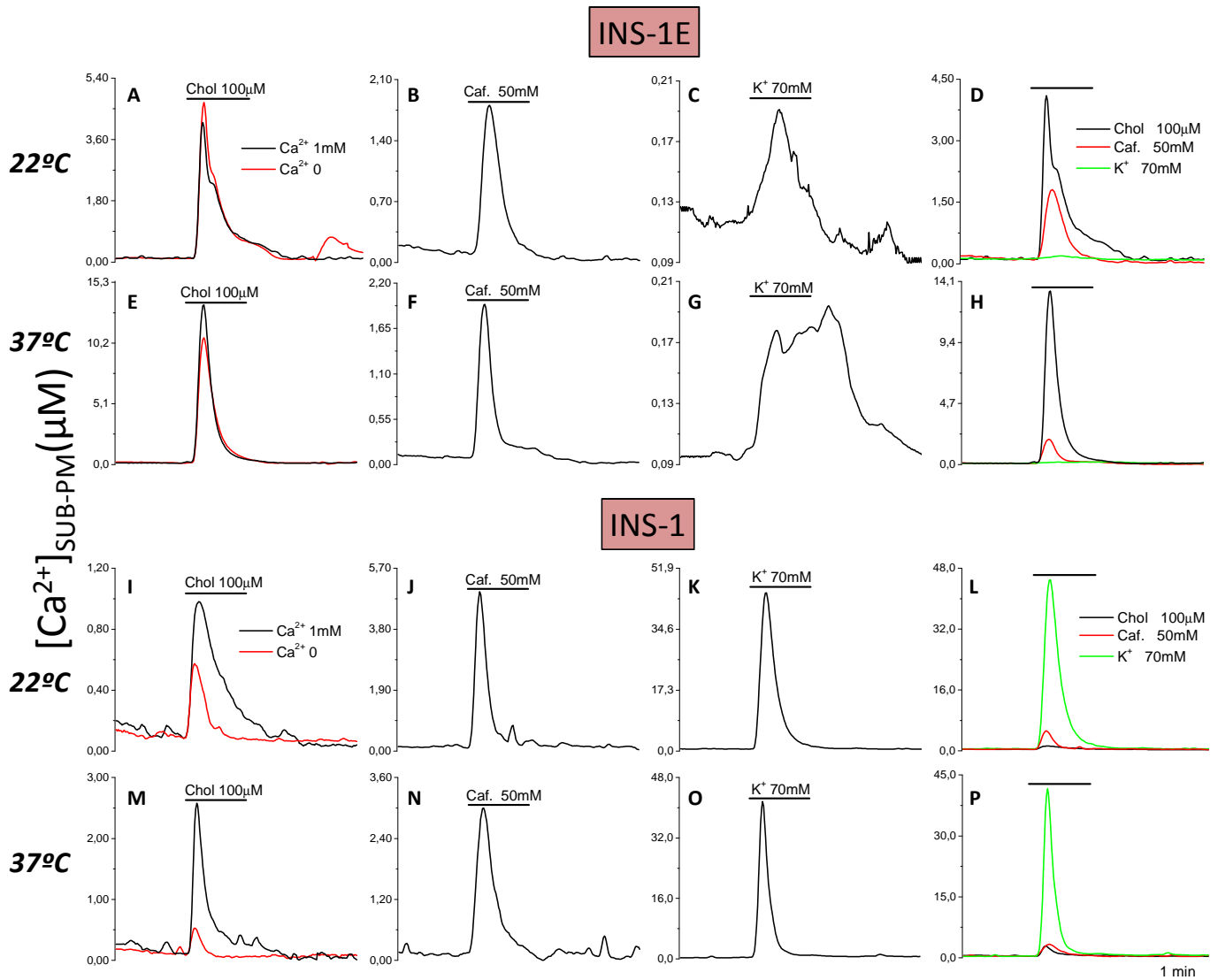
En células INS-1E a 22°C el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  debido al carbacol se situó alrededor de 1  $\mu M$  ( $0,913 \pm 0,059 \mu M$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=6$ ), predominando frente al inducido por cafeína de 0,5  $\mu M$  ( $0,502 \pm 0,035 \mu M$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=11$ ) y al correspondiente del alto  $K^+$  de 0,2  $\mu M$  ( $0,164 \pm 0,027 \mu M$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=5$ ) (**Fig. 49 A, B, C y D**). A 37°C las diferencias fueron más acusadas, situándose la señal del carbacol a 1  $\mu M$  ( $0,861 \pm 0,046 \mu M$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=20$ ), la de la cafeína a 0,25  $\mu M$  ( $0,257 \pm 0,020 \mu M$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=12$ ) y la del alto  $K^+$  a 0,1  $\mu M$  ( $0,081 \pm 0,010 \mu M$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=8$ ) (**Fig. 49 E, F, G y H**). Además la práctica totalidad de la señal del carbacol dependió del vaciamiento de depósitos de  $Ca^{2+}$  internos, con valores de pico similares tanto en presencia como ausencia de  $Ca^{2+}$  (**Fig. 49 A, y E**, trazado rojo) ( $0,941 \pm 0,071 \mu M$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=5$ , 22°C;  $0,786 \pm 0,115 \mu M$ ,  $n=4$ , 37°C). Por el contrario, en células INS-1 a 22°C el mayor aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  se consiguió con alto  $K^+$ , con un valor por encima de 3  $\mu M$  ( $3,156 \pm 0,282 \mu M$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=6$ ), aumento que fue muy superior al inducido por cafeína de 1  $\mu M$  ( $0,933 \pm 0,168 \mu M$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=5$ ), y carbacol de 0,3  $\mu M$  ( $0,318 \pm 0,042 \mu M$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=6$ ) (**Fig. 49 I, J, K y L**). Además, a diferencia del comportamiento de las células INS-1E, un gran porcentaje de la señal del carbacol dependió de la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de VOCC, reduciéndose la amplitud del pico de  $Ca^{2+}$  a la mitad en ausencia de  $Ca^{2+}$  (**Fig. 49 I**, trazado rojo) ( $0,193 \pm 0,063 \mu M$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=3$ ). A 37°C (**Fig. 49 M, N, O y P**) las diferencias también fueron más acusadas con valores de 2,25  $\mu M$  ( $2,253 \pm 0,159 \mu M$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=7$ ) para alto  $K^+$ , de 0,4  $\mu M$  ( $0,427 \pm 0,045 \mu M$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=3$ ) para cafeína, y 0,3  $\mu M$  ( $0,342 \pm 0,046 \mu M$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=6$ ) para carbacol. El hecho de que en células INS-1E prácticamente no se apreciara la señal de  $[Ca^{2+}]_i$  frente a la despolarización con alto  $K^+$ , a pesar de ser una célula con buena capacidad secretora frente a estímulos despolarizantes, planteó la posibilidad de que se generaran microdominios de alta  $[Ca^{2+}]_i$  localizados bajo la membrana plasmática.



**Fig. 49. Incremento en la  $[Ca^{2+}]_c$  mediante estímulos de carbacol (Chol), cafeína (Caf.) y despolarización con alto  $K^+$  en células INS-1 e INS-1E.** Células INS-1E (A-H) e INS-1 (I-P) expresando el constructo cyt-AEQ se perfundieron con medio externo estándar  $Ca^{2+}$  1mM suplementado con Caf. 50mM o Chol 100 $\mu$ M, o bien medio externo  $K^+$  70mM, como se indica en la figura. En el caso del carbacol (paneles A, E, I y M), se realizaron registros en ausencia de  $Ca^{2+}$  en donde se perfundió medio libre de  $Ca^{2+}$  antes, durante y después del estímulo (trazado rojo). Los paneles D, H, L y P muestran la superposición de los estímulos carbacol (negro) cafeína (rojo) y alto  $K^+$  (verde) realizados a 22°C y 37°C. Las gráficas representan las medias de 3-20 experimentos similares de cada tipo.

Para estudiar esta hipótesis se realizaron experimentos similares a los de citosol pero midiendo  $[Ca^{2+}]_c$  de forma selectiva en la cara interna de la membrana plasmática, o zona submembrana plasmática ( $[Ca^{2+}]_{SUB-PM}$ ), con la sonda de aequorina SNAP25-mAEQ (Fig. 50). Los resultados obtenidos fueron reflejo del comportamiento de la señal de  $Ca^{2+}$  citosólico, si bien las diferencias entre las señales fueron más drásticas.

Así pues, en células INS-1E (**Fig. 50 A-H**) el aumento de la  $[Ca^{2+}]_{SUB-PM}$  tras el estímulo con carbacol se situó en  $4\mu M$  a  $22^{\circ}C$  ( $4,097\pm 0,289\mu M$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=6$ ) y  $13\mu M$  a  $37^{\circ}C$  ( $13,37\pm 1,40\mu M$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=10$ ) y la estimulación con cafeína alcanzó valores alrededor de  $2\mu M$  tanto a  $22^{\circ}C$  ( $1,803\pm 0,154\mu M$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=11$ ) como a  $37^{\circ}C$  ( $1,940\pm 0,321\mu M$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=13$ ).



**Fig. 50. Incremento en la  $[Ca^{2+}]_{SUB-PM}$  mediante estímulos de carbacol (Chol), cafeína (Caf.) y despolarización con alto  $K^+$  en células INS-1 e INS-1E.** Células INS-1E (A-H) e INS-1 (I-P) expresando el constructo SNAP25-mAEQ se perfundieron con medio externo estándar  $Ca^{2+}$  1mM suplementado con Caf. 50mM o Chol  $100\mu M$ , o bien medio externo  $K^+$  70mM, como se indica en la figura. En el caso del carbacol (paneles A, E, I y M), se realizaron registros en ausencia de  $Ca^{2+}$  perfundiendo medio libre de  $Ca^{2+}$  antes, durante y después del estímulo (trazado rojo). Los paneles D, H, L y P muestran la superposición de los estímulos carbacol (negro) cafeína (rojo) y alto  $K^+$  (verde) realizados a  $22^{\circ}C$  y  $37^{\circ}C$ . Las gráficas representan las medias de 3-11 experimentos similares de cada tipo.

## RESULTADOS

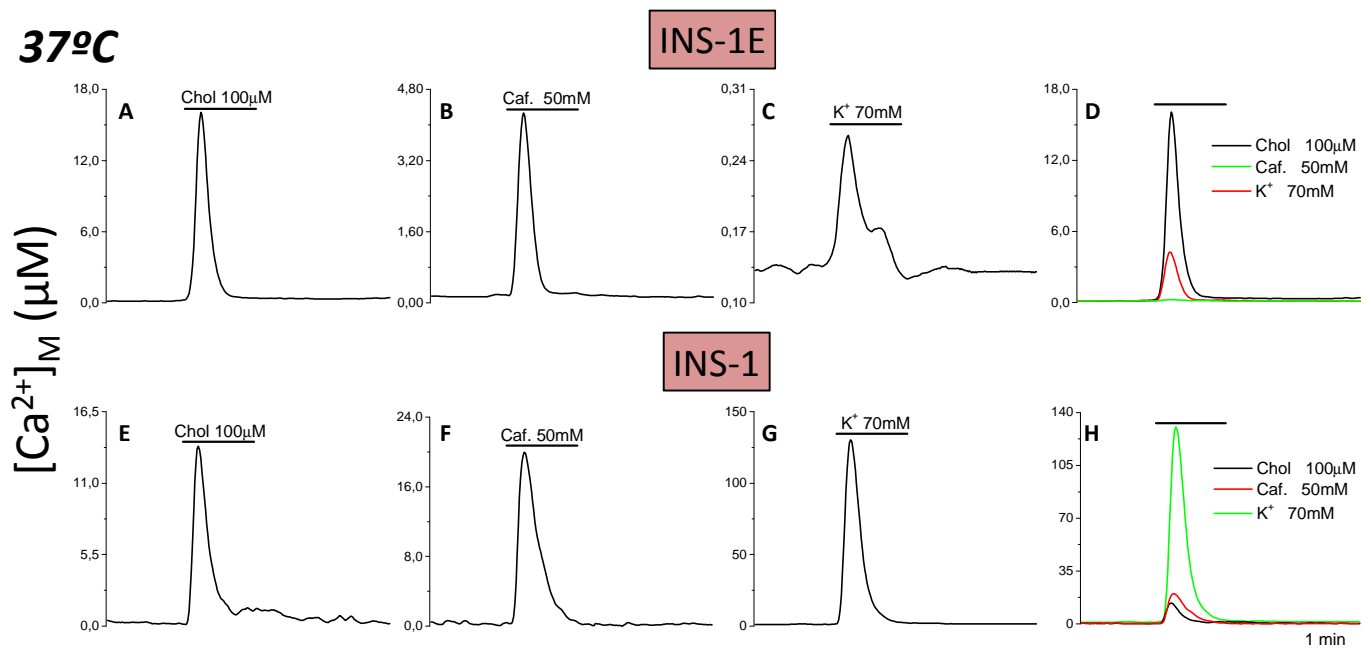
---

Finalmente, la estimulación con alto  $K^+$  produjo aumentos de apenas  $0,2\mu M$  tanto a  $22^\circ C$  ( $0,191\pm 0,035\mu M$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=3$ ) como a  $37^\circ C$  ( $0,194\pm 0,048\mu M$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=11$ ). En cambio, en células INS-1 (**Fig. 50 I-P**) el aumento de la  $[Ca^{2+}]_{SUB-PM}$  tras el estímulo con alto  $K^+$  fue de  $45\mu M$  a  $22^\circ C$  ( $44,64\pm 3,74\mu M$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=4$ ) y  $41\mu M$  a  $37^\circ C$  ( $41,33\pm 8,21\mu M$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=3$ ), muy superior en comparación con el de cafeína situado alrededor de  $5\mu M$  a  $22^\circ C$  ( $4,971\pm 1,007\mu M$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=4$ ) y  $3\mu M$  a  $37^\circ C$  ( $3,002\pm 0,075\mu M$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=3$ ), y el de carbacol alrededor de  $1\mu M$  a  $22^\circ C$  ( $0,981\pm 0,034\mu M$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=4$ ) y alrededor de  $2,5\mu M$  a  $37^\circ C$  ( $2,575\pm 0,333\mu M$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=6$ ).

De forma similar a lo visto en citosol, la señal de  $Ca^{2+}$  bajo la membrana plasmática debida al carbacol dependió casi en su totalidad de los depósitos internos de  $Ca^{2+}$  en el caso de células INS-1E (**Fig. 50 A y E**, trazado rojo) con valores de  $4\mu M$  a  $22^\circ C$  ( $4,687\pm 0,549\mu M$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=5$ ) y  $11\mu M$  a  $37^\circ C$  ( $10,62\pm 1,77\mu M$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=4$ ) en ausencia de  $Ca^{2+}$ , pero sólo parcialmente en el caso de células INS-1 (**Fig. 50 I y M**, trazado rojo) reduciéndose el pico a valores de  $0,6\mu M$  a  $22^\circ C$  ( $0,575\pm 0,047\mu M$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=4$ ) y  $0,5\mu M$  a  $37^\circ C$  ( $0,529\pm 0,021\mu M$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=3$ ) en ausencia de  $Ca^{2+}$ . Por lo tanto, en células INS-1E el aumento de la  $[Ca^{2+}]$  debido a la despolarización por alto  $K^+$  fue muy similar en la zona submembrana plasmática con respecto al citosol, mientras que en las células INS-1 se vio considerablemente amplificado.

Se planteó entonces la posibilidad de que el proceso de captación de  $Ca^{2+}$  del microdominio fuera mediado a través de las mitocondrias rápidamente. Sin embargo, las medidas con mit-mAEQ descartaron que estuvieran implicadas en la disipación del microdominio en células INS-1E (**Fig. 51**). Los valores de los picos de  $[Ca^{2+}]$  mitocondrial obtenidos en presencia de los distintos estímulos fueron los siguientes:  $16\mu M$  para carbacol ( $16,06\pm 3,57\mu M$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=13$ ), para cafeína de  $4\mu M$  ( $4,272\pm 0,189\mu M$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=7$ ), y para alto  $K^+$  de  $0,3\mu M$  ( $0,265\pm 0,060\mu M$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=13$ ) (**Fig. 51 A, B, C y D**). En el caso de las células INS-1, las medidas de  $[Ca^{2+}]$  mitocondrial fueron también reflejo de las citosólicas.





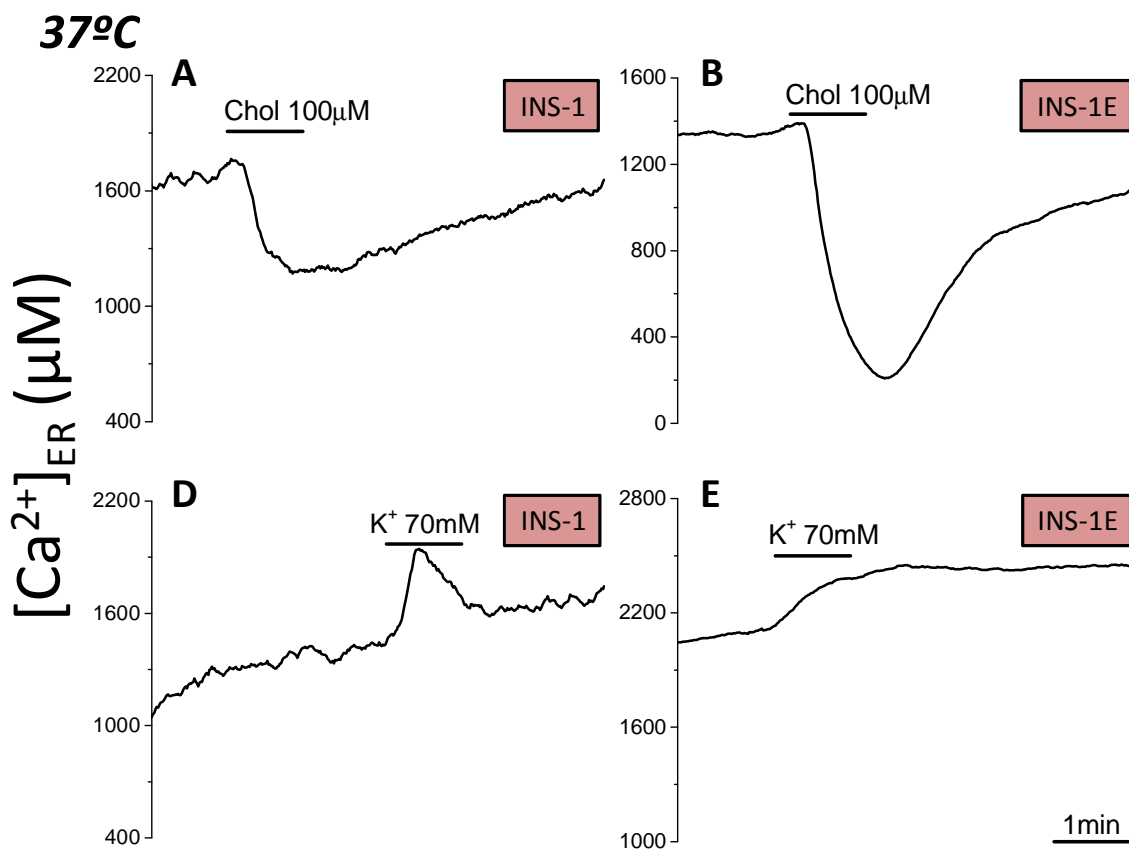
**Fig. 51.** Incremento en la  $[Ca^{2+}]_M$  mediante estímulos de carbacol (Chol), cafeína (Caf.) y despolarización con alto  $K^+$  en células INS-1 e INS-1E. Células INS-1E (A-D) e INS-1 (E-H) expresando el constructo mit-mAEQ se perfundieron con medio externo estándar  $Ca^{2+}$  1mM suplementado con Caf. 50mM o Chol 100 $\mu$ M, o bien medio externo  $K^+$  70mM, como se indica en la figura. Los paneles D y H muestran la superposición de los estímulos carbacol (negro) cafeína (rojo) y alto  $K^+$  (verde) realizados a 37°C. Se muestran medias representativas de 6-13 experimentos similares de cada tipo.

De nuevo, predominó la señal debida a la despolarización con alto  $K^+$  con valores de 130 $\mu$ M (129,3 $\pm$ 12,0 $\mu$ M, media  $\pm$  error estándar, n=6), para cafeína de 20 $\mu$ M (19,95 $\pm$ 3,17 $\mu$ M, media  $\pm$  error estándar, n=6), y para carbacol de 14 $\mu$ M (13,85 $\pm$ 1,42 $\mu$ M, media  $\pm$  error estándar, n=6), similar al obtenido en las células INS-1E (Fig. 51 E, F, G y H).

Se planteó entonces estudiar la dinámica de  $[Ca^{2+}]$  en el ER durante la estimulación. Para ello se realizaron medidas de  $[Ca^{2+}]_{ER}$  con la sonda de aequorina de baja afinidad dirigida a retículo ER-LAAEQ, diseñada en nuestro laboratorio (de la Fuente et al., 2013). Se probaron los efectos de carbacol y despolarización con alto  $K^+$  al igual que anteriormente en células INS-1 e INS-1E (Fig. 52). El carbacol indujo disminución transitoria de la  $[Ca^{2+}]_{ER}$  en ambos tipos celulares, con valores del 80% (81,4 $\pm$ 3,6%, media  $\pm$  error estándar, n=11) para células INS-1E y 30-40% (33,2 $\pm$ 5,4%, media  $\pm$  error estándar, n=3) para células INS-1 (Fig. 52 A y B).

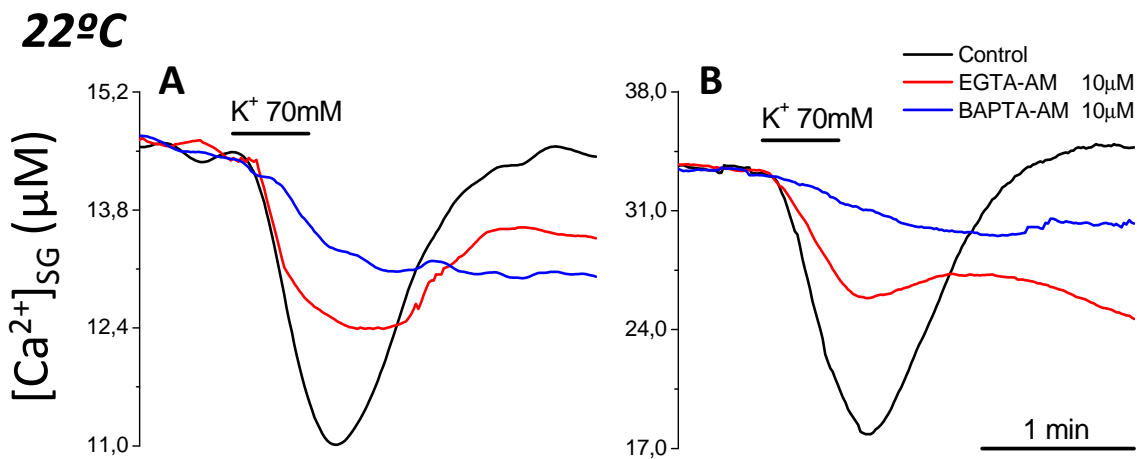
## RESULTADOS

La despolarización con alto  $K^+$ , por su parte, no desencadenó liberación de  $Ca^{2+}$  del ER en ninguno de los tipos celulares, apreciándose, sólo en ciertos casos, un aumento transitorio de la  $[Ca^{2+}]_{ER}$  en células INS-1 ( $30,2 \pm 1,9\%$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=3$ ) y un aumento más mantenido en células INS-1E ( $8,1 \pm 0,9\%$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=11$ ) (Fig. 52 D y E). Las diferencias entre las señales de  $Ca^{2+}$  generadas por despolarización con alto  $K^+$  en las células INS-1 e INS-1E sugieren una diferencia de expresión de VOCC sustancial entre ambos tipos celulares, de forma que las células INS-1 poseerían un número de canales muy superior en la membrana plasmática con respecto a la línea celular INS-1E. Sin embargo, los efectos de la despolarización con alto  $K^+$  sobre la  $[Ca^{2+}]_{SG}$  en células INS-1E sugieren que los VOCC, aun siendo mucho menos abundantes, están especialmente acoplados en estas células a los SG.



**Fig. 52. Efecto de los estímulos de carbacol (Chol) y despolarización con alto  $K^+$  sobre la  $[Ca^{2+}]_{ER}$  en células INS-1 e INS-1E.** Las células INS-1 (A y D) e INS-1E (B, C, E y F) expresando el constructo ER-LAAEQ fueron depletadas de  $Ca^{2+}$  antes de la reconstitución, iniciando el registro de luminiscencia en medio libre de  $Ca^{2+}$ , y a continuación medio externo estándar  $Ca^{2+}$  1mM, o bien se perfundió directamente sin depletar (no mostrados). Tras estabilizarse la captación de  $Ca^{2+}$  se perfundió medio externo estándar  $Ca^{2+}$  1mM suplementado con Chol 100  $\mu M$ , o bien medio externo  $K^+$  70mM, como se indica en la figura. Todos los registros se realizaron a 37°C. Estos experimentos son representativos de 3-11 similares de cada tipo.

A fin de poder elucidar la presencia de ese microdominio de  $\text{Ca}^{2+}$  exclusivo entre los VOCC y los SG, las células INS-1E se incubaron, durante el proceso de reconstitución, con los quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares EGTA-AM y BAPTA-AM. El BAPTA es un quelante más selectivo y rápido que el EGTA de forma que puede ser capaz de captar más rápidamente  $\text{Ca}^{2+}$  del supuesto microdominio, y evitar así sus efectos sobre las vesículas de secreción. La **Fig. 53** muestra el efecto de la despolarización con alto  $\text{K}^+$ , en células INS-1E control, o bien cargadas con los quelantes EGTA o BAPTA. Frente a la disminución transitoria de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$  en el pulso de alto  $\text{K}^+$  sin quelantes, la presencia de EGTA (**Fig. 53 A y B**, trazado rojo) supuso una inhibición del 50% (CgA-mAEQ;  $48,4 \pm 5,8\%$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=4$ ; NPY-mAEQ;  $54,1 \pm 1,2\%$ ,  $n=6$ ) y la de BAPTA (**Fig. 53 A y B**, trazado rojo) de prácticamente el 80%-90% (CgA-mAEQ;  $73,4 \pm 8,3\%$ , media  $\pm$  error estándar,  $n=4$ ; NPY-mAEQ;  $85,7 \pm 1,0\%$ ,  $n=6$ ) de esta disminución. Estos datos claramente sugieren que en las células INS-1E hay un número reducido de VOCC, pero están todos ellos estrechamente acoplados a las vesículas de secreción, generando microdominios locales de  $\text{Ca}^{2+}$  que inducen liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de las vesículas, pero que no son capaces de generar aumentos globales de  $\text{Ca}^{2+}$  significativos en el citosol.



**Fig. 53. Efecto de los quelantes internos de  $\text{Ca}^{2+}$  EGTA-AM y BAPTA-AM sobre los efectos del estímulo despolarizante con alto  $\text{K}^+$  en  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$  de células INS-1E.** Las células INS-1E expresando los constructos CgA-mAEQ (A) y NPY-mAEQ (B) fueron depletadas de  $\text{Ca}^{2+}$  antes de la reconstitución, iniciando el registro de luminiscencia en medio libre de  $\text{Ca}^{2+}$ . A continuación, se perfundió medio externo estándar  $\text{Ca}^{2+}$  1mM (no mostrados) y tras estabilizarse la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  se perfundió medio externo  $\text{K}^+$  70mM, como se indica en la figura. En el caso del EGTA-AM (trazado rojo) y BAPTA-AM (trazado azul), se añadieron estos quelantes en el proceso de reconstitución. Todos los registros se realizaron a 22°C. Estos experimentos son representativos de 4-6 similares de cada tipo.

### 3. DINÁMICA DEL CALCIO EN GRÁNULOS DE SECRECIÓN EN LAS LINEAS NEUROENDOCRINAS PC12 E INS-1. REGISTROS EN CÉLULA ÚNICA.

---

En el anterior apartado se evaluaron los sistemas de captación y liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los SG en población celular de las líneas PC12, INS-1 e INS-1E, así como la variación de los mismos en función del propio tipo celular aportando un concepto global de dichos mecanismos. No obstante, diferentes estímulos tales como la despolarización con alto  $\text{K}^+$ , o cambios en la concentración de glucosa entre otros han producido respuestas variables en la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$ , desde incrementos hasta decrementos transitorios, y en ciertos casos respuestas bifásicas. Estos resultados, junto a otros obtenidos con anterioridad en nuestro laboratorio en células cromafines (SantoDomingo et al., 2008) ponen de manifiesto la heterogeneidad de respuesta entre la población de vesículas de secreción dentro de la célula. De hecho, la existencia de diferentes subpoblaciones de los SG en células neuroendocrinas ha sido ampliamente tratada en la literatura (Voets et al., 1999; García et al., 2006; Álvarez & Marengo, 2011).

Para relacionar la diversidad de población vesicular y su implicación en la heterogeneidad de respuestas se realizaron registros de  $\text{Ca}^{2+}$  en célula única, mediante fluorescencia. Tras evaluar la localización celular de diferentes constructos de rtPericam y la familia de sondas de  $\text{Ca}^{2+}$  GECO los candidatos idóneos para las medidas de  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular en célula única fueron VAMP-RGECO1, VAMP-GEMGECO1, VAMP-GEXGECO1, NPY-GEMGECO1, y NPY-GEXGECO1.

#### 3.1 Registros de calcio en gránulos de secreción efectuados con la sonda VAMP-RGECO1.

La sonda de  $\text{Ca}^{2+}$  VAMP-RGECO1 era una buena candidata para realizar registros de  $\text{Ca}^{2+}$  en los SG de célula única.

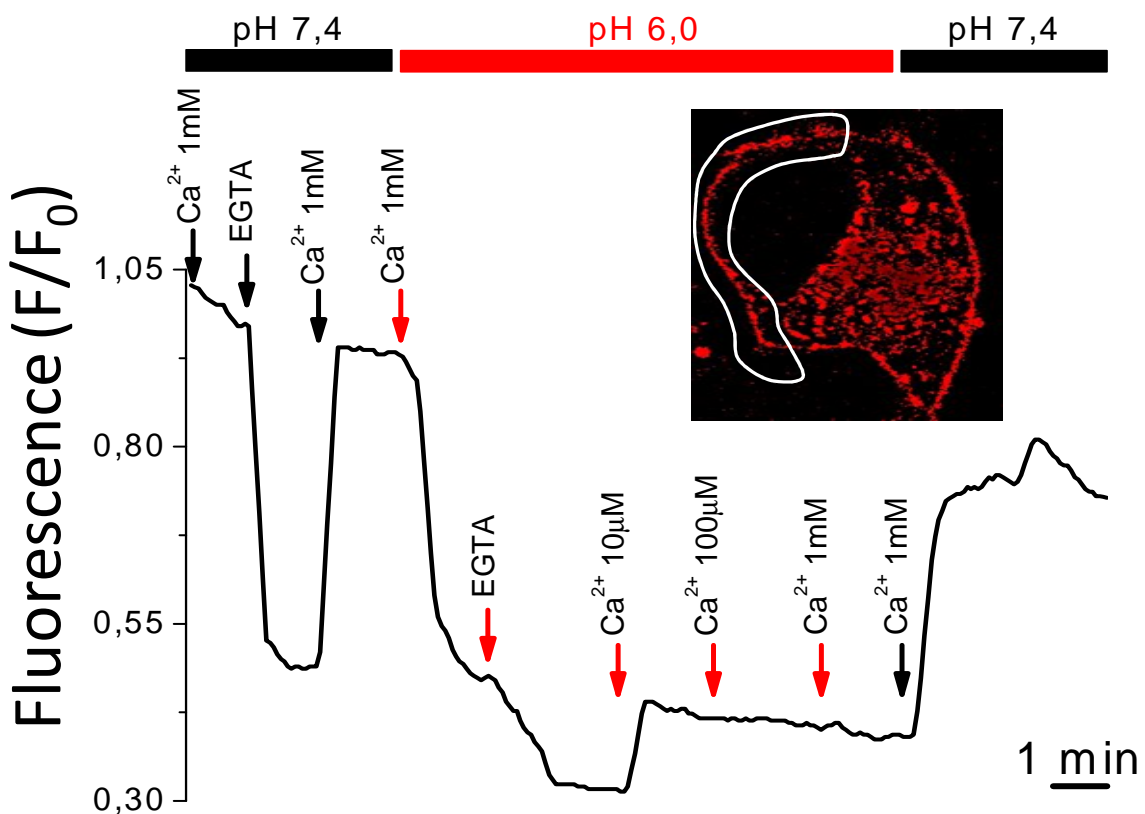
La sonda RGECO1, pese a no ser ratiométrica, presenta una menor fototoxicidad así como mayor grado de penetración, asociados a la excitación a mayores longitudes de onda. Estas características permiten aumentar el tiempo de experimentación (Wu et al., 2013). Además el rango dinámico experimental máximo, calculado como el cociente entre la intensidad de fluorescencia de la conformación  $Ca^{2+}$ -bound y la conformación  $Ca^{2+}$ -free, se sitúa en un pH entorno a 6,0, similar al medio ácido del lumen de los SG (Zhao et al., 2011).

En los registros preliminares de  $Ca^{2+}$  vesicular en células PC12 en los que se realizó un estímulo despolarizante con alto  $K^+$ , no se observó ningún tipo de respuesta en diferentes regiones seleccionadas de la población vesicular. Ante este hecho se planteó que el entorno ácido de la matriz de los SG hubiera alterado la  $K_d$  aparente de la sonda VAMP-RGECO1. Para evaluar este hecho se realizaron registros de  $Ca^{2+}$  en células PC12 donde se perfundieron diferentes medios extracelulares en presencia o ausencia de  $Ca^{2+}$  y a pH 7,4 y 6,0, simulando el entorno vesicular.

Aprovechando la situación de anclaje extracelular de la sonda VAMP-RGECO1 se seleccionaron y evaluaron diferentes regiones de la membrana plasmática con el fin de estudiar el comportamiento de la sonda frente a los diferentes medios de perfusión (**Fig. 54**).

Al pasar de un medio extracelular conteniendo  $Ca^{2+}$  1mM y pH 7,4 a otro conteniendo  $Ca^{2+}$  1mM a pH 6,0 se produjo una caída de la fluorescencia aproximadamente a la mitad, un nivel similar al observado con la perfusión de un medio libre de  $Ca^{2+}$  a pH 7,4. Pasar ahora del medio con  $Ca^{2+}$  1mM y pH 6,0 a un medio libre de  $Ca^{2+}$  a ese mismo pH provocó un decrecimiento de la fluorescencia de hasta un 70% con respecto a la inicial, que se revirtió completamente al perfundir un medio de  $Ca^{2+}$  10 $\mu$ M a pH 6,0. Por lo tanto, una concentración de  $Ca^{2+}$  de 10 $\mu$ M fue suficiente para saturar la sonda VAMP-RGECO1 a pH 6,0.

Finalmente, se restableció la fluorescencia al pasar a un medio  $Ca^{2+}$  1mM pH 7,4. Frente a estos hechos y puesto que las variaciones de  $[Ca^{2+}]_{SG}$  resultaron complejas de evaluar en ese rango de fluorescencia se desestimó el uso de esta sonda.



**Fig. 54.** Efecto del pH ácido y la  $[Ca^{2+}]$  sobre la fluorescencia de VAMP-RGECO1 en células PC12. Las células PC12 expresando el constructo VAMP-RGECO1 fueron incubadas en medio de cultivo suplementado con glicerol al 5%(v/v) 24 horas antes del experimento. Se procedió al lavado *off-line* con medio extracelular estandar  $Ca^{2+}$  1mM y se dispusieron en el adaptador del sistema de perfusión excitándose con un haz láser utilizando la línea de 543nm del He-Ne. La fluorescencia emitida se recogió entre 600-700nm. Se seleccionó una región de la parte externa de la membrana plásmática de un conjunto de células, o bien de una única célula (trazado amarillo). A continuación, se inició el registro perfundiendo diferentes medios extracelulares como se indica en la figura. Todos los registros se realizaron a 22°C y a las 48-72 horas de expresión, siendo este representativo de 5 experimentos similares.

### 3.2 Registros de calcio en gránulos de secreción efectuados con las sondas VAMP-GEMGECO1 y VAMP-GEXGECO1.

La principal ventaja de las medidas de  $Ca^{2+}$  con las sondas GEMGECO1 y GEXGECO1 es que, debido a sus características ratiométricas, se pueden minimizar diversos artefactos experimentales en el registro, ya que afectan por igual a ambas longitudes de onda. La desventaja es que los registros de  $Ca^{2+}$  con ambas sondas conllevan la aparición de fenómenos de fotoblanqueo y fototoxicidad celular debido a que ciertas longitudes de onda de excitación se encuentran próximas al UV.

Este efecto provoca un acortamiento considerable del tiempo de experimentación.

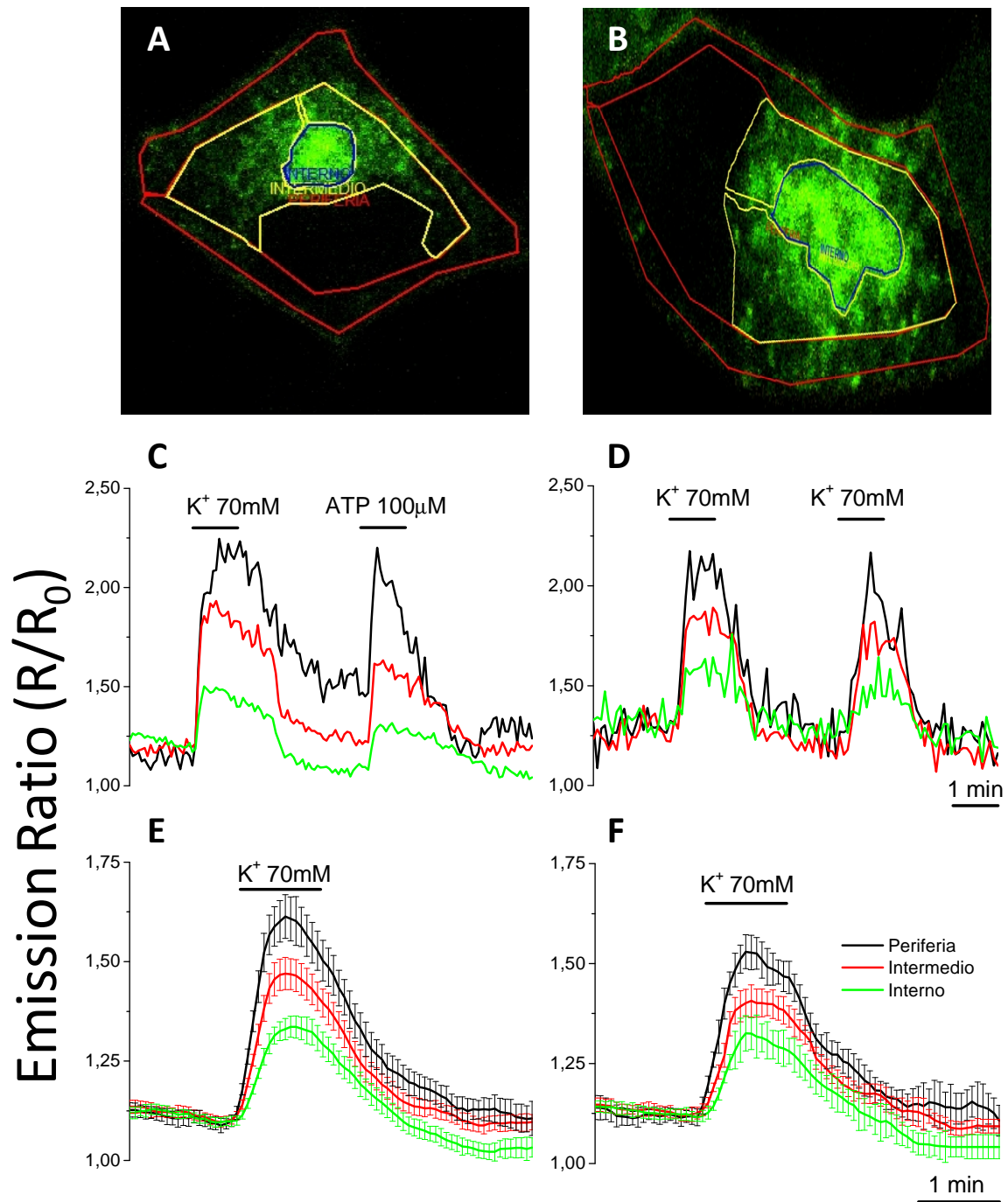
Partiendo de los registros en célula única con la sonda VAMP-GEMGECO1, se evaluó el comportamiento de la población vesicular en células PC12 frente a estímulos despolarizantes con alto  $K^+$  (**Fig. 55**) y estímulos con ATP (**Fig. 56**). El ATP actúa como ligando a través de receptores ionotrópicos P2X, que son canales no selectivos de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$ , el cual entra en la célula a través de gradiente electroquímico, o bien a través de receptores metabotrópicos P2Y, liberando  $Ca^{2+}$  vía  $IP_3$ , desde depósitos internos como el ER o los propios SG (Petit et al., 2009).

Se seleccionaron regiones concéntricas de población de vesículas según la proximidad a la membrana plasmática, evitando en la medida de lo posible acceder al contorno de la misma para minimizar las interferencias que pudiera generar la parte de la sonda anclada en la parte extracelular de la membrana plasmática, como se muestra en las imágenes tomadas (**Fig. 55 A y B; Fig. 56 A y B**). Los experimentos consistieron en dos pulsos consecutivos, bien únicamente de alto  $K^+$  o ATP, o bien pulsos consecutivos con ambos estímulos, alternados, según se muestra en las figuras correspondientes (**Fig. 55 C y D; Fig. 56 C y D**).

La despolarización con alto  $K^+$  produjo aumentos transitorios de la  $[Ca^{2+}]_{SG}$ , expresada como ratio de emisión normalizado, si bien estos eran de menor amplitud y con una cinética más lenta conforme las regiones seleccionadas estaban más distantes de la membrana plasmática. Los aumentos transitorios fueron ligeramente menores tras un segundo pulso de alto  $K^+$  (**Fig. 55 E y F**). Por su parte, los estímulos con ATP indujeron aumentos transitorios de la  $[Ca^{2+}]_{SG}$  en todas las subpoblaciones vesiculares, de menor amplitud y cinética más lenta según están se encontrasen más alejadas de la membrana plasmática, de forma similar a los estímulos con alto  $K^+$ .

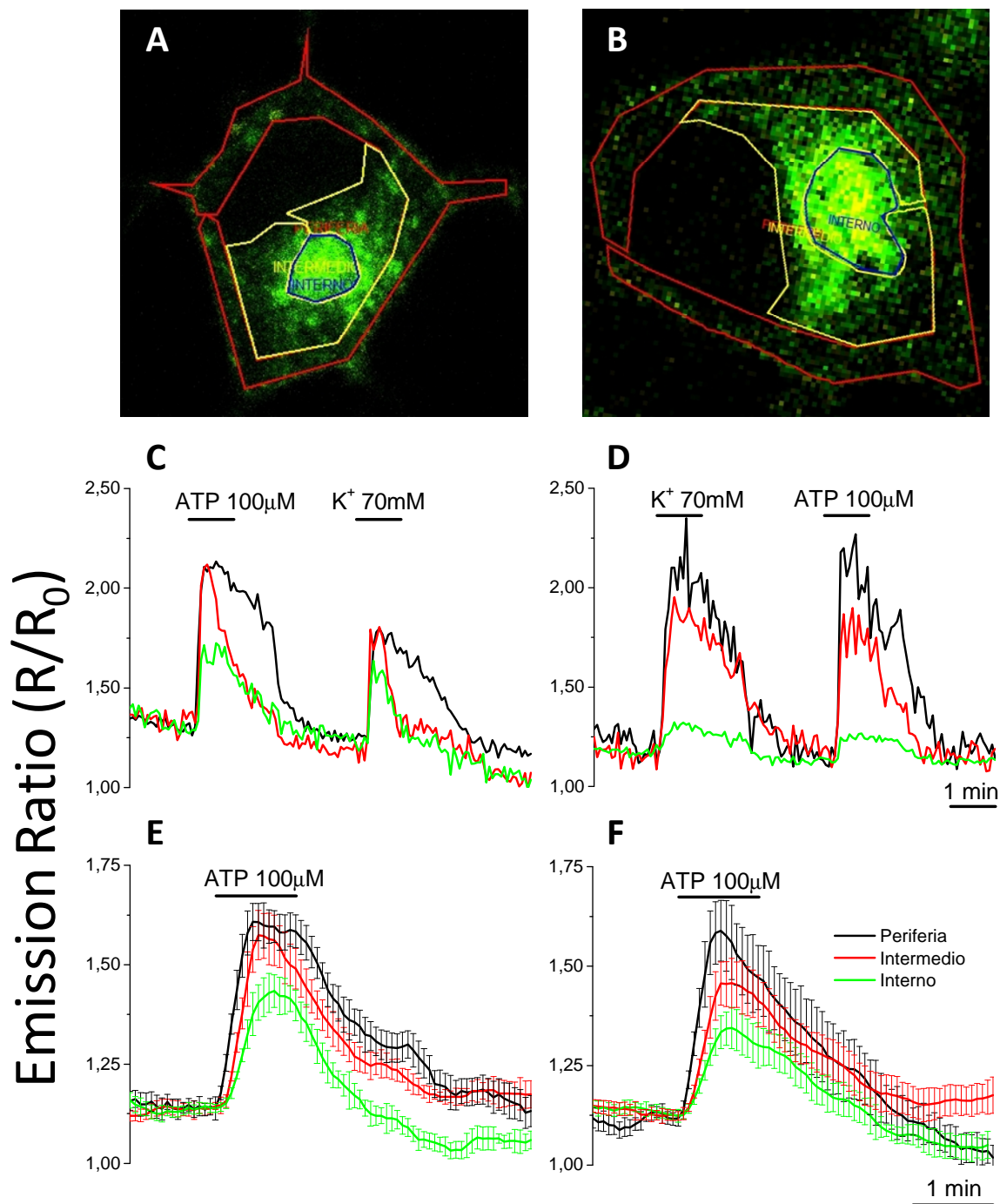
En este caso la diferencia de amplitud entre el primer y el segundo estímulo con ATP no fue tan marcada (**Fig. 56 E y F**). No se observaron diferencias significativas en el comportamiento del segundo estímulo, bien despolarización con alto  $K^+$ , o bien ATP, con respecto a la procedencia del primer estímulo. Se quiso analizar posteriormente si existían diferencias significativas para los estímulos de alto  $K^+$  y ATP tras el vaciado y posterior rellenado de  $Ca^{2+}$  de los SG.





**Fig. 55. Efecto de la despolarización con alto K<sup>+</sup> sobre la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>SG</sub> en células PC12 intactas, medido con VAMP-GEMGECO1.** Las células PC12 expresando el constructo VAMP-GEMGECO1 (48-72 horas) se dispusieron en el adaptador del sistema de perfusión (ver Material y Métodos) excitándose con un haz láser utilizando la línea de 405nm del diodo azul. La fluorescencia emitida se recogió entre 430-480nm y entre 500-550nm respectivamente (paneles A y B; fluorescencia a 500-550nm). Se inició el registro perfundiendo medio externo estándar Ca<sup>2+</sup> 1mM y, según se indica en la figura, seguidamente medio externo K<sup>+</sup> 70mM como primer estímulo (panel C) y/o segundo estímulo (panel D). Cada registro representa una región subcelular concéntrica desde la periferia (próxima a la membrana plasmática) hacia el interior. El panel E, con respecto a un primer estímulo con alto K<sup>+</sup>, y el panel F, con respecto a un segundo estímulo con alto K<sup>+</sup>, muestran la media de entre 30-50 experimentos similares de cada tipo, todos realizados a 22°C.





**Fig. 56. Efecto del ATP sobre la  $[Ca^{2+}]_{SG}$  en células PC12 intactas, medido con VAMP-GEMGECO1.** Las células PC12 expresando el constructo VAMP-GEMGECO1 se dispusieron en el adaptador del sistema de perfusión excitándose con un haz láser utilizando la línea de 405nm del diodo azul. La fluorescencia emitida se recogió entre 430-480nm y entre 500-550nm respectivamente (paneles A y B; fluorescencia a 500-550nm). Se inició el registro perfundiendo medio externo estándar  $Ca^{2+}$  1mM y, según se indica en la figura, seguidamente este mismo medio suplementado con ATP 100μM como primer estímulo (panel C) y/o segundo estímulo (panel D). Cada registro representa una región subcelular concéntrica desde la periferia (próxima a la membrana plasmática) hacia el interior. El panel E, con respecto a un primer estímulo con ATP, y el panel F, con respecto a un segundo estímulo con ATP, muestran la media de 18 experimentos similares de cada tipo, todos realizados a 22°C.

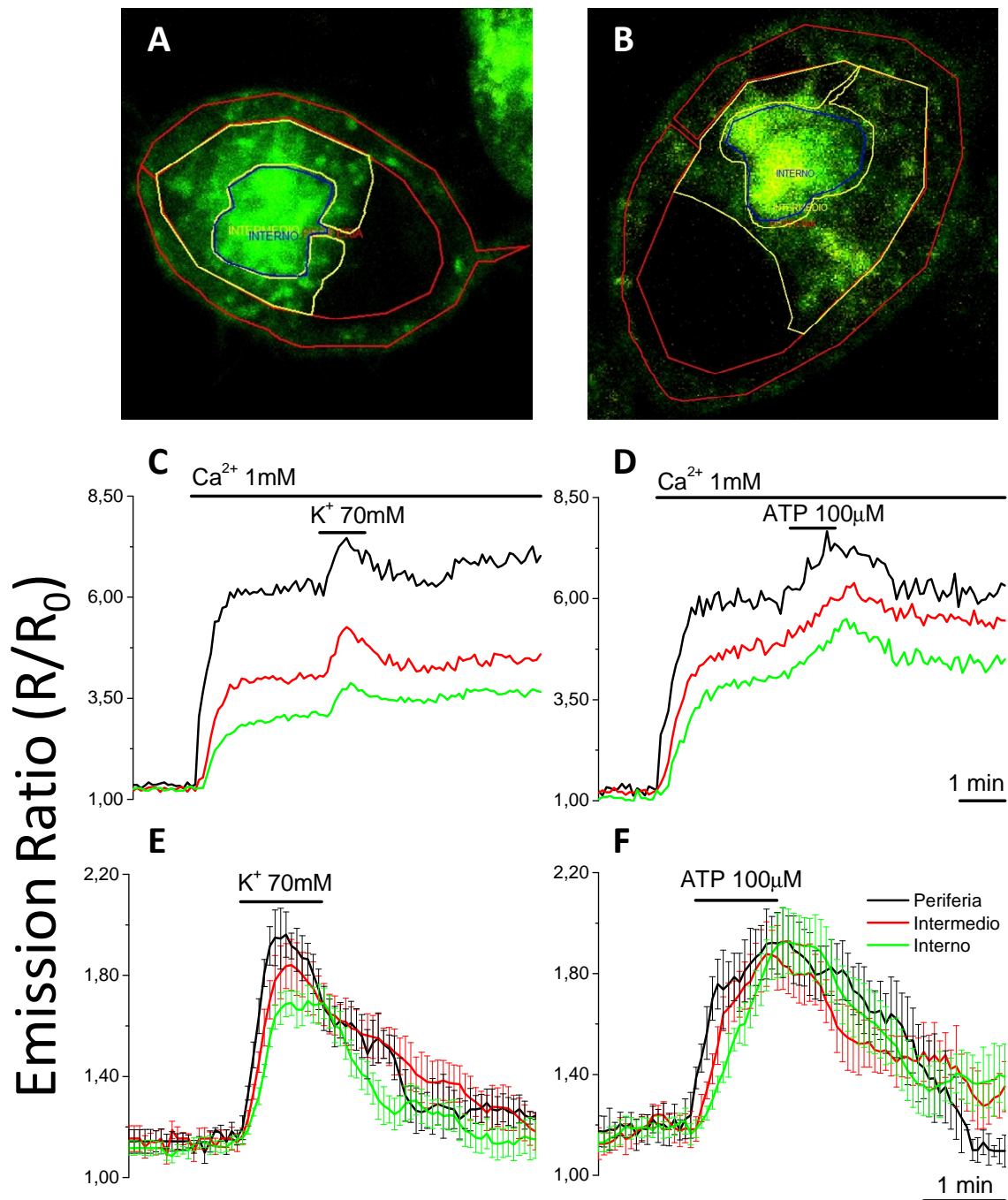
## RESULTADOS

---

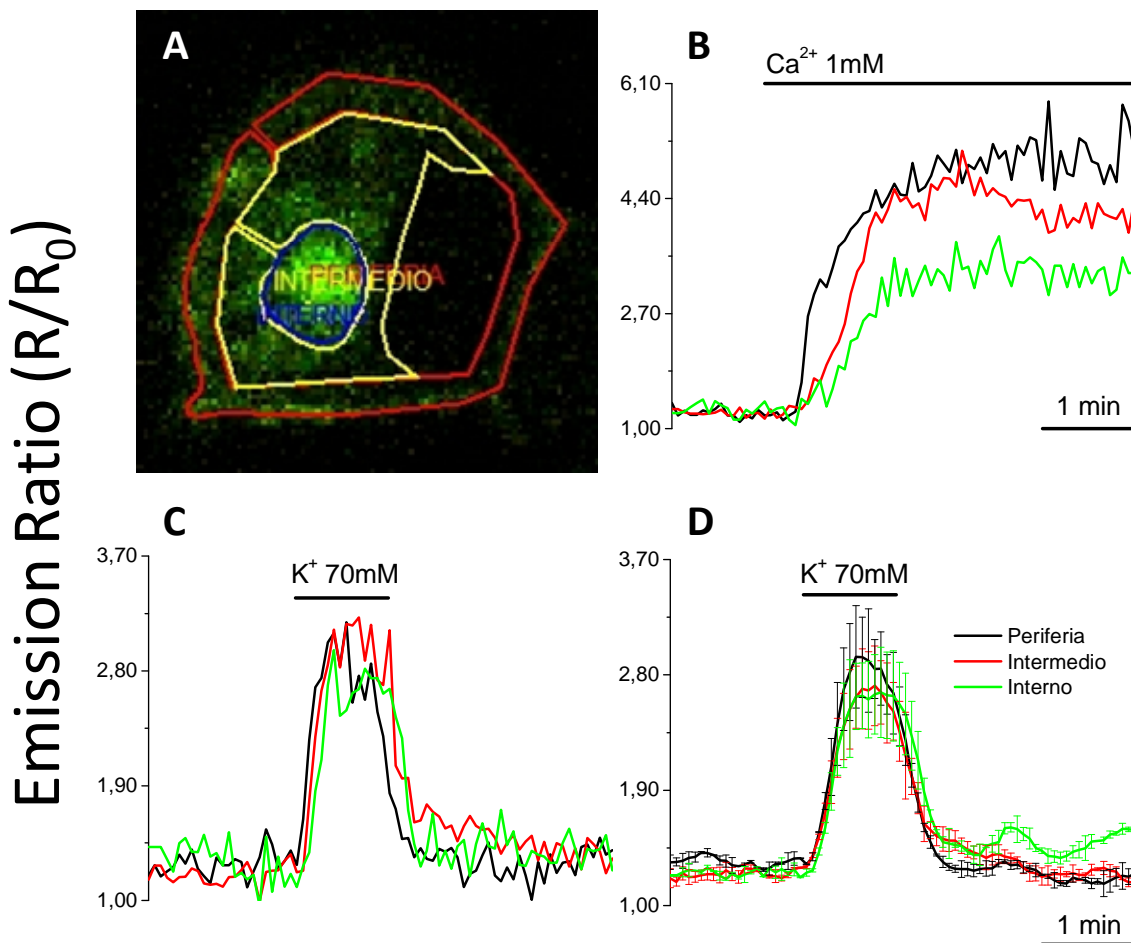
Para ello, se realizaron registros de  $\text{Ca}^{2+}$  frente a estos mismos estímulos en células PC12 depletando de  $\text{Ca}^{2+}$  los SG y rellenándolos de nuevo en el curso del experimento, al igual que se hacía en los experimentos con aequorina. Como se muestra en las **Fig. 57 C y D**, la adición de medio extracelular  $\text{Ca}^{2+}$  1mM desencadenó un aumento rápido de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$  hasta llegar a una meseta estacionaria. Este nivel de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$  alcanzado fue menor y la captación adquirió una cinética más lenta conforme las subpoblaciones de los SG distaban más de la membrana plasmática. Tras estabilizarse la captación de  $\text{Ca}^{2+}$ , se procedió a perfundir los estímulos correspondientes de alto  $\text{K}^+$  y ATP. Ambos estímulos desencadenaron aumentos transitorios de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$ , similar a lo observado en célula única sin depletar, con una tendencia a decrecer en amplitud y de cinética más lenta según las subpoblaciones vesiculares se encontraban más alejadas de la membrana plasmática, si bien esta tendencia no fue tan significativa. De hecho, no llegaron a observarse prácticamente diferencias entre las subpoblaciones vesiculares en el caso del estímulo con ATP (**Fig. 57 E y F**). En general, la amplitud del pico transitorio tras los estímulos en células depletadas y rellenadas fue ligeramente superior con respecto a la respuesta en células sin depletar, sin ser esa diferencia significativa.

En los experimentos realizados en la línea celular INS-1, las medidas de  $\text{Ca}^{2+}$  en célula única con la sonda VAMP-GEMGECO1 mostraron un comportamiento reflejo del obtenido en población con las sondas luminiscentes de aequorina (**Fig. 58**). El rellenado de  $\text{Ca}^{2+}$  de los SG en células INS-1 depletadas tuvo un comportamiento similar al observado en línea celular PC12 (**Fig. 58 B**). Sin embargo, en células INS-1E sin depleción previa, la despolarización con alto  $\text{K}^+$  generó un aumento transitorio de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$  cuya amplitud fue proporcionalmente muy superior al observado en células PC12, comparándolo con la variación de fluorescencia que se observa durante el proceso de rellenado de  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular en ambos casos. Además, no se observó diferencia significativa entre las regiones vesiculares según nos alejamos de la membrana plasmática (**Fig. 58 C y D**).

Se quiso estudiar cómo podría afectar la inhibición de la SERCA al proceso de captación de  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular, así como al aumento transitorio de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$  correspondiente a la despolarización con alto  $\text{K}^+$  y de ahí cómo afectaría a la heterogeneidad de respuesta entre las subpoblaciones vesiculares de las células.



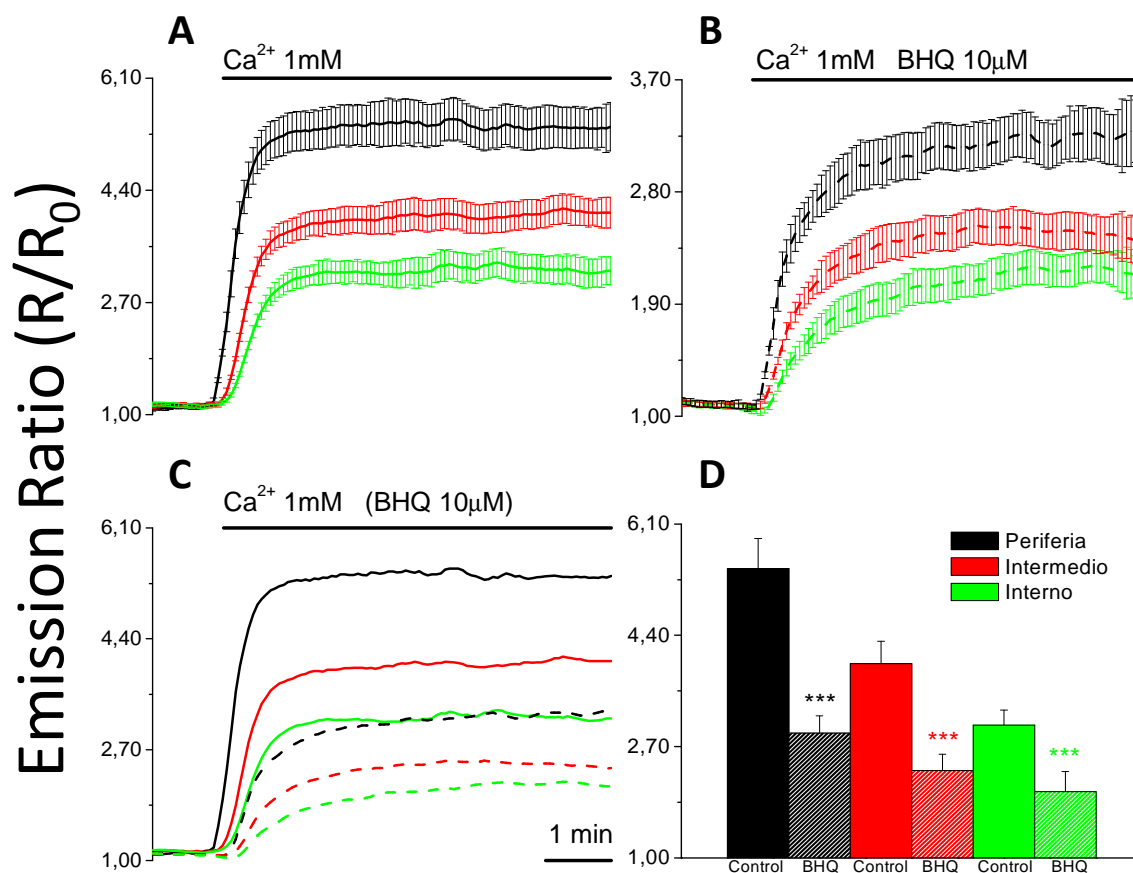
**Fig. 57. Efecto del ATP y la despolarización con alto  $K^+$  sobre la  $[Ca^{2+}]_{SG}$  en células PC12 intactas, depletadas de  $Ca^{2+}$  intravesicular, medido con VAMP-GEMGECO1.** Las células PC12 expresando el constructo VAMP-GEMGECO1 fueron depletadas de  $Ca^{2+}$ , dispuestas en el adaptador del sistema de perfusión y excitándose con un haz láser utilizando la línea de 405nm del diodo azul. La fluorescencia emitida se recogió entre 430-480nm y entre 500-550nm respectivamente (paneles A y B; fluorescencia a 500-550nm). Se inició el registro de fluorescencia en medio libre de  $Ca^{2+}$  y a continuación se perfundió medio externo estándar  $Ca^{2+}$  1mM. Tras estabilizarse la captación de  $Ca^{2+}$  se perfundió medio externo  $K^+$  70mM, o bien medio estándar  $Ca^{2+}$  1mM suplementado con ATP 100 $\mu$ M, como se indica en la figura (paneles C y D). Cada registro representa una región subcelular concéntrica desde la periferia (próxima a la membrana plasmática) hacia el interior. Los paneles E y F muestran la media de 12 experimentos similares de cada tipo, todos realizados a 22°C.



**Fig. 58. Registro de la  $[Ca^{2+}]_{SG}$  en células INS-1 intactas, medido con VAMP-GEMGECO1.** Las células INS-1 expresando el constructo VAMP-GEMGECO1 (panel A; fluorescencia a 500-550nm) fueron depletadas de  $Ca^{2+}$ , dispuestas en el adaptador del sistema de perfusión y excitadas con un haz láser utilizando la línea de 405nm del diodo azul. La fluorescencia emitida se recogió entre 430-480nm y entre 500-550nm respectivamente. Se inició el registro de fluorescencia en medio libre de  $Ca^{2+}$ , y a continuación se perfundió medio externo estándar  $Ca^{2+}$  1mM (panel B). En otros experimentos, partiendo de células INS-1 sin depletar, se inició el registro perfundiendo medio externo estándar  $Ca^{2+}$  1mM y seguidamente medio externo  $K^+$  70mM, como se indica en la figura (panel C). Cada registro representa una región subcelular concéntrica desde la periferia (próxima a la membrana plasmática) hacia el interior. El panel D muestra la media de 3 experimentos similares al representativo del panel C. Todos los registros se han realizado a 22°C.

Se diseñaron dos tipos de experimentos en función del comportamiento de la población vesicular en presencia o ausencia de  $Ca^{2+}$  inicialmente. En primer lugar, se realizaron registros de relleno de  $Ca^{2+}$  en células PC12 depletadas, en presencia o ausencia del inhibidor reversible de la SERCA BHQ (Fig. 59). Como se puede observar, existe una inhibición parcial de entorno al 50% en la captación de  $Ca^{2+}$  vesicular (Fig. 59 C). Además, la captación en presencia de BHQ, presenta una cinética más lenta y el nivel estacionario de  $[Ca^{2+}]_{SG}$  alcanzado es menor.

Según se recoge en el histograma, el efecto del BHQ en la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  fue muy significativo en todas las zonas (**Fig. 59 D**). En segundo lugar se registró la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular frente a la despolarización con alto  $\text{K}^+$  en células PC12, en presencia o ausencia de BHQ, con el fin de comprobar que el aumento transitorio de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$  en estas condiciones también está mediado por la SERCA. Puesto que no todas las células respondían a estímulos despolarizantes se probó a dar pulsos consecutivos de alto  $\text{K}^+$  tomando el primero como un control de la respuesta y el segundo realizándose con o sin inhibición previa de la SERCA (**Fig. 60 A y B**). Analizando el segundo estímulo, se apreció que, en presencia de BHQ, existió una inhibición parcial de entorno al 50-60% del aumento transitorio de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$  (**Fig. 60 C**).

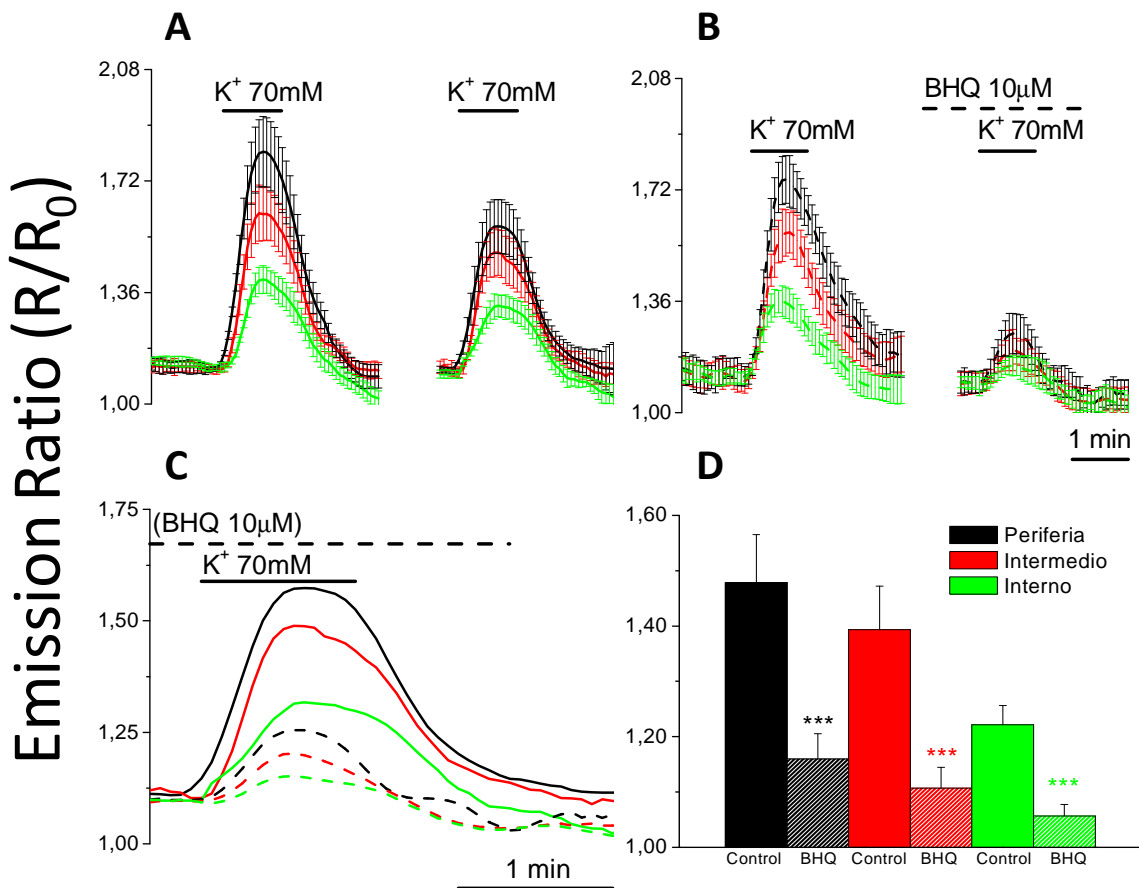


**Fig. 59. Efecto de BHQ sobre la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  por vesículas de secreción en células PC12 intactas, medido con VAMP-GEMGECO1.** Las células PC12 expresando el constructo VAMP-GEMGECO1 fueron depletadas de  $\text{Ca}^{2+}$ , dispuestas en el adaptador del sistema de perfusión y excitadas con un haz láser utilizando la línea de 405nm del diodo azul. La fluorescencia emitida se recogió entre 430-480nm y entre 500-550nm respectivamente. Se inició el registro de fluorescencia en medio libre de  $\text{Ca}^{2+}$  y, a continuación, se perfundió medio externo estándar  $\text{Ca}^{2+}$  1mM, como se muestra en el panel A. En el panel B la perfusión se realizó en presencia de BHQ 10 $\mu\text{M}$ , mostrándose ambos registros en el panel C. Cada registro representa una región subcelular concéntrica desde la periferia (próxima a la membrana plasmática) hacia el interior. Finalmente, en el panel D se representan, en forma de histograma, las medias de los valores de fluorescencia alcanzados en la meseta de las diferentes zonas, control y con BHQ. Las medias son de 20-35 experimentos similares de cada tipo, todos realizados a 22°C. (\*\*\*)  $p < 0,005$

## RESULTADOS

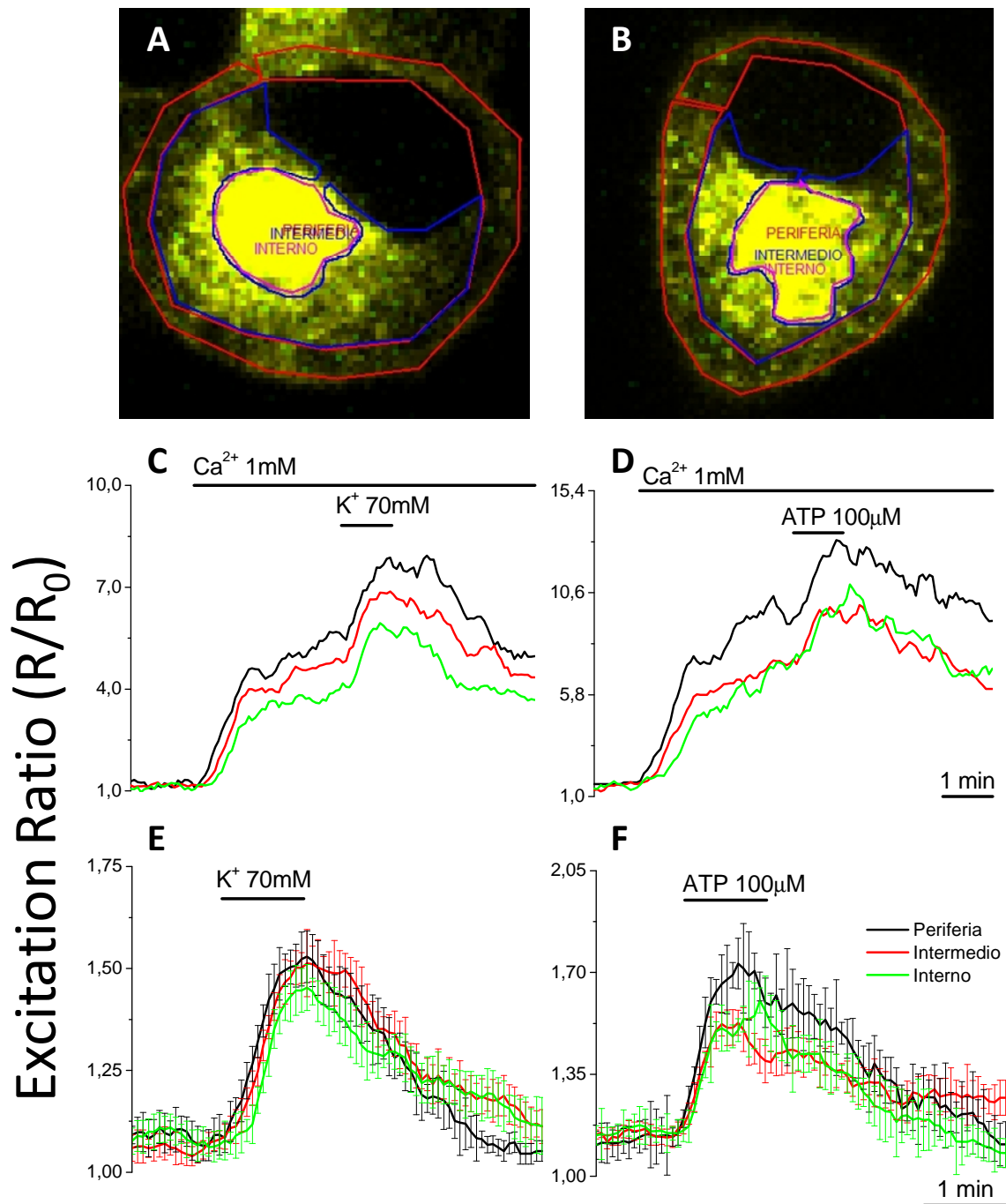
La cinética del aumento transitorio en presencia de BHQ fue también más lenta. En el histograma se refleja que el efecto del BHQ fue significativo en todas las zonas (**Fig. 60 D**). Los resultados obtenidos de la inhibición con BHQ, tanto en el proceso de llenado de  $\text{Ca}^{2+}$  como en respuesta a estímulos, ofrecieron además una demostración funcional de que la sonda VAMP-GEMGECO1 se encuentra localizada correctamente en vesículas de secreción.

Finalmente, también se realizaron registros en células PC12 con la sonda VAMP-GEXGECO1 (**Fig. 61**).



**Fig. 60.** Efecto de BHQ, sobre los picos de  $\text{Ca}^{2+}$  intragranular producidos tras la despolarización con alto  $\text{K}^+$ , en células PC12 intactas, medido con VAMP-GEMGECO1. Las células PC12 expresando el constructo VAMP-GEMGECO1 se dispusieron en el adaptador del sistema de perfusión excitándose con un haz láser utilizando la línea de 405nm del diodo azul. La fluorescencia emitida se recogió entre 430-480nm y entre 500-550nm respectivamente. Se inició el registro perfundiendo medio externo estándar  $\text{Ca}^{2+}$  1mM y seguidamente medio externo  $\text{K}^+$  70mM, realizándose pulsos consecutivos como se indica en la figura. El segundo pulso de  $\text{K}^+$  se realizó en ausencia (A) o en presencia de BHQ 10µM (B). Se muestran los registros del segundo pulso en el panel C. Cada registro representa una región subcelular concéntrica desde la periferia (próxima a la membrana plasmática) hacia el interior. Finalmente, en el panel D se representan, en forma de histograma, las medias de los valores máximos de fluorescencia alcanzados en las diferentes zonas, control y con BHQ. Las medias son de 20-25 experimentos similares de cada tipo, todos realizados a 22°C. (\*\*\*)  $p < 0,005$





**Fig. 61. Efecto del ATP y la despolarización con alto  $K^+$  sobre la  $[Ca^{2+}]_{SG}$  en células PC12 intactas, depletadas de  $Ca^{2+}$  intravesicular, medido con VAMP-GEXGECO1.** Las células PC12 expresando el constructo VAMP-GEXGECO1 (48-72 horas) fueron depletadas de  $Ca^{2+}$ , dispuestas en el adaptador del sistema de perfusión y excitadas con un haz láser utilizando la línea de 405nm del diodo azul y a 480nm con el láser supercontinuo visible. La fluorescencia emitida se recogió entre 500-575nm (paneles A y B; fluorescencia a 405nm). Se inició el registro de fluorescencia en medio libre de  $Ca^{2+}$  y, a continuación, se perfundió medio externo estándar  $Ca^{2+}$  1mM. Tras estabilizarse la captación de  $Ca^{2+}$  se perfundió medio externo  $K^+$  70mM, o bien medio estándar  $Ca^{2+}$  1mM suplementado con ATP 100 $\mu$ M, como se indica en la figura (C y D). Cada registro representa una región subcelular concéntrica desde la periferia (próxima a la membrana plasmática) hacia el interior. Los paneles E y F muestran la media de entre 6-12 experimentos similares de cada tipo, todos realizados a 22°C.

La sonda GEXGEXO1 tiene un menor rango dinámico que GEMGECO1 y mayor sensibilidad a pH. De ahí, que solo se obtuvieran registros de  $\text{Ca}^{2+}$  en células PC12 depletando los SG. No obstante, los resultados mostrados fueron consistentes con los expuestos para la sonda de  $\text{Ca}^{2+}$  VAMP-GEMGECO1 en estas mismas condiciones. La adición de medio  $\text{Ca}^{2+}$  1mM desencadenó un aumento rápido de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$ , expresada en este caso como ratio de excitación normalizado, hasta estabilizarse en una zona estacionaria de diferente amplitud y cinética entre las regiones seleccionadas conforme distaban más de la membrana celular. Frente a los estímulos de alto  $\text{K}^+$  y ATP las respuestas consisten, de igual forma, en aumentos transitorios de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$  (**Fig. 61 C y D**). En estos casos no se observó con tanta claridad la tendencia a decrecer en amplitud ni una cinética más lenta según aparecieron subpoblaciones vesiculares más alejadas de la membrana plasmática (**Fig. 61 E y F**).

Profundizando en el análisis de comportamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  entre las subpoblaciones vesiculares, se intentaron realizar registros de  $\text{Ca}^{2+}$  de una única célula expresando VAMP-GEMGECO1 o VAMP-GEXGECO1, tanto en línea celular PC12 como células INS-1. Se seleccionaron diferentes regiones celulares a mayor aumento confocal y con mayor precisión, y se estudió su respuesta frente a estímulos despolarizantes de alto  $\text{K}^+$  y ATP. Desafortunadamente, a ese nivel de resolución el elevado fotoblanqueo presente hizo que no se obtuvieran respuestas susceptibles de ser representativas.

### 3.3 Registros de calcio en gránulos de secreción efectuados con la sonda NPY-GEMGECO1.

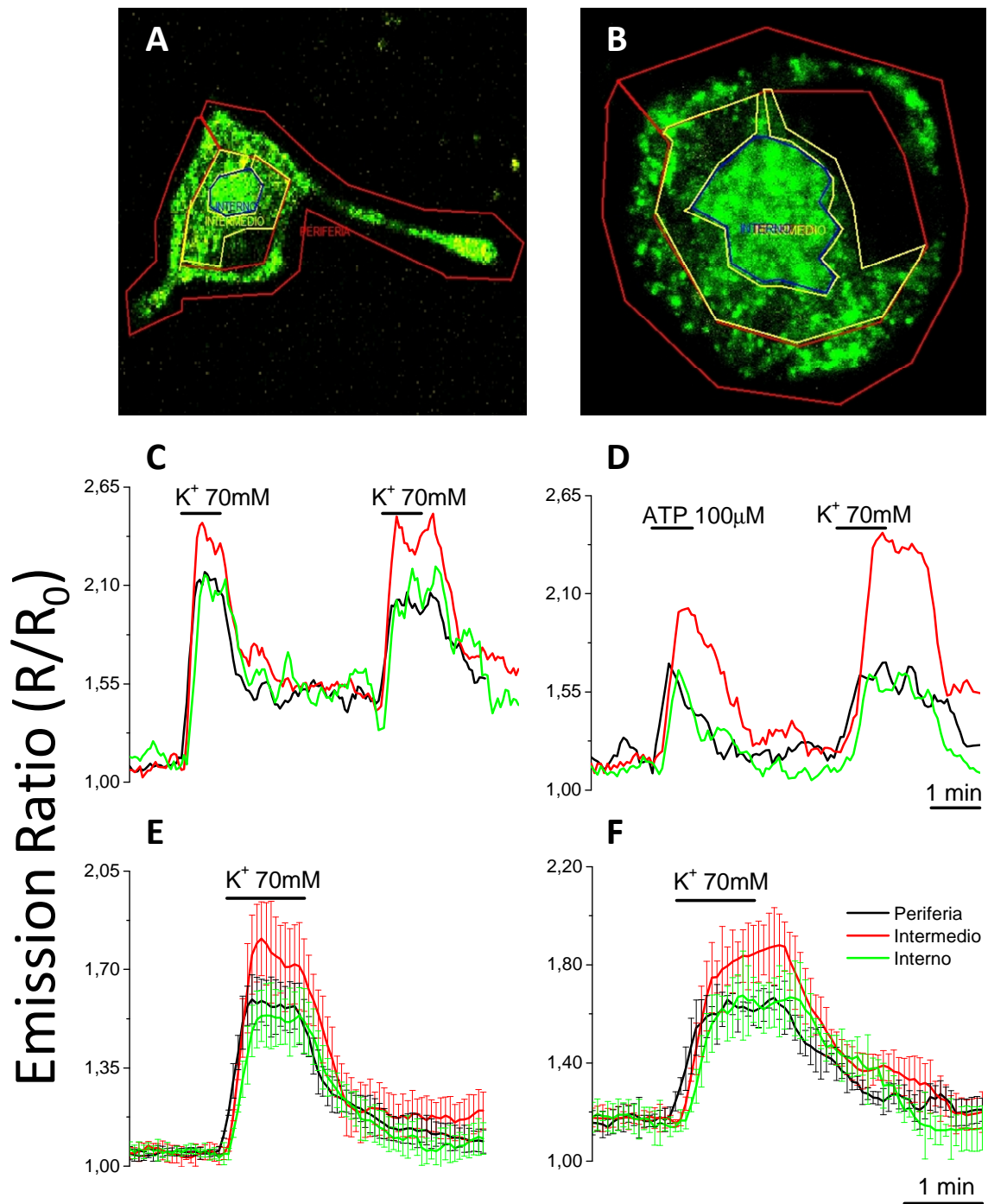
Aparte de las sondas VAMP-GEXGECO1 y VAMP-GEMGECO1, en el presente trabajo se han desarrollado las sondas de  $\text{Ca}^{2+}$  dirigidas a SG, NPY-GEXGECO1 y NPY-GEMGECO1, centrándonos exclusivamente en esta última ya que ofrece una mejor resolución en el entorno ácido de las vesículas de secreción. Por otra parte, la ventaja experimental de utilizar esta sonda frente a VAMP-GEMGECO1 es que suprime la posible interferencia de la señal exclusiva de la membrana plasmática, permitiendo así albergar a todo tipo de subpoblaciones vesiculares que antes se pudieran excluir.



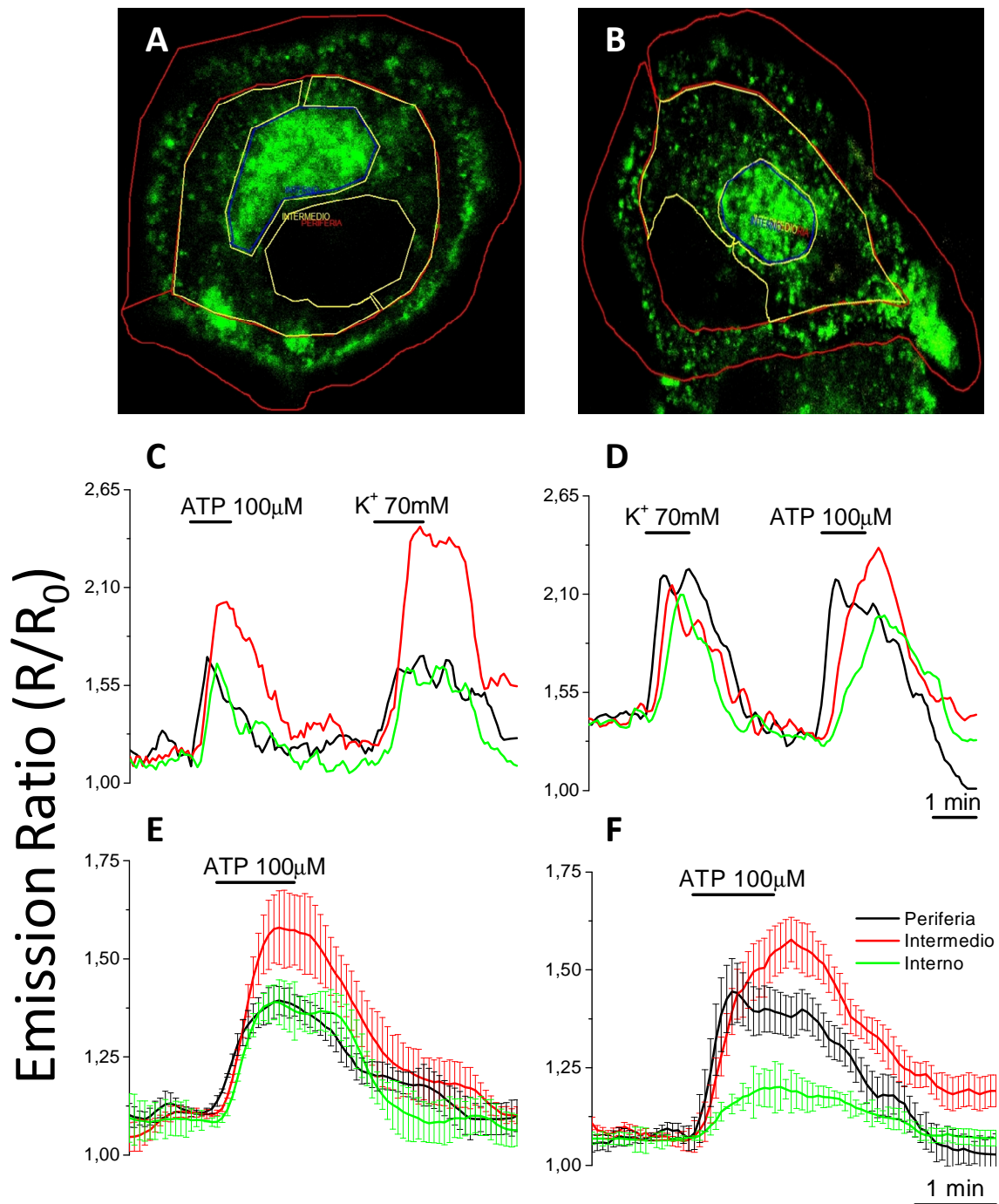
Los experimentos realizados en células PC12 fueron similares a los expuestos con la sonda VAMP-GEMGECO1, consistiendo en dos pulsos consecutivos, bien únicamente de alto  $K^+$  o ATP, o bien con ambos estímulos alternados. Los estímulos despolarizantes con alto  $K^+$  en células PC12, generaron aumentos transitorios de la  $[Ca^{2+}]_{SG}$  (**Fig. 62**). En estos casos no se consiguió observar diferencias significativas de amplitud del pico transitorio entre las subpoblaciones vesiculares, si bien parece existir una cinética más lenta conforme aumenta la distancia a la membrana plasmática. Los aumentos transitorios fueron similares tras un segundo pulso de alto  $K^+$ . Este mismo comportamiento se observó para las respuestas a estímulos con ATP (**Fig. 63**). De igual forma que en los experimentos con la sonda de  $Ca^{2+}$  VAMP-GEMGECO1 no se observaron diferencias significativas en el comportamiento del segundo estímulo con respecto al tipo del primer estímulo.

En los registros de  $Ca^{2+}$  en células PC12 previamente depletadas de  $Ca^{2+}$ , se observó un comportamiento de rellenado de  $Ca^{2+}$  vesicular similar al registrado con la sonda VAMP-GEMGECO1, alcanzándose una meseta estacionaria con diferente amplitud y cinética entre las subpoblaciones de los SG conforme nos alejamos de la membrana celular (**Fig. 64**). Los estímulos posteriores de despolarización con alto  $K^+$  y ATP desencadenaron respuestas consistentes en aumentos transitorios de la  $[Ca^{2+}]_{SG}$ , de forma similar a lo observado en células sin depletar. No obstante, la diferencia entre las subpoblaciones vesiculares, en cuanto a nivel de  $[Ca^{2+}]_{SG}$  alcanzado y cinética de captación, no fue tan acusada. La amplitud del pico transitorio tras los estímulos en células depletadas fue ligeramente superior con respecto a la respuesta en células sin depletar, sin llegar a ser significativa.

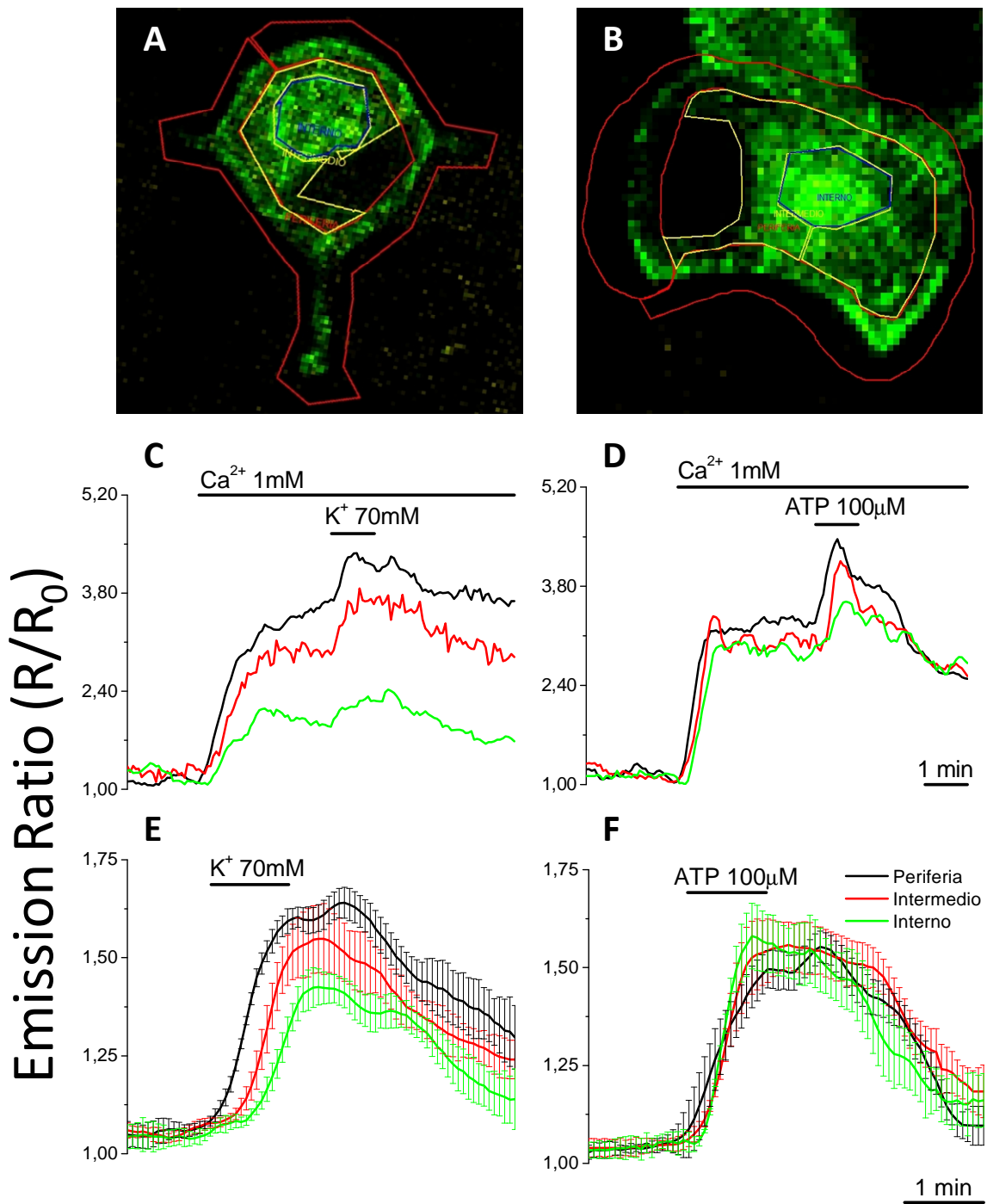
Finalmente, en células INS-1 las medidas de  $[Ca^{2+}]$  vesicular tras la despolarización con alto  $K^+$  conllevaron un gran aumento transitorio de  $[Ca^{2+}]_{SG}$  tanto en células depletadas (**Fig. 65 D**) como sin depletar (**Fig. 65 C**). Este aumento transitorio fue superior al observado en células PC12, comparándolo con la variación de fluorescencia existente en el proceso de rellenado de  $Ca^{2+}$  vesicular en ambos casos. Al igual que en las medidas con la sonda de  $Ca^{2+}$  VAMP-GEMGECO1 en estas mismas células, no se observó heterogeneidad de respuesta entre las diferentes subpoblaciones vesiculares (**Fig. 65 E y F**).



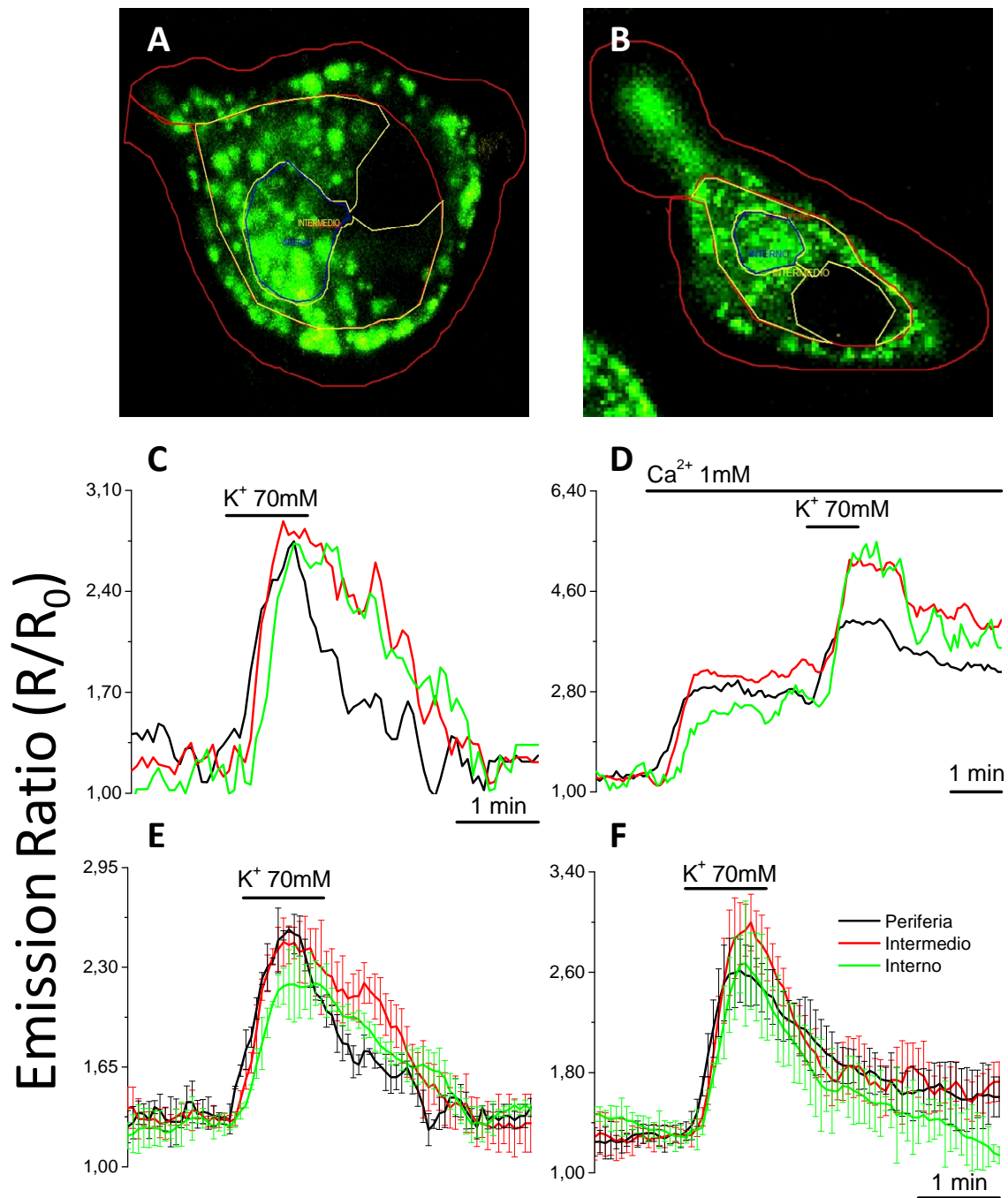
**Fig. 62. Efecto de la despolarización con alto  $K^+$  sobre la  $[Ca^{2+}]_{SG}$  en células PC12 intactas, medido con NPY-GEMGECO1.** Las células PC12 expresando el constructo NPY-GEMGECO1 (48-72 horas) se dispusieron en el adaptador del sistema de perfusión excitándose con un haz láser utilizando la línea de 405nm del diodo azul. La fluorescencia emitida se recogió entre 430-480nm y entre 500-550nm respectivamente (paneles A y B; fluorescencia a 500-550nm). Se inició el registro perfundiendo medio externo estándar  $Ca^{2+}$  1mM y, según se indica en la figura, seguidamente medio externo  $K^+$  70mM como primer estímulo (panel C) y/o segundo estímulo (panel D). Cada registro representa una región subcelular concéntrica desde la periferia (próxima a la membrana plasmática) hacia el interior. El panel E, con respecto a un primer estímulo con alto  $K^+$ , y el panel F, con respecto a un segundo estímulo con alto  $K^+$ , muestran la media de entre 4 y 5 experimentos similares de cada tipo, todos realizados a 22°C.



**Fig. 63. Efecto del ATP sobre la  $[Ca^{2+}]_{SG}$  en células PC12 intactas, medido con NPY-GEMGECO1.** Las células PC12 expresando el constructo NPY-GEMGECO1 se dispusieron en el adaptador del sistema de perfusión excitándose con un haz láser utilizando la línea de 405nm del diodo azul. La fluorescencia emitida se recogió entre 430-480nm y entre 500-550nm respectivamente (paneles A y B; fluorescencia a 500-550nm). Se inició el registro perfundiendo medio externo estándar  $Ca^{2+}$  1mM y, según se indica en la figura, seguidamente este mismo medio suplementado con ATP 100μM como primer estímulo (panel C) y/o segundo estímulo (panel D). Cada registro representa una región subcelular concéntrica desde la periferia (próxima a la membrana plasmática) hacia el interior. El panel E, con respecto a un primer estímulo con ATP, y el panel F, con respecto a un segundo estímulo con ATP, muestran la media de 3 experimentos similares de cada tipo, todos realizados a 22°C.



**Fig. 64.** Efecto del ATP y la despolarización con alto K<sup>+</sup> sobre la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>SG</sub> en células PC12 intactas, depletadas de Ca<sup>2+</sup> intravesicular, medido con NPY-GEMGECO1. Las células PC12 expresando el constructo NPY-GEMGECO1 fueron depletadas de Ca<sup>2+</sup>, dispuestas en el adaptador del sistema de perfusión y excitadas con un haz láser utilizando la línea de 405nm del diodo azul. La fluorescencia emitida se recogió entre 430-480nm y entre 500-550nm respectivamente (paneles A y B; fluorescencia a 500-550nm). Se inició el registro de fluorescencia en medio libre de Ca<sup>2+</sup> y a continuación se perfundió medio externo estándar Ca<sup>2+</sup> 1mM. Tras estabilizarse la captación de Ca<sup>2+</sup> se perfundió medio externo K<sup>+</sup> 70mM, o bien medio estándar Ca<sup>2+</sup> 1mM suplementado con ATP 100µM, como se indica en la figura (C y D). Cada registro representa una región subcelular concéntrica desde la periferia (próxima a la membrana plasmática) hacia el interior. Los paneles E y F muestran la media entre 12-14 experimentos similares de cada tipo, todos realizados a 22°C.



**Fig. 65. Efecto de la despolarización con alto K<sup>+</sup> sobre la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>SG</sub> en células INS-1 intactas, medido con NPY-GEMGECO1.** Las células INS-1 expresando el constructo NPY-GEMGECO1, depletadas de Ca<sup>2+</sup> previamente o no, se dispusieron en el adaptador del sistema de perfusión y se excitaron con un haz láser utilizando la línea de 405nm del diodo azul. La fluorescencia emitida se recogió entre 430-480nm y entre 500-550nm respectivamente (paneles A y B; fluorescencia a 500-550nm). Se inició el registro de fluorescencia en medio estándar Ca<sup>2+</sup> 1mM (C), o bien medio libre de Ca<sup>2+</sup> y a continuación medio externo estándar Ca<sup>2+</sup> 1mM (D). Tras estabilizarse la captación de Ca<sup>2+</sup> se perfundió medio externo K<sup>+</sup> 70mM, como se indica en la figura. Cada registro representa una región subcelular concéntrica desde la periferia (próxima a la membrana plasmática) hacia el interior. Los paneles E y F muestran la media entre 4-6 experimentos similares de cada tipo, todos realizados a 22°C.

## ***RESULTADOS***

---

Al igual que con las sondas VAMP-GEMGECO1 y VAMP-GEXGECO1, se intentó profundizar en el comportamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  entre las diferentes subpoblaciones vesiculares, mediante registros de  $\text{Ca}^{2+}$  de una única célula expresando NPY-GEMGECO1, tanto en línea celular PC12 como células INS-1, mas enfocados en diferentes regiones vesiculares seleccionadas de forma más precisa y a mayor aumento confocal. Desgraciadamente los resultados no fueron concluyentes, debido al mismo problema con el fotoblanqueo, presente a ese nivel de resolución.



# *DISCUSIÓN*

---





## 1. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS SONDAS BIOLUMINISCENTES Y FLUORESCENTES.

Para el estudio de la dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$  de los gránulos de secreción (SG) en población celular en nuestro laboratorio, se han sintetizado y utilizado diferentes sondas de  $\text{Ca}^{2+}$  basadas en aequorina tanto ancladas a la cara interna de la membrana (VAMP-mAEQ) como solubles en la matriz densa de los SG (CgA-mAEQ y NPY-mAEQ). Para verificar la correcta localización de estas sondas en las vesículas de secreción se estudió la distribución celular mediante imagen en microscopía confocal de las sondas fluorescentes VAMP-EGFP, CgA-EGFP y NPY-EGFP respectivamente.

Resultados previos en nuestro laboratorio así como de otros autores demostraron la localización tanto de VAMP-EGFP como VAMP-mAEQ en vesículas de secreción, fundamentalmente LDCV (*Large Dense Core Vesicles*) en las líneas celulares neuroendocrinas MIN6 (Mitchell et al., 2001; 2003), PC12 (Moreno et al., 2005; 2010; SantoDomingo et al., 2010), INS-1 e INS-1E (Iezzi et al., 2005; SantoDomingo et al., 2010) y cromafines (Allersma et al., 2004; SantoDomingo et al., 2008). Por otra parte, tanto CgA como NPY se localizan exclusivamente en LCDV (Wegrzyn et al., 2007) y de ahí el uso extendido de las sondas fluorescentes CgA-EGFP y NPY-EGFP en la visualización de los SG (Kaether et al., 1995; Lang et al., 1997; Inomoto et al., 2007; Ravier et al., 2008; Moreno et al., 2010). Las imágenes de microscopía confocal de células INS-1 e INS-1E expresando VAMP-EGFP, CgA-EGFP y NPY-EGFP, mostraron un patrón granular típico con una pequeña fracción fluorescente asociada a la membrana plasmática en el caso de la expresión de VAMP-EGFP. No obstante, es difícil excluir la presencia de una mínima porción de estas sondas en otros compartimentos de la vía de secreción, bien retículo endoplásmico (ER) y/o complejo de Golgi (GC).

En el análisis funcional los niveles de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]$ ) obtenidos con CgA-mAEQ y NPY-mAEQ fueron similares a los obtenidos con VAMP-mAEQ, y diferentes a los de cualquier otro compartimento celular susceptible de almacenar  $\text{Ca}^{2+}$ .

El uso de las sondas CgA-mAEQ y NPY-mAEQ, dirigidas a la matriz de los SG, supuso además una ventaja experimental con respecto a VAMP-mAEQ dirigida a la cara interna de la membrana de los SG, ya que suprimió la necesidad de dar el pulso previo de  $\text{La}^{3+}$  que elimina la luminiscencia de la aequorina anclada en la parte externa de la membrana plasmática. Aunque el  $\text{La}^{3+}$  es en principio un catión impermeable a la membrana celular, no se puede excluir completamente que pequeñas cantidades del mismo puedan acceder al interior de la célula e interferir con los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  (Szász et al., 1978). La eliminación completa de la luminiscencia de la membrana plasmática requiere una incubación con concentraciones de  $\text{La}^{3+}$  en el rango de milimolar durante más de 5 minutos, lo que alarga considerablemente el tiempo de experimentación.

Otro objetivo del presente trabajo ha sido la posibilidad de realizar un estudio de la dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$  de los SG mediante registro de fluorescencia en célula única. Se diseñaron para este propósito las sondas VAMP-rtPericam, CgA-rtPericam y NPY-rtPericam y las sondas VAMP-GEMGECO1, VAMP-GEXGECO1, VAMP-RGECO1, CgA-GEMGECO1, CgA-GEXGECO1, CgA-RGECO1, NPY-GEMGECO1, y NPY-GEXGECO1.

Las imágenes de microscopía confocal de células PC12 expresando la sonda VAMP-rtPericam, mostraron una señal fluorescente de un posible patrón granular pero de muy baja intensidad y sin señal en la membrana plasmática. Una de las principales desventajas de las sondas de  $\text{Ca}^{2+}$  basadas en YFP es su sensibilidad a variaciones de pH (Rudolf et al., 2003; Day & Davidson, 2009). Sin embargo, la alcalinización del medio vesicular con FCCP no desencadenó aumento de la señal fluorescente a diferencia de lo observado en células PC12 expresando VAMP-EGFP (SantoDomingo et al., 2008) y la adición de GPN descartó que la señal se debiera a un componente lisosomal.

En vista de estos resultados, podría ocurrir que la sonda VAMP-rtPericam se empaquetara en el ER pero que perdiera la funcionalidad durante el proceso de formación de las vesículas en el GC. No obstante, bloqueando el transporte proteico al GC mediante la incubación de las células PC12 con BrA tampoco se observó aparición de fluorescencia en el ER.

Algunos autores han propuesto que determinados sensores basados en la proteína cp-Venus, y por tanto cp-YFP, no se expresan correctamente en ER y, de ahí, que tampoco en otros compartimentos de la propia vía de secreción (Palmer & Tsien, 2006). En cuanto al origen de la señal apreciada en las imágenes de confocal, nuestra opinión es que lo más probable es que fuera debida a fenómenos de auto-fluorescencia de los SG en los cultivos celulares.

Al estudiar la expresión de NPY-rtPericam en células PC12 las imágenes de microscopía confocal mostraron una fuerte señal correspondiente a un patrón reticular, sin presencia de ningún patrón de tipo granular en contra de lo que cabría esperar. Por otra parte, en células PC12 que expresaban el constructo NPY-EGFP se observó una pequeña pero no despreciable población (20-30%) con este mismo patrón reticular. Se ha propuesto que la aparición de este patrón reticular y similares podría deberse a un plegamiento aberrante de la propia EGFP (Nagai et al., 2002). Otros autores, sin embargo, afirman que dicho patrón reticular puede tener un origen mitocondrial en base a la existencia de una posible secuencia de inicio de traducción *kozak-2*, dentro de la secuencia codificante del propio NPY humano. La traducción de dicha señal *kozak-2* generaría un péptido para la localización en el espacio intermembrana de la mitocondria (Kaipio et al., 2005). En la consiguiente expresión de NPY-EGFP, el porcentaje de población celular con EGFP distribuida con patrón granular o mitocondrial dependería del propio tipo celular. En base a los resultados de colocalización del NPY-EGFP con el colorante de mitocondria *MitoTracker Deep Red* obtenidos, apoyamos esta segunda hipótesis. Las implicaciones celulares que conllevan la aparición del fragmento NPY-mitocondrial no se conocen con claridad, si bien determinados autores coinciden en que dicho proceso se desencadena en condiciones patológicas (Kaipio et al., 2009). Se ha observado que el fragmento NPY-mitocondrial despolariza la mitocondria (Brun et al., 2006), y también se ha sugerido que pueda actuar abriendo el poro de transición de permeabilidad (PTP). En cualquiera de los casos, la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial se vería afectada, conllevando en último término a la apoptosis celular (Tsujiimoto et al., 2006). La supresión de la secuencia *kozak-2* del NPY eliminó la localización mitocondrial, obteniéndose una ausencia total de expresión del constructo NPY-rtPericam así como la desaparición del porcentaje de población celular que expresaba NPY-EGFP con patrón reticular. Se garantizó así que las medidas de  $[\text{Ca}^{2+}]$  con este constructo modificado se realizaran de manera exclusiva en vesículas de secreción.

Por otra parte, de los constructos con sondas de  $\text{Ca}^{2+}$  GECO desarrollados en el presente trabajo y expresados en las líneas celulares PC12 e INS-1, tan solo VAMP-RGECO1, VAMP-GEMGECO1, VAMP-GEXGECO1, NPY-GEMGECO1 y NPY-GEXGECO1 mostraron un patrón adecuado de distribución subcelular en los SG. Ninguna de las sondas fluorescentes de  $\text{Ca}^{2+}$  con la secuencia de direccionamiento Cromogranina A (CgA) se expresaron correctamente, al contrario que las sondas CgA-EGFP y CgA-mAEQ. A diferencia de las señales de localización VAMP y NPY, CgA tiene un alto peso molecular (50KDa) y los constructos de rtPericam y GECO generados con esta secuencia de localización (entorno a los 100KDa) puede que se empaqueten con mayor dificultad a lo largo de la vía de secreción. Además, se ha descrito que tanto CgA como CgB tienden a autoagregarse en entornos ácidos y a altas  $[\text{Ca}^{2+}]$  como las que están presentes en el lumen del complejo *trans*-Golgi (Taupenot et al., 2003), lo que podría dificultar aun más el correcto empaquetamiento de estas sondas de  $\text{Ca}^{2+}$ . De hecho, bajo nuestras condiciones experimentales, la tasa de expresión del constructo CgA-EGFP fue ligeramente menor, comparada con la expresión de VAMP-EGFP y NPY-EGFP tanto en la línea celular PC12 como en células INS-1.

Las imágenes de células PC12 expresando VAMP-RGECO1 mostraron un patrón granular poco definido con una baja intensidad de fluorescencia. Se han descrito problemas similares con constructos de RGECO1 dirigidos al ER, sugiriendo que puede deberse a interacciones competitivas de los dominios proteicos CaM y M13 con proteínas endógenas de la vía de secreción (Wu et al., 2014). Con el fin de solventar el problema del empaquetamiento celular del constructo VAMP-RGECO1, se optó por administrar un medio suplementado con glicerol a los cultivos celulares que expresaran dicha sonda de  $\text{Ca}^{2+}$ . *In vitro* se sabe que el glicerol estabiliza la conformación de las proteínas e incrementa la tasa de replegamiento en el análisis electroforético (Sawano et al., 1992). *In vivo* el grupo del Dr. Kopito demostró que en células HEK que presentaban la mutación  $\Delta\text{F508}$ , más común en la fibrosis quística, el tratamiento celular con glicerol al 10%(v/v) revertía este fenotipo ya que aumentaba la tasa de plegamiento y expresión del canal de  $\text{Cl}^-$  asociado a la mutación (Sato et al., 1996). Con este mismo planteamiento, se han podido subsanar a nivel celular diferentes patologías asociadas a plegamiento aberrante de proteínas (LaConte et al., 2014).

En el presente trabajo la incubación con un medio celular suplementado con 5%(v/v) de glicerol mejoró de forma reversible tanto la tasa de expresión como la distribución granular de la sonda VAMP-RGECO1 en células PC12. Si bien es cierto que la mejora fue superior con la incubación en un medio con 10%(v/v) de glicerol, también aumentó la toxicidad asociada al mismo.

Frente a los resultados observados con la sonda VAMP-RGECO1, los constructos VAMP-GEMGECO1, VAMP-GEXGECO1, NPY-GEMGECO1 y NPY-GEXGECO1 mostraron una distribución granular con una alta tasa de expresión, tanto en la línea celular PC12 como en células INS-1. De forma similar a lo visto en la expresión de VAMP-EGFP, los constructos con la señal de localización VAMP (VAMP-GEMGECO1 y VAMP-GEXGECO1) presentaron una señal asociada a la membrana plasmática, en algunos casos más intensa que la observada en los ensayos con la sonda VAMP-EFGP. La localización de estas sondas en compartimentos acídicos se ha puesto de manifiesto con el constructo TiVAMP-GEMGECO1, dirigido a endosomas en células MIN6 (Albrecht et al., 2015). El tratamiento previo con glicerol no supuso una mejora significativa tanto en la localización como en la funcionalidad observada en los registros de  $\text{Ca}^{2+}$  obtenidos.

## 2. DINÁMICA DEL CALCIO VESICULAR EN POBLACIÓN CELULAR DE LAS LINEAS NEUROENDOCRINAS PC12, INS-1 E INS-1E.

---

La dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$  en los SG es un tema de estudio relativamente reciente dentro de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  subcelular. Gracias a la sonda de  $\text{Ca}^{2+}$  VAMP-mAEQ, se han podido determinar los mecanismos de captación y liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  vesiculares en diversas líneas celulares, tales como MIN6 (Mitchell et al., 2001; 2003), INS-1E (Iezzi et al., 2005), PC12 e INS-1 (Moreno et al., 2005; SantoDomingo et al., 2010) y células cromafines bovinas (SantoDomingo et al., 2008). En nuestro laboratorio se determinó que el uso de celenteracina nativa y la reducción de la temperatura de trabajo a 22°C, utilizando la sonda de aequorina mutada VAMP-mAEQ permitían monitorizar adecuadamente la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$ . El uso de las sondas CgA-mAEQ y NPY-mAEQ desarrolladas en el presente trabajo supuso un acortamiento considerable del tiempo de experimentación, de forma que fue posible realizar registros de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$  en condiciones más fisiológicas, aumentando la temperatura de trabajo a 37°C. A 22°C la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  por los SG es un proceso relativamente lento (Clemente & Meldolesi., 1975) y el aumento de la temperatura incrementó la cinética del proceso sin verse afectado el nivel de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$  alcanzado.

No obstante, este proceso de captación de  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular a la temperatura fisiológica sólo se pudo observar con detalle en las preparaciones de células INS-1 e INS-1E, debido a la mayor expresión de la sonda de aequorina en estas células en comparación con la línea celular PC12. Una mayor luminiscencia total se reflejó en una mayor sensibilidad en la monitorización de la dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que permitió apreciar mejor el fenómeno de captación de  $\text{Ca}^{2+}$  por las vesículas y el nivel estable de  $\text{Ca}^{2+}$  en su interior, minimizando los problemas derivados del consumo de aequorina. Así pues, la elección del tipo celular de trabajo fue otro aspecto crítico a tener en cuenta a la hora de realizar estos estudios.

Otro hecho significativo es que el nivel estable de  $[Ca^{2+}]_{SG}$  medido con CgA-mAEQ fue un 30-50% inferior respecto al medido con NPY-mAEQ, si bien los flujos de  $Ca^{2+}$  vesicular tienen un comportamiento similar. Puesto que los valores de  $[Ca^{2+}]_{SG}$  medidos en células PC12, INS-1 e INS-1E con la sonda NPY-mAEQ son similares a los obtenidos con VAMP-mAEQ, esta diferencia radica en la utilización de la sonda CgA-mAEQ. Las cromograninas, y en especial CgA, representan un 40% de las proteínas solubles vesiculares y juegan un papel esencial en la agregación de la gran cantidad de solutos presentes en la matriz de los SG, entre ellos  $Ca^{2+}$  (Domínguez et al., 2012).

Las cromograninas, con una  $K_d$  entre 1.5 y 4mM, son capaces de acumular 50-55 moles de  $Ca^{2+}$  por mol de proteína (Yoo, 2010). De hecho, la concentración de calcio total existente en los SG, entre 20-40mM (Winkler & Westhead, 1980) es 1000 veces superior a la  $[Ca^{2+}]_{SG}$  medida. Además tanto CgA como CgB muestran una tendencia a auto-agregarse en entornos con pH ácido y altas  $[Ca^{2+}]$ , condición necesaria para que ocurra la granulogénesis en el *trans*-Golgi (Koshimizu et al., 2010). Con estos datos es de suponer que la sonda CgA-mAEQ pueda localizarse en un “micro-entorno” de la matriz de los SG, en donde la  $[Ca^{2+}]$  se encuentre tamponada. Alternativamente, puede también ocurrir que la CgA, una proteína grande de 66kD, interaccione con la mAEQ que tiene ligada a ella y altere ligeramente su afinidad por  $Ca^{2+}$ . Un argumento a favor de esta explicación es que la cinética de  $[Ca^{2+}]$  medida por la CgA-mAEQ es muy similar a la que miden el resto de sondas, lo que sugiere que está midiendo en el mismo compartimento.

Los registros de rellenado de  $Ca^{2+}$  en los SG consistieron en un aumento transitorio de la  $[Ca^{2+}]_{SG}$  seguido de un proceso de acumulación más lento, especialmente notable en las células INS-1 e INS-1E. Una explicación a este llenado bifásico puede encontrarse en la heterogeneidad de la población de SG en términos de velocidad de captación de  $Ca^{2+}$ . Según esta hipótesis, una parte de las vesículas captaría  $Ca^{2+}$  más rápidamente que el resto. En esa población de vesículas la  $[Ca^{2+}]$  aumenta más rápidamente, produciendo un consumo acelerado de la sonda. Mientras tanto, el nivel de  $[Ca^{2+}]$  sube más lentamente en el resto de la población vesicular, generando la segunda subida. La meseta final, por lo tanto, correspondería al nivel estable de  $[Ca^{2+}]$  en esta segunda población vesicular.

Esta compartimentalización vesicular podría corresponder a diferentes tipos de gránulos de secreción y/o diferentes estados de maduración de los mismos (SantoDomingo et al., 2010). Así mismo, no podemos descartar que una parte de la sonda esté aún en compartimentos anteriores de la ruta de la secreción con niveles superiores de  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, aun en este caso, gracias a que la aequorina de este compartimento se consume más rápidamente, las medidas obtenidas después, cuando la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$  está ya en estado estacionario, deben corresponder únicamente a la población vesicular.

Los resultados del presente trabajo confirman que el proceso de acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en los SG de células INS-1 e INS-1E, al igual que en la línea celular PC12 y células cromafines bovinas, tiene lugar mayoritariamente a través de ATPasas de tipo SERCA (Mahapatra et al., 2004; SantoDomingo et al., 2008; 2010). La hipótesis de acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en las vesículas de secreción a través de ATPasas de  $\text{Ca}^{2+}$  es la más habitual, numerosos estudios ponen de manifiesto la existencia de este mecanismo (Fossier et al., 1998; Mitchell et al., 2001; Duman et al., 2006; Rosado, 2011). Sin embargo, resulta llamativo encontrar que la principal bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  responsable de la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en las vesículas es de tipo SERCA, sensible a tapsigargina y BHQ. Medidas de acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en distintos compartimentos del aparato de Golgi muestran que las bombas de tipo SERCA van siendo sustituidas por bombas de tipo SPCA, insensibles a tapsigargina y BHQ, a medida que se avanza por los distintos subcompartimentos del aparato de Golgi, a lo largo del *cis*-Golgi, *medial*-Golgi y *trans*-Golgi (Lissandron et al., 2010; Pizzo et al., 2011; Aulestia et al., 2015).

No obstante, datos recientes muestran que hay un subcompartimento del *trans*-Golgi que acumula  $\text{Ca}^{2+}$  a bajo nivel (50 $\mu\text{M}$ ) pero mediante bombas de tipo SERCA (Aulestia et al., 2015). Nuestros datos sugieren que la población vesicular podría proceder de este subcompartimento del *trans*-Golgi, dado que tanto los valores de  $[\text{Ca}^{2+}]$  medidos como el mecanismo de acumulación son similares. Por otro lado, aunque estudios proteómicos realizados en células INS-1E no detectaron proteínas transportadoras de  $\text{Ca}^{2+}$  en las vesículas de secreción (Brunner et al., 2007), estudios posteriores en células NIT-1 demostraron la presencia de SERCA2 en la membrana de las vesículas de secreción (Lee et al., 2009).



Los efectos sobre la  $[Ca^{2+}]_{SG}$  de la inhibición de la V-ATPasa de  $H^+$  con bafilomicina, o de abolición del gradiente protónico con FCCP, sugieren también que existe otra vía de acumulación de  $Ca^{2+}$  de menor importancia, que probablemente tendría lugar a través un intercambiador  $Ca^{2+}/H^+$  (Goncalves et al., 2000). No obstante, este sistema de acumulación tiene poca afinidad por  $Ca^{2+}$  y podría estar más bien implicado en liberación de  $Ca^{2+}$  vesicular por cambios en el gradiente de protones (Camacho et al., 2008).

En la literatura se han descrito numerosos sistemas de liberación de  $Ca^{2+}$  vesicular a través de la estimulación con diferentes agonistas. Los principales sistemas de liberación de  $Ca^{2+}$  de los SG descritos en cultivos de células neuroendocrinas son los receptores de  $IP_3$  ( $IP_3R$ ) y de rianodina (RyR). La presencia de  $IP_3R$  en las vesículas de secreción ha sido objeto de debate a lo largo del tiempo (Yoo & Albanesi, 1990; Huh et al., 2005; Endo et al., 2006; Pouli et al., 1998). Diversos estudios evidencian la presencia de los tres tipos de  $IP_3R$  en los SG de células cromafines. De hecho, en torno al 60% de los  $IP_3R$  de la célula se localizarían allí (Huh et al., 2005), llegándose a postular incluso que su actividad podría estar modulada por interacciones con CgA y CgB (Yoo, 2000; Huh et al., 2005; Yoo & Hur, 2012). De igual forma, se ha detectado la presencia de  $IP_3R$  en vesículas de secreción de células secretoras de somatostatina (Blondel et al., 1994; 1995). Sin embargo, otros autores desmienten esta hipótesis (Mitchell et al., 2001; 2003; Endo et al., 2006). En nuestro laboratorio tanto datos previos (SantoDomingo et al., 2010) como los de este trabajo muestran que la estimulación con  $IP_3$  de células PC12, INS-1 e INS-1E conduce a una disminución rápida y transitoria de la  $[Ca^{2+}]_{SG}$  y, por tanto, sugieren la presencia de  $IP_3R$  en la membrana de los SG.

En el caso de células INS-1 intactas estimuladas con carbacol, los efectos bifásicos que se producen se pueden explicar por la liberación masiva de  $Ca^{2+}$  de otros compartimentos como el ER, que estimularía la captación de  $Ca^{2+}$  en las vesículas. Conviene mencionar aquí que el  $IP_3$  también es capaz de movilizar  $Ca^{2+}$  del subcompartimento del *trans*-Golgi que dispone de bombas SERCA (pero no del compartimento que expresa SPCA, Aulestia et al., 2015), lo que apoya también la hipótesis de que las vesículas de secreción podrían proceder de este subcompartimento.

Por otra parte, existen también evidencias de la presencia de RyR en los SG de diversos cultivos celulares. Se ha demostrado que la cafeína, agonista no fisiológico de RyR, induce liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular en células INS-1 e INS-1E así como en línea celular PC12, células cromafines bovinas, y células MIN6 (Mitchell et al., 2001; SantoDomingo et al., 2008; 2010). De nuevo, la aparición de varios tipos de respuestas transitorias o bifásicas en la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$  de células PC12 e INS-1 tras la adición de cafeína sugiere la participación de otros sistemas de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en distintos compartimentos. En cuanto al agonista ADP ribosa cíclica (cADPR), existe controversia sobre su efecto como activador de RyR. Se ha demostrado liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular mediada por cADPR en gránulos de zimógeno y células MIN6 (Gerasimenko et al., 1996; 2006; Mitchell et al., 2001), pero no así en células cromafines, PC12 e INS-1 (SantoDomingo et al., 2008; 2010). En el presente trabajo la estimulación con cADPR en células INS-1E desencadenó dos tipos de respuestas: Una disminución transitoria y una respuesta bifásica consistiendo en un aumento con posterior disminución de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$ . Una posible explicación a esta respuesta bifásica podría ser que predominase primeramente una liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de otros depósitos sensibles a cADPR, bien ER o depósitos acídicos, siendo éste a continuación captado por los gránulos a través de bombas tipo SERCA. Estudios recientes sugieren también que el efecto primario de la cADPR podría ser una estimulación de la actividad SERCA, de manera que posteriormente el mayor acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  en el orgánulo fuera el responsable de producir una mayor liberación (Yamasaki-Mann et al., 2009). En nuestro caso, este último efecto parece el más probable, ya que no se ha observado ninguna liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del ER mediada por cADPR en células INS-1E.

Otro novedoso mecanismo de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular es el mediado por el agonista ácido nicotínico-adenín-dinucleótido fosfato (NAADP). Se ha demostrado que el NAADP induce liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular en células PC12, gránulos de zimógeno y células MIN6 (Mitchell et al., 2003; Brailoiu et al., 2006; Gerasimenko et al., 2006) aunque comúnmente este agonista se ha asociado a liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en compartimentos lisosomales. Datos previos de nuestro laboratorio muestran que el NAADP no fue capaz de inducir liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los SG de células PC12 o cromafines (SantoDomingo et al., 2010).

De forma similar, en este trabajo solo hemos observado una leve disminución de la  $[Ca^{2+}]_{SG}$  en células INS-1E tras estimular con NAADP en una concentración muy superior a la fisiológica. La identidad del receptor de NAADP es actualmente desconocida y entre los posibles candidatos propuestos se encuentran los RyR (Mojžišová et al., 2001; Hohenegger et al., 2002), los *Transient Receptor Potential channels* (TRP) (Zhang & Li, 2007) y los *Two Pore Channels* (TPC) (Brailoiu et al., 2009; Calcraft et al., 2009).

Finalmente, se estudió la relevancia fisiológica de los mecanismos de liberación de  $Ca^{2+}$  de las líneas neurosecretoras PC12, INS-1 e INS-1E por medio de diversos secretagogos. En primer lugar, se evaluó la respuesta de  $Ca^{2+}$  vesicular frente a variaciones de la concentración de glucosa en células INS-1E comparando estos resultados con los obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio en células INS-1 (SantoDomingo et al., 2010). Para las células INS-1E, se han observado dos tipos de respuestas, una disminución transitoria predominante, y una respuesta bifásica que, de nuevo, puede explicarse asumiendo la participación de una población heterogénea de gránulos de secreción. En estos casos el aumento de temperatura de trabajo desde 22°C a 37°C conllevó una mayor liberación de  $Ca^{2+}$ , con una cinética ligeramente más rápida. En el caso de las células PC12 la despolarización de la membrana plasmática con alto  $K^+$  desencadenó aumentos transitorios, predominantes, o bien disminuciones transitorias de la  $[Ca^{2+}]_{SG}$ . Si bien estos resultados difieren ligeramente de aquellos obtenidos con anterioridad en este laboratorio (SantoDomingo et al., 2010), se vuelve a poner de manifiesto la heterogeneidad de la población vesicular. De acuerdo con nuestra hipótesis, las vesículas de secreción más cercanas a la membrana plasmática participarían activamente en el mecanismo CICR, contribuyendo a su propia secreción, por el contrario las más lejanas solo responderían a incrementos globales de  $[Ca^{2+}]_C$ , aumentando la captación de  $Ca^{2+}$  vesicular por activación de ATPasas de tipo SERCA. En función de la intensidad del estímulo, que además puede afectar de modo diferente a distintas células, predominaría la captación o la liberación, generando las respuestas variables o bifásicas que observamos. Siguiendo con esta línea de actuación, se estudió el efecto de la despolarización con alto  $K^+$  en los flujos de  $Ca^{2+}$  vesiculares de las poblaciones celulares INS-1 e INS-1E. Especialmente sorprendentes fueron las diferencias de comportamiento de la  $[Ca^{2+}]$  de los SG entre estos cultivos celulares, en principio morfológica y funcionalmente similares.

En células INS-1E, el estímulo despolarizador de alto  $K^+$  produjo una disminución rápida y transitoria de la  $[Ca^{2+}]_{SG}$ . Por el contrario, en células INS-1 se observó un acusado aumento transitorio de la  $[Ca^{2+}]_{SG}$ . A la vista de estas diferencias, decidimos estudiar también los flujos de  $Ca^{2+}$  citosólicos en ambos tipos de células sometidas a la despolarización con alto  $K^+$ . Los resultados de estos experimentos mostraron una diferencia radical entre ambos tipos celulares en términos de la dotación de canales de  $Ca^{2+}$  operados por voltaje (VOCC).

Mientras las células INS-1 responden a la estimulación con un enorme aumento de la  $[Ca^{2+}]$  citosólica, el efecto de la misma estimulación en las células INS-1E fue casi indetectable. Por lo tanto, las células INS-1 responden a la despolarización con una gran entrada de  $Ca^{2+}$  a través de VOCC, mientras que las INS-1E carecen casi por completo de este tipo de canales. El origen de las diferencias fisiológicas existentes entre la línea celular INS-1 y su clon INS-1E es actualmente desconocido. Existen estudios que muestran diferencias en la respuesta secretora de ambas, por ejemplo en la respuesta al estímulo hipotónico. Las células INS-1 secretan en respuesta a este estímulo, mientras que las INS-1E no responden, a pesar de que en ambos casos se produce un aumento de volumen similar (Orezná et al., 2008). Estas diferencias podrían tratar de explicarse en base a diferencias de densidad de VOCC entre ambos tipos celulares.

El problema es, por tanto, explicar cómo la despolarización con alto  $K^+$  de las células INS-1E es capaz de inducir una respuesta de liberación de  $Ca^{2+}$  de los SG tan rápida e importante (hasta un 30-40% de disminución) sin apenas modificar la  $[Ca^{2+}]$  citosólica. En nuestra opinión, la única manera de explicar estos resultados sería asumir que las células INS-1E poseen un número muy pequeño de VOCC, pero estrechamente acoplados a los SG, de manera que su activación produciría una entrada de  $Ca^{2+}$  pequeña pero muy localizada en la vecindad de los gránulos. De esta manera, este microdominio localizado de  $Ca^{2+}$  podría llevar a una activación de los  $IP_3R$  y  $RyR$  de los gránulos, produciendo liberación de  $Ca^{2+}$  de los mismos, pero sin generar aumentos globales significativos de la  $[Ca^{2+}]$  citosólica. La importancia de los microdominios de alto  $Ca^{2+}$  bajo la membrana plasmática durante el proceso de secreción está ampliamente reconocida.

Estos microdominios serían los principales responsables de la secreción y, posteriormente, desaparecerían rápidamente captados por las ATPasas de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos internos, por las mitocondrias a través del uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial (MCU), o bien disipados al medio extracelular por la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  (PMCA) y/o el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) de la membrana plasmática (Monck et al., 1994; Bokvist et al., 1995). De hecho, en células cromafines se ha documentado la existencia de complejos funcionales formados con VOCC, ER y mitocondrias, denominados triadas, que intervienen en la modulación de estos microdominios de alto  $\text{Ca}^{2+}$  (Montero et al., 2000; García et al., 2006). Los datos obtenidos en el presente trabajo sugieren que la contribución del ER a estos microdominios de alto  $\text{Ca}^{2+}$  es prácticamente nula, al menos en células INS-1 e INS-1E. En el caso de las células INS-1 se podría plantear la existencia de un modelo de triadas VOCC - SG - mitocondrias, ya que poseen un gran número de VOCC en la membrana plasmática y las mitocondrias captan  $\text{Ca}^{2+}$  rápidamente tras la estimulación con alto  $\text{K}^+$ .

En el caso de las células INS-1E, en cambio, ni mitocondrias ni ER parecen jugar ningún papel importante, ya que tras la estimulación con alto  $\text{K}^+$  la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  por las mitocondrias es marginal y el ER no produce liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, no podemos descartar que haya una pequeña fracción de mitocondrias implicada, ni que el ER produzca liberación localizada en los sitios activos de secreción, sin que se modifique significativamente el nivel global de  $[\text{Ca}^{2+}]$  en el ER. Tampoco conseguimos medir esos microdominios de  $\text{Ca}^{2+}$  con una sonda de aequorina dirigida a la zona submembrana plasmática, lo que sugiere de nuevo que se trata de una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  muy localizada y acoplada a los sitios de secreción. Los resultados obtenidos en células INS-1E sobre la cinética de  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular en presencia de quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  confirman la idea de que los VOCC, si bien se encuentran en menor densidad con respecto a la línea celular INS-1, podrían estar especialmente acoplados a los SG, siendo los principales responsables de la formación y modulación de los microdominios de  $\text{Ca}^{2+}$  responsables de la secreción.

Por otro lado, es posible que este acoplamiento esté facilitado por una mayor densidad de  $\text{IP}_3\text{R}$  en los SG de las células INS-1E, dado que tanto la respuesta de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por carbacol como por  $\text{IP}_3$  fueron muy superiores en estas células con respecto a las INS-1.

De hecho, las células INS-1E fueron originalmente seleccionadas por su mayor capacidad de secreción de insulina con respecto a las INS-1 parentales (Merglen et al., 2004). En la literatura se ha descrito la existencia de interacción e incluso acoplamiento físico entre VOCC y diversas proteínas de anclaje y/o fusión de los SG a la membrana plasmática (syntaxina 1A, sinaptotagmina, SNAP25...) en diversos tipos celulares neuroendocrinos. Existen estudios que proponen VOCC de tipo L como sensores proteicos en el acoplamiento estímulo-secreción, en células INS-1E y  $\beta$ -pancreáticas (Trus et al., 2007). Por el contrario, en células cromafines los VOCC de tipo P/Q y tipo N predominarían sobre los de tipo L en esta interacción (Álvarez et al., 2013). En todos estos estudios se habla de la existencia de una subpoblación vesicular IRP (*Immediately Releasable Pool*) relacionada con una fase de exocitosis rápida y altamente sincronizada con un primer estímulo, y una subpoblación vesicular RRP (*Rapid Releasable Pool*) asociada con una fase de exocitosis más lenta, consecuencia de una despolarización consecutiva mantenida en el tiempo (Marengo, 2005). La diferencia entre estas subpoblaciones de gránulos de secreción radica en un acoplamiento íntimo de los gránulos de la IRP con las subunidades  $\alpha_1$  de estos canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Álvarez & Marengo, 2011; Álvarez et al., 2013).

Se puede proponer un modelo que explique la diferencia de comportamiento de los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular existente entre los diversos tipos celulares neuroendocrinos, en base a la presencia de distintos grados de acoplamiento entre los VOCC y las vesículas. En las células INS-1E habría un acoplamiento estricto entre un reducido número de VOCC y las vesículas del IRP. La despolarización generaría una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  localizada que produciría microdominios de  $\text{Ca}^{2+}$  elevados en la vecindad de estas vesículas. De esta manera, se activarían los canales  $\text{IP}_3\text{R}$  y  $\text{RyR}$  de las vesículas y éstas contribuirían a liberar  $\text{Ca}^{2+}$ , aumentar el tamaño del microdominio de  $\text{Ca}^{2+}$  y disparar el proceso secretor. En las vesículas del RRP, en cambio, el aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  local sería mucho menor debido al pequeño número de VOCC y apenas produciría efectos. En las células INS-1 y PC12, en cambio, el número de VOCC sería mucho mayor y la mayoría no están acoplados a los SG. Debido a ello, la despolarización generaría un gran aumento del nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y una importante activación de la SERCA en las vesículas del RRP. Se produciría así un aumento del nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  en estas vesículas que contrarrestaría la disminución que se produce en las vesículas del IRP, generando respuestas variables o bifásicas.

Este modelo podría ser aun más complejo considerando la participación de otros sistemas de disipación del microdominio de  $\text{Ca}^{2+}$  como la mitocondria. Además, en algunos estudios se postula también la participación de las vesículas de secreción en el proceso de relleno de  $\text{Ca}^{2+}$  del ER mediado por Orai-STIM (Dickson et al., 2012).

En conclusión, nuestros datos sugieren que las células INS-1E constituyen un modelo magnífico para estudiar el acoplamiento de los VOCC de la membrana plasmática con los SG, dado que poseen muy pocos VOCC pero muy fuertemente acoplados a los gránulos y a la secreción. Gracias a este acoplamiento, hemos podido demostrar que los SG realmente son capaces de liberar  $\text{Ca}^{2+}$  tras el estímulo secretor, con lo que pueden realmente contribuir a su propia secreción. Este es un punto que ha sido ampliamente debatido y que podría dar efectivamente una función fisiológica clave a la gran cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  acumulada dentro de los gránulos (Álvarez & Marengo, 2011).

### 3. ESTUDIO DEL CALCIO VESICULAR EN CÉLULA ÚNICA DE LINEAS NEUROENDOCRINAS PC12 E INS-1. SUBPOBLACIÓN VESICULAR.

---

Hasta ahora se ha estudiado la dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular en población celular de líneas neuroendocrinas, mediante sondas de aequorina dirigidas a los SG. Estos estudios han permitido establecer los principales mecanismos de captación y liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en los SG de estos cultivos celulares, así como proponer un papel para el  $\text{Ca}^{2+}$  granular en el proceso de secreción inducido por la activación de VOCC. Este modelo considera un balance global de la respuesta de la población vesicular, si bien en las respuestas observadas predomina probablemente la componente de las subpoblaciones IRP, RRP y en menor grado SRP (*Slow Releasable Pool*), más próximas a la membrana plasmática (García et al., 2006; Álvarez & Marengo, 2011). Sin embargo, en este estudio en poblaciones celulares resulta difícil explicar con profundidad el origen de ciertas respuestas bifásicas observadas tras determinados estímulos. Para considerar la contribución individual de otras subpoblaciones de gránulos de secreción, como RVP (*Reserve Vesicle Pool*), fue preciso llevar a cabo estudios de dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular en célula única, mediante sondas de  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescentes dirigidas a los SG.

El principal inconveniente de las sondas de  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescentes es su sensibilidad a pH ácido, medio propio de las vesículas de secreción. Como se discutió en el primer apartado, las únicas sondas que se expresaron correctamente en los SG fueron VAMP-RGECO1, VAMP-GEMGECO1, VAMP-GEXGECO1, NPY-GEMGECO1 y NPY-GEXGECO1. Pese a que todas estas sondas de  $\text{Ca}^{2+}$  basadas en GECO deberían en principio estar parcialmente saturadas en el rango de  $[\text{Ca}^{2+}]$  de los SG, en base a sus valores tabulados de  $K_d$ , se consideró que el entorno ácido vesicular podría reducir su afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  y por tanto aumentar su  $K_d$ , de tal manera que fuera posible realizar mediciones de  $\text{Ca}^{2+}$  significativas en el interior de los SG.



El laboratorio del Dr. Campbell así lo recoge en un estudio de medición de  $\text{Ca}^{2+}$  en endosomas de línea celular MIN6, orgánulos con una matriz de acidez similar a la encontrada en los SG (Albrecht et al., 2015). En ese estudio, la sonda de  $\text{Ca}^{2+}$  dirigida a endosomas TiVAMP-GEMGECO1 experimentó un aumento en la  $K_d$  aparente de dos órdenes de magnitud al pasar de pH 7,0 (460nM) a pH 5,4 (17880nM).

En los registros en célula única con la sonda de  $\text{Ca}^{2+}$  VAMP-RGECO1, en contra de lo que cabía esperar al pasar al entorno ácido vesicular, la intensidad de la señal fluorescente se minimizó considerablemente lo cual, junto a una escasa modificación de la  $K_d$  aparente, llevó a desestimar el uso de esta sonda de  $\text{Ca}^{2+}$ . Otro inconveniente fue que si bien el tratamiento con glicerol a las células que expresaban VAMP-RGECO1 mejoró la distribución de la sonda en los SG, la señal fluorescente presentaba siempre una baja intensidad. Este problema ha sido abordado por diversos autores, resultando en modificaciones genéticas que, además de mejorar la intensidad de la señal fluorescente, aumentaron la propia  $K_d$  de la sonda de  $\text{Ca}^{2+}$  (Akerboom et al., 2013; Wu et al., 2013; 2014). Sin embargo, estos nuevos constructos presentaron una mayor dependencia frente al pH, y además, en estos mismos estudios se mostró que el RGECO1 exhibe una significativa foto-activación al excitarse en el rango de longitudes de onda del azul y del verde, generando posible artefactos de medida, problema añadido que cuestiona el uso de esta sonda de  $\text{Ca}^{2+}$ .

El principal inconveniente del uso de las sondas ratiométricas de GEMGECO1 y GEXGECO1 fue la excitación a longitudes de onda próximas al UV. Debido al consecuente fotoblanqueo de la sonda, los tiempos de experimentación se acortaron a máximo 8-10 minutos siendo inviable realizar estudios de dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular en célula única a partir de cierto aumento y resolución confocal y resultando por tanto imposible una diferenciación más exhaustiva de las subpoblaciones vesiculares. No obstante, fue posible explorar la dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular en diferentes regiones celulares concéntricas seleccionadas: el entorno inmediato granular por debajo de la membrana plasmática, una región vesicular intermedia, y una región interna caracterizada generalmente por un cúmulo de fluorescencia de los SG.

Los experimentos de captación de  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular en células únicas depletadas que expresaban VAMP-GEMGECO1, VAMP-GEXGECO1 y NPY-GEMGECO1 tanto en la línea celular PC12 como células INS-1, demostraron que este proceso es similar al registrado en población celular con las correspondientes sondas de AEQ dirigidas a los SG, si bien no se observa el pico transitorio inicial de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$ . Este hecho refuerza la hipótesis de la diferente compartimentalización de las sondas de AEQ dirigidas a los SG y el consumo de aequorina inicial de estas mismas sondas en los compartimentos con mayor nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  mencionado en el apartado anterior. Nuestros datos han mostrado que este proceso de captación de  $\text{Ca}^{2+}$  está mediado principalmente a través de ATPasas de tipo SERCA, observándose una disminución parcial de la captación tras el tratamiento con BHQ en todas las regiones seleccionadas. Esta disminución no fue tan drástica como en experimentos similares realizados en población celular, probablemente debido a la saturación de la sonda de  $\text{Ca}^{2+}$  en algunos compartimentos durante el llenado de  $\text{Ca}^{2+}$  en condiciones control.

Los experimentos de despolarización con alto  $\text{K}^+$  desencadenaron aumentos transitorios de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$  y, como se observa tras la inhibición con BHQ, fueron mediados igualmente a través de la SERCA. Estas repuestas de  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular, tratadas desde una visión global, fueron reflejo del comportamiento descrito en población celular, con las salvedades existentes entre la línea celular PC12 y las células INS-1, sin observarse además diferencias significativas de comportamiento con respecto al tratamiento de depleción de  $\text{Ca}^{2+}$  previo. Por otra parte, el ATP puede actuar a través de receptores P2X o P2Y, cuyo nivel de expresión varía según el tipo celular. En la línea celular PC12 indiferenciada se ha descrito que el ATP desencadena entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de receptores P2X mayoritariamente, cobrando importancia la participación de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de depósitos internos, vía P2Y, conforme los cultivos celulares de PC12 se diferencian en neuronales (Sela et al., 1991; Arslan et al., 2000). En la línea celular INS-1 la diferencia de expresión entre ambos receptores P2X y P2Y no es tan marcada (Petit et al., 2009). En el presente trabajo solo se ha evaluado la estimulación con ATP en registros de célula única con la línea celular PC12 expresando tanto VAMP-GEMGECO1 como NPY-GEMGECO1, observándose que produce un aumento transitorio de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SG}}$ , al igual que la despolarización con alto  $\text{K}^+$ .

Atendiendo a las diferencias entre las regiones seleccionadas, en células PC12 e INS-1 depletadas y posteriormente rellenadas de  $\text{Ca}^{2+}$ , conforme se produjo un alejamiento de la membrana plasmática apareció una disminución progresiva en el nivel de captación de  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular así como una cinética más lenta del proceso. Esa disminución fue más marcada en los registros con la sonda VAMP-GEMGECO1 frente a la sonda NPY-GEMGECO1, en la cual no se aprecian diferencias significativas entre las regiones intermedia y cercana a la membrana plasmática. Este hecho puede ser atribuible a la presencia de una componente de la sonda VAMP-GEMGECO1 localizada en la parte externa de la membrana plasmática, sensible a los cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]$  externa, a pesar de la selección minuciosa de las regiones vesiculares. No obstante, sí parecen mantenerse las diferencias entre estas regiones y la región vesicular más interna. Una explicación a este cambio en la cinética de captación vesicular de  $\text{Ca}^{2+}$  con la distancia de la membrana plasmática puede darse en base a la progresión de la onda de  $\text{Ca}^{2+}$  a lo largo de la célula. En las regiones próximas a la membrana plasmática tanto la activación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  capacitativa como la inducida por despolarización con alto  $\text{K}^+$  o la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de receptores de ATP generaría una zona de alta  $[\text{Ca}^{2+}]$ . Las vesículas de esa zona podrían experimentar una mayor y más rápida captación de  $\text{Ca}^{2+}$ , la cual tanto en células PC12 como células INS-1 predomina sobre la liberación debido a la gran entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los VOCC. Puesto que el gradiente de  $[\text{Ca}^{2+}]$  disminuiría conforme nos alejamos de la membrana plasmática, el proceso de captación de  $\text{Ca}^{2+}$  de vesículas de zonas más internas sufriría un decremento en amplitud máxima y cinética del mismo.

No obstante, podría plantearse además un segundo mecanismo relacionado con el proceso de maduración que sufren las vesículas a lo largo de su recorrido hacia la secreción. Dentro de la matriz granular el calcio puede encontrarse libre como  $\text{Ca}^{2+}$  o bien unido a diferentes moléculas como ATP, cromograninas, etc (Borges et al., 2012). Dentro de la fracción de calcio ligado, a su vez se puede considerar un subcompartimento estructural de intercambio muy lento, y otro subcompartimento que se encuentra unido a cromograninas y otros componentes de afinidad próxima a la fracción de  $\text{Ca}^{2+}$  vesicular libre, disponible de intercambio y con un tamaño que puede depender de las variaciones en la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  (Álvarez, 2012).

Esta bi-compartimentalización (o tri-compartimentalización) del calcio total vesicular podría tomar parte en el proceso de reducción de fuerza osmótica, necesario para la acumulación de catecolaminas en los SG. La acumulación de catecolaminas es un proceso realizado a través de transportador vesicular de monoaminas (VMAT) en sinergia con la acumulación de  $H^+$  a través de la bomba de  $H^+$  vacuolar V-ATPasa, y por tanto con el proceso de acidificación que sufren las vesículas a lo largo de su recorrido hacia su secreción. En las vesículas con un pH cercano a 6,4 presente en el GC (Llopis et al., 1998) originalmente existiría una mayor proporción de  $Ca^{2+}$ -libre que daría lugar a una menor y más lenta captación de  $Ca^{2+}$  vesicular a través de la SERCA. Conforme fuera aumentando la fuerza osmótica por acumulación de catecolaminas, la proporción de  $Ca^{2+}$ -libre disminuiría progresivamente, incrementándose el nivel y la cinética de la captación de  $Ca^{2+}$  vesicular.

Pese a que se requieren investigaciones posteriores, el uso de las sondas de  $Ca^{2+}$  fluorescentes en el estudio de la dinámica de  $Ca^{2+}$  en los SG de célula única descrito en el presente trabajo establece un interesante punto de partida para elucidar el papel del  $Ca^{2+}$  vesicular entre las diferentes subpoblaciones de gránulos de secreción y su contribución al proceso de exocitosis.



# *CONCLUSIONES*

---



1. Las imágenes de microscopía confocal de la localización subcelular de las sondas VAMP-EGFP, CgA-EGFP y NPY-EGFP mostraron patrones granulares para las líneas celulares neuroendocrinas PC12, INS-1 e INS-1E. Este hecho corrobora la localización vesicular de las sondas CgA-mAEQ y NPY-mAEQ. Funcionalmente la localización en la matriz granular de las sondas de AEQ supone ventajas experimentales con respecto a la sonda VAMP-mAEQ anclada en la membrana.
2. Las quimeras fluorescentes dirigidas a gránulos de secreción más eficaces para detectar variaciones de la  $[Ca^{2+}]$  en el medio ácido intragranular han sido VAMP-GEM(GEX)GECO1, y NPY-GEM(GEX)GECO1. Las sondas con rtPericam y aquellas con la secuencia CgA no se expresaron correctamente en gránulos de secreción. En el caso de VAMP-RGECO1, si bien la adición de glicerol mejoró su distribución granular, la sonda no fue capaz de detectar variaciones en la  $[Ca^{2+}]_{SG}$ .
3. Los resultados obtenidos con la sonda NPY-mAEQ en poblaciones celulares de líneas neuroendocrinas PC12, INS-1 e INS-1E muestran que la concentración basal de  $Ca^{2+}$  libre en la matriz densa de los gránulos de secreción, se sitúa entre 20-40 $\mu$ M. Los valores obtenidos con la sonda CgA-mAEQ fueron considerablemente más bajos, sugiriendo la posibilidad de que la CgA pueda tamponar la  $[Ca^{2+}]$ , bien por sus características físico-químicas, o las del entorno donde se distribuye.
4. Los mecanismos responsables de los flujos de  $Ca^{2+}$  vesiculares en las líneas celulares PC12, INS-1 e INS-1E son similares. La acumulación de  $Ca^{2+}$  vesicular se da fundamentalmente a través de ATPasas tipo SERCA con una pequeña contribución de un intercambiador  $Ca^{2+}/H^+$ . La liberación de  $Ca^{2+}$  vesicular es mayoritariamente dependiente de  $IP_3R$  y  $RyR$ . En estos tipos celulares, la escasa contribución de los segundos mensajeros cADPR y NAADP sugiere que carecen de sus receptores específicos.
5. Tanto los cambios en el nivel de glucosa en el caso de células INS-1 e INS-1E como la estimulación con alto  $K^+$  en las líneas celulares neuroendocrinas generan respuestas heterogéneas que sugieren la participación de diferentes subpoblaciones vesiculares en términos de dinámica de  $Ca^{2+}$ , regulando la señal de  $Ca^{2+}$  y el proceso de exocitosis.

## CONCLUSIONES

---

6. Un análisis comparativo más detallado de la repuesta frente a alto  $K^+$  en las líneas celulares INS-1 e INS-1E ha mostrado diferencias fisiológicas importantes entre ambas. Para las células INS-1, con una alta tasa de expresión de VOCC, la regulación de la respuesta de  $Ca^{2+}$  en la secreción podría venir condicionada por un sistema VOCC-mitocondria-gránulos de secreción. Para células INS-1E, una baja expresión de VOCC se compensaría con una regulación estrecha, prácticamente de acoplamiento, entre VOCC-gránulos de secreción.
7. El estudio de la dinámica de  $Ca^{2+}$  vesicular en célula única, en líneas celulares PC12 e INS-1, ha proporcionado resultados consistentes con los obtenidos en población celular. Por un lado, la acumulación de  $Ca^{2+}$  vesicular se realizó a través de ATPasas tipo SERCA. Por otro lado, los estímulos de despolarización con alto  $K^+$  y ATP produjeron aumentos transitorios en la  $[Ca^{2+}]_{SG}$ .
8. En los estudios realizados en célula única se han considerado tres regiones arbitrarias de posibles subpoblaciones vesiculares: periférica, intermedia y central. Las variaciones de la  $[Ca^{2+}]_{SG}$  en respuesta a diferentes maniobras, son de menor magnitud y más lentas conforme nos alejamos de la membrana plasmática. Estas diferencias pueden deberse a la progresión de la onda de  $Ca^{2+}$  a través de la célula, o bien ser causadas por un mecanismo asociado al almacenamiento del calcio total intragranular y/o el proceso de maduración de los gránulos de secreción a lo largo de su recorrido hacia la membrana plasmática.
9. Los datos obtenidos tanto en los registros en población celular como en célula única apoyan la hipótesis de que la liberación del  $Ca^{2+}$  intragranular puede contribuir a su propia secreción. Los estímulos que inducen secreción también liberan  $Ca^{2+}$  de los gránulos de secreción, y en el caso concreto de la línea INS-1E nuestros datos sugieren la existencia de un acoplamiento directo entre los VOCC de la membrana plasmática y los RyR o  $IP_3R$  de los gránulos de secreción, capaz de desencadenar rápidamente liberación de  $Ca^{2+}$  inducida por  $Ca^{2+}$  (CICR).





# *BIBLIOGRAFÍA*

---



Aarhus, R. & Lee, H. (1995). A Derivative of NADP Mobilizes Calcium Stores Insensitive to Inositol Trisphosphate and Cyclic ADP-ribose. *Journal of Biological Chemistry*, 270(5), pp.2152-2157.

Aarhus, R., Graeff, R., Dickey, D., Walseth, T. & Hon, C. (1995). ADP-ribosyl Cyclase and CD38 Catalyze the Synthesis of a Calcium-mobilizing Metabolite from NADP<sup>+</sup>. *Journal of Biological Chemistry*, 270(51), pp.30327-30333.

Abdullaev, I., Bisailon, J., Potier, M., Gonzalez, J., Motiani, R. & Trebak, M. (2008). Stim1 and Orai1 Mediate CRAC Currents and Store-Operated Calcium Entry Important for Endothelial Cell Proliferation. *Circulation Research*, 103(11), pp.1289-1299.

Adachi, T., Arai, K. & Ohkuma, S. (1996). A Comparative Study of (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>)-ATPase on the Lysosomal Membrane and ecto-ATPase on the Plasma Membrane from Rat Liver. *Biol. Pharm. Bull.*, 19(10), pp.1291-1297.

Akerboom, J., Carreras Calderón, N., Tian, L., Wabnig, S., Prigge, M., Tolö, J., Gordus, A., Orger, M., Severi, K., Macklin, J., Patel, R., Pulver, S., Wardill, T., Fischer, E., Schöler, C., Chen, T., Sarkisyan, K., Marvin, J., Bargmann, C., Kim, D., Kügler, S., Lagnado, L., Hegemann, P., Gottschalk, A., Schreiter, E. & Looger, L. (2013). Genetically encoded calcium indicators for multi-color neural activity imaging and combination with optogenetics. *Front. Mol. Neurosci.*, 6.

Albrecht, T., Zhao, Y., Nguyen, T., Campbell, R. & Johnson, J. (2015). Fluorescent biosensors illuminate calcium levels within defined beta-cell endosome subpopulations. *Cell Calcium*, 57(4), pp.263-274.

Allen, D., Blinks, & Prendergast, F. (1977). Aequorin luminescence: relation of light emission to calcium concentration--a calcium-independent component. *Science*, 195(4282), pp.996-998.

Allersma, M., Wang, L., Axelrod, D. & Holz, R. (2004). Visualization of Regulated Exocytosis with a Granule-Membrane Probe Using Total Internal Reflection Microscopy. *Molecular Biology of the Cell*, 15(10), pp.4658-4668.

Alonso, M., Barrero, M., Carnicero, E., Montero, M., Garcia-Sancho, J. & Álvarez, J. (1998). Functional measurements of [Ca<sup>2+</sup>] in the endoplasmic reticulum using a herpes virus to deliver targeted aequorin. *Cell Calcium*, 24(2), pp.87-96.

Alonso, M., Barrero, M., Michelena, P., Carnicero, E., Cuchillo, I., García, A., García-Sancho, J., Montero, M. & Álvarez, J. (1999). Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> Release in Chromaffin Cells Seen from inside the ER with Targeted Aequorin. *J Cell Biol.*, 144(2), pp.241-254.

Álvarez, J. & Montero, M. (2002). Measuring [Ca<sup>2+</sup>] in the endoplasmic reticulum with aequorin. *Cell Calcium*, 32(5-6), pp.251-260.

Álvarez, J. (2012). Calcium dynamics in the secretory granules of neuroendocrine cells. *Cell Calcium*, 51(3-4), pp.331-337.

Álvarez, J., Montero, M. & García-Sancho, J. (1999). Subcellular Ca<sup>2+</sup> Dynamics. *News Physiol Sci.*, 1999(14), pp.161-168.

Álvarez, Y. & Marengo, F. (2011). The immediately releasable vesicle pool: highly coupled secretion in chromaffin and other neuroendocrine cells. *Journal of Neurochemistry*, 116(2), pp.155-163.

Álvarez, Y., Belingheri, A., Perez Bay, A., Jarvis, S., Tedford, H., Zamponi, G. & Marengo, F. (2013). The Immediately Releasable Pool of Mouse Chromaffin Cell Vesicles Is Coupled to P/Q-Type Calcium Channels via the Synaptic Protein Interaction Site. *PLoS ONE*, 8(1), p.e54846.

Ambudkar, I., Bandyopadhyay, B., Liu, X., Lockwich, T., Paria, B. & Ong, H. (2006). Functional organization of TRPC-Ca<sup>2+</sup> channels and regulation of calcium microdomains. *Cell Calcium*, 40(5-6), pp.495-504.

Annunziato, L., Pignataro, G. & Di Renzo, G. (2004). Pharmacology of Brain Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Exchanger: From Molecular Biology to Therapeutic Perspectives. *Pharmacological Reviews*, 56(4), pp.633-654.

Annunziato, L., Pignataro, G., Boscia, F., Sirabella, R., Formisano, L., Saggese, M., Cuomo, O., Gala, R., Secondo, A., Viggiano, D., Molinaro, P., Valsecchi, V., Tortiglione, A., Adornetto, A., Scorziello, A., Cataldi, M. & Di Renzo, GF. (2007). *ncx1*, *ncx2*, and *ncx3* Gene Product Expression and Function in Neuronal Anoxia and Brain Ischemia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1099(1), pp.413-426.

Anthony Lai, F., Erickson, H., Rousseau, E., Liu, Q. & Meissner, G. (1988). Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature*, 331(6154), pp.315-319.

Arredouani, A., Guiot, Y., Jonas, J., Liu, L., Nenquin, M., Pertusa, J., Rahier, J., Rolland, J., Shull, G., Stevens, M., Wuytack, F., Henquin, J. & Gilon, P. (2002). SERCA3 Ablation Does Not Impair Insulin Secretion but Suggests Distinct Roles of Different Sarcoendoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Pumps for Ca<sup>2+</sup> Homeostasis in Pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetes*, 51(11), pp.3245-3253.

Arslan, G., Filipeanu, C., Irenius, E., Kull, B., Clementi, E., Allgaier, C., Erlinge, D. & Fredholm, B. (2000). P2Y receptors contribute to ATP-induced increases in intracellular calcium in differentiated but not undifferentiated PC12 cells. *Neuropharmacology*, 39(3), pp.482-496.

Arvan, P. & Castle, D. (1998). Sorting and storage during secretory granule biogenesis: looking backward and looking forward. *Biochem. J.*, 332(3), pp.593-610.

Asfari, M., Janjic, D., Meda, P., Li, G., Halban, P. & Wollheim, C. (1992). Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology*, 130(1), pp.167-178.

Aulestia, F., Alonso, M. and García-Sancho, J. (2015). Differential calcium handling by the cis and trans regions of the Golgi apparatus. *Biochem. J.*, 466(3), pp.455-465.

Aulestia, F., Redondo, P., Rodríguez-García, A., Rosado, J., Salido, G., Alonso, M. & García-Sancho, J. (2011). Two distinct calcium pools in the endoplasmic reticulum of HEK-293T cells. *Biochem. J.*, 435(1), pp.227-235.

- Bannai, H., Inoue, T., Nakayama, T., Hattori, M. & Mikoshiba, K. (2004). Kinesin dependent, rapid, bi-directional transport of ER sub-compartment in dendrites of hippocampal neurons. *Journal of Cell Science*, 117(2), pp.163-175.
- Bardo, S., Cavazzini, M. & Emptage, N. (2006). The role of the endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  store in the plasticity of central neurons. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(2), pp.78-84.
- Barg, S. (2003). Mechanisms of Exocytosis in Insulin-Secreting  $\beta$ -Cells and Glucagon-Secreting  $\alpha$ -Cells. *Pharmacol Toxicol*, 92(1), pp.3-13.
- Barrero, M., Montero, M. & Álvarez, J. (1997). Dynamics of  $[Ca^{2+}]$  in the Endoplasmic Reticulum and Cytoplasm of Intact HeLa Cells: A comparative study. *Journal of Biological Chemistry*, 272(44), pp.27694-27699.
- Bauerfeind, R. & Huttner, W. (1993). Biogenesis of constitutive secretory vesicles, secretory granules and synaptic vesicles. *Current Opinion in Cell Biology*, 5(4), pp.628-635.
- Baughman, J., Perocchi, F., Girgis, H., Plovanich, M., Belcher-Timme, C., Sancak, Y., Bao, X., Strittmatter, L., Goldberger, O., Bogorad, R., Kotliansky, V. & Mootha, V. (2011). Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 476(7360), pp.341-345.
- Beam, K. & Bannister, R. (2010). Looking for answers to EC coupling's persistent questions: Figure 1. *The Journal of General Physiology*, 136(1), pp.7-12.
- Behne, M., Tu, C., Aronchik, I., Epstein, E., Bench, G., Bikle, D., Pozzan, T. & Mauro, T. (2003). Human Keratinocyte ATP2C1 Localizes to the Golgi and Controls Golgi  $Ca^{2+}$  Stores. *Journal of Investigative Dermatology*, 121(4), pp.688-694.
- Benham, C. & Tsien, R. (1987). A novel receptor-operated  $Ca^{2+}$ -permeable channel activated by ATP in smooth muscle. *Nature*, 328(6127), pp.275-278.
- Bernardi P. (1999). Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev*, 79(4), pp.1127-1155.
- Berridge, M. & Irvine, R. (1984). Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, 312(5992), pp.315-321.
- Berridge, M. (1993). A tale of two messengers. *Nature*, 365(6445), pp.388-389.
- Berridge, M. (1997). Elementary and global aspects of calcium signalling. *The Journal of Physiology*, 499(2), pp.291-306.
- Berridge, M. (2006). Calcium microdomains: Organization and function. *Cell Calcium*, 40(5-6), pp.405-412.
- Berridge, M. (2009). Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1793(6), pp.933-940.

- Berridge, M. (2012). Module 3: Ion Channels. *Cell Signalling Biology*, 6, p.csb0001001.
- Berridge, M., Bootman, M. & Roderick, H. (2003). Calcium: Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(7), pp.517-529.
- Bezprozvanny, I. & Ehrlich, B. (1994). Inositol (1,4,5)-trisphosphate (InsP3)-gated  $Ca^{2+}$  channels from cerebellum: conduction properties for divalent cations and regulation by intraluminal calcium. *The Journal of General Physiology*, 104(5), pp.821-856.
- Bezprozvanny, I. (2005). The inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Cell Calcium*, 38(3-4), pp.261-272.
- Bezprozvanny, I., Watras, J. & Ehrlich, B. (1991). Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P3- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature*, 351(6329), pp.751-754.
- Billington, R. Bellomo, EA., Floriddia, EM., Erriquez, J., Distasi, C. & Genazzani, AA (2006). A transport mechanism for NAADP in a rat basophilic cell line. *The FASEB Journal*, 20(3), pp.521-523.
- Bird, G., Aziz, O., Lievremont, J., Wedel, B., Trebak, M., Vazquez, G. & Putney Jr., J. (2004). Mechanisms of Phospholipase C-Regulated Calcium Entry. *CMM*, 4(3), pp.291-301.
- Blaustein, M. & Golovina, V. (2001). Structural complexity and functional diversity of endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  stores. *Trends in Neurosciences*, 24(10), pp.602-608.
- Blaustein, MP. & Lederer, WJ. (1999). Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev*, 79(3), pp.763-854.
- Blinks, J. (1990). Use of Photoproteins as Intracellular Calcium Indicators. *Environmental Health Perspectives*, 84, pp.75-81.
- Blondel, O., Bell, G. & Seino, S. (1995). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors, secretory granules and secretion in endocrine and neuroendocrine cells. *Trends in Neurosciences*, 18(4), pp.157-161.
- Blondel, O., Moody, M., Depaoli, A., Sharp, A., Ross, C., Swift, H. & Bell, G. (1994). Localization of inositol trisphosphate receptor subtype 3 to insulin and somatostatin secretory granules and regulation of expression in islets and insulinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(16), pp.7777-7781.
- Bokvist, K., Eliasson, L., Ammälä, C., Renström, E. & Rorsman, P. (1995). Co-localization of L-type  $Ca^{2+}$  channels and insulin-containing secretory granules and its significance for the initiation of exocytosis in mouse pancreatic  $\beta$ -cells. *EMBO J.*, 14(1), pp.50-57.
- Borges, R., Domínguez, N., Estévez-Herrera, J., Pereda, D. & Machado, J. (2012). Vesicular  $Ca^{2+}$  mediates granule motion and exocytosis. *Cell Calcium*, 51(3-4), pp.338-341.

Borowiec, A., Bidaux, G., Tacine, R., Dubar, P., Pigat, N., Delcourt, P., Mignen, O. & Capiod, T. (2014). Are Orail and Orail3 channels more important than calcium influx for cell proliferation?. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843(2), pp.464-472.

Bosanac, I., Alattia, J., Mal, T., Chan, J., Talarico, S., Tong, F., Tong, K., Yoshikawa, F., Furuichi, T., Iwai, M., Michikawa, T., Mikoshiba, K. & Ikura, M. (2002). Structure of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor binding core in complex with its ligand. *Nature*, 420(6916), pp.696-700.

Boynton AL., Whit field JF., Isaacs RJ. & Tremblay RG. (1977). Different extracellular calcium requirements for proliferation of nonneoplastic, preneoplastic, and neoplastic mouse cells. *Cancer Research*, 37(8 Pt 1), pp.2657-2661.

Bradley, J., Reisert, J. & Frings, S. (2005). Regulation of cyclic nucleotide-gated channels. *Current Opinion in Neurobiology*, 15(3), pp.343-349.

Brailoiu, E., Churamani, D., Cai, X., Schrlau, M., Brailoiu, G., Gao, X., Hooper, R., Boulware, M., Dun, N., Marchant, J. & Patel, S. (2009). Essential requirement for two-pore channel 1 in NAADP-mediated calcium signaling. *J Cell Biol*, 186(2), pp.201-209.

Brailoiu, E., Churamani, D., Pandey, V., Brailoiu, G., Tuluc, F., Patel, S. & Dun, N. (2006). Messenger-specific Role for Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate in Neuronal Differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 281(23), pp.15923-15928.

Breton, C., Mucha, J. & Jeanneau, C. (2001). Structural and functional features of glycosyltransferases. *Biochimie*, 83(8), pp.713-718.

Brini, M. & Carafoli, E. (2009). Calcium Pumps in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 89(4), pp.1341-1378.

Brini, M. & Carafoli, E. (2011). The Plasma Membrane  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase and the Plasma Membrane Sodium Calcium Exchanger Cooperate in the Regulation of Cell Calcium. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(2), pp.a004168-a004168.

Brini, M., De Giorgi, F., Murgia, M., Marsault, R., Massimino, M., Cantini, M., Rizzuto, R. & Pozzan, T. (1997). Subcellular analysis of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in primary cultures of skeletal muscle myotubes. *Molecular Biology of the Cell*, 8(1), pp.129-143.

Brini, M., Marsault, R., Bastianutto, C., Álvarez, J., Pozzan, T. & Rizzuto, R. (1995). Transfected aequorin in the measurement of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ). A critical evaluation. *J Biol Chem.*, 270(17), pp.9896-9903.

Brochet, D., Yang, D., Maio, A., Lederer, W., Franzini-Armstrong, C. & Cheng, H. (2005).  $\text{Ca}^{2+}$  blinks: Rapid nanoscopic store calcium signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(8), pp.3099-3104.

Brothwell, S., Barber, J., Monaghan, D., Jane, D., Gibb, A. & Jones, S. (2008). NR2B- and NR2D-containing synaptic NMDA receptors in developing rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurones. *The Journal of Physiology*, 586(3), pp.739-750.

- Brun, C., Philip-Couderc, P., Raggenbass, M., Roatti, A. & Baertschi, A.J. (2006). Intracellular targeting of truncated secretory peptides in the mammalian heart and brain. *The FASEB Journal.*, 20(6), pp.732-734.
- Brunner, Y., Coute, Y., Iezzi, M., Foti, M., Fukuda, M., Hochstrasser, D., Wollheim, C. & Sanchez, J. (2007). Proteomics Analysis of Insulin Secretory Granules. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6(6), pp.1007-1017.
- Buck, W., Rakow, T. & Shen, S. (1992). Synergistic release of calcium in sea urchin eggs by caffeine and ryanodine. *Experimental Cell Research*, 202(1), pp.59-66.
- Bulenda, D. & Gratzl, M. (1985). Matrix-free calcium in isolated chromaffin vesicles. *Biochemistry*, 24(26), pp.7760-7765.
- Buraei, Z. & Yang, J. (2010). The  $\beta$  Subunit of Voltage-Gated  $\text{Ca}^{2+}$  Channels. *Physiological Reviews*, 90(4), pp.1461-1506.
- Burnashev, N. & Rozov, A. (2005). Presynaptic  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics,  $\text{Ca}^{2+}$  buffers and synaptic efficacy. *Cell Calcium*, 37(5), pp.489-495.
- Cahalan, M. (2009). STIMulating store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry. *Nature Cell Biology*, 11(6), pp.669-677.
- Calcraft, P., Ruas, M., Pan, Z., Cheng, X., Arredouani, A., Hao, X., Tang, J., Rietdorf, K., Teboul, L., Chuang, K., Lin, P., Xiao, R., Wang, C., Zhu, Y., Lin, Y., Wyatt, C., Parrington, J., Ma, J., Evans, A., Galione, A. & Zhu, M. (2009). NAADP mobilizes calcium from acidic organelles through two-pore channels. *Nature*, 459(7246), pp.596-600.
- Camacho, M., Machado, J., Álvarez, J. & Borges, R. (2008). Intravesicular calcium release mediates the motion and exocytosis of secretory organelles: a study with adrenal chromaffin cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283(33), pp.22383-22389.
- Camacho, M., Machado, J., Montesinos, M., Criado, M. & Borges, R. (2006). Intragranular pH rapidly modulates exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Journal of Neurochemistry*, 96(2), pp.324-334.
- Camello, C., Lomax, R., Petersen, O. & Tepikin, A. (2002). Calcium leak from intracellular stores—the enigma of calcium signalling. *Cell Calcium*, 32(5-6), pp.355-361.
- Carafoli E. (1991). Calcium pump of the plasma membrane. *Physiol Rev*, 71(1), pp.129-153.
- Carafoli, E., Genazzani, A. & Guerini, D. (1999). Calcium Controls the Transcription of Its Own Transporters and Channels in Developing Neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 266(3), pp.624-632.
- Carlson, A., Westenbroek, R., Quill, T., Ren, D., Clapham, D., Hille, B., Garbers, D. & Babcock, D. (2003). CatSper1 required for evoked  $\text{Ca}^{2+}$  entry and control of flagellar function in sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(25), pp.14864-14868.



- Catterall, W. (2011). Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(8), pp.a003947-a003947.
- Ceni, C. Muller-Steffner, H., Lund, F., Pochon, N., Schweitzer, A., De Waard, M., Schuber, F., Villaz, M. & Moutin, M. (2003). Evidence for an Intracellular ADP-ribosyl Cyclase/NAD<sup>+</sup>-glycohydrolase in Brain from CD38-deficient Mice. *Journal of Biological Chemistry*, 278(42), pp.40670-40678.
- Chanat, E. & Huttner, W. (1991). Milieu-induced, selective aggregation of regulated secretory proteins in the trans-Golgi network. *The Journal of Cell Biology*, 115(6), pp.1505-1519.
- Chen, R., Valencia, I., Zhong, F., McColl, K., Roderick, H., Bootman, M., Berridge, M., Conway, S., Holmes, A., Mignery, G., Velez, P. & Distelhorst, C. (2004). Bcl-2 functionally interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate receptors to regulate calcium release from the ER in response to inositol 1,4,5-trisphosphate. *J Cell Biol*, 166(2), pp.193-203.
- Chen, Y. & Scheller, R. (2001). SNARE-mediated membrane fusion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(2), pp.98-106.
- Chen, Y., Chen, Y., Chiu, W. & Shen, M. (2013). Remodeling of calcium signaling in tumor progression. *J Biomed Sci*, 20(1), p.23.
- Cheng, H. & Lederer, W. (2008). Calcium Sparks. *Physiological Reviews*, 88(4), pp.1491-1545.
- Cheng, X., Shen, D., Samie, M. & Xu, H. (2010). Mucolipins: Intracellular TRPML1-3 channels. *FEBS Letters*, 584(10), pp.2013-2021.
- Chicka, M. & Strehler, E. (2003). Alternative Splicing of the First Intracellular Loop of Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase Isoform 2 Alters Its Membrane Targeting. *Journal of Biological Chemistry*, 278(20), pp.18464-18470.
- Cho, J., Ko, K., Singaravelu, G. & Ahnn, J. (2004). *Caenorhabditis elegans* PMR1, a P-type calcium ATPase, is important for calcium/manganese homeostasis and oxidative stress response. *FEBS Letters*, 579(3), pp.778-782.
- Christakos, S., Dhawan, P., Peng, X., Obukhov, A., Nowycky, M., Benn, B., Zhong, Y., Liu, Y. & Shen, Q. (2007). New insights into the function and regulation of vitamin D target proteins. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 103(3-5), pp.405-410.
- Churchill, G., Okada, Y., Thomas, J., Genazzani, A., Patel, S. & Galione, A. (2002). NAADP Mobilizes Ca<sup>2+</sup> from Reserve Granules, Lysosome-Related Organelles, in Sea Urchin Eggs. *Cell*, 111(5), pp.703-708.
- Clapham, D. (1995). Calcium signaling. *Cell*, 80(2), pp.259-268.
- Clapham, D. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature*, 426(6966), pp.517-524.

Clausen, J., McIntosh, D., Woolley, D. & Andersen, J. (2001). Importance of Thr-353 of the Conserved Phosphorylation Loop of the Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase in MgATP Binding and Catalytic Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 276(38), pp.35741-35750.

Clemente, F. & Meldolesi, J. (1975). Calcium and pancreatic secretion-dynamics of subcellular calcium pools in resting and stimulated acinar cells. *British Journal of Pharmacology*, 55(3), pp.369-379.

Cobbold, P. & Lee, J. (1991). In cellular calcium: A practical approach (McCormack, J. & Cobbold, P. eds). *Oxford University Press*, Oxford, UK. pp.55-81.

Collin, T., Chat M., Lucas MG., Moreno H., Racay P., Schwaller B., Marty A. & Llano I. (2005). Developmental Changes in Parvalbumin Regulate Presynaptic Ca<sup>2+</sup> Signaling. *Journal of Neuroscience*, 25(1), pp.96-107.

Cordeiro, J., Goncalves, P. & Dunant, Y. (2011). Synaptic vesicles control the time course of neurotransmitter secretion via a Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiport. *The Journal of Physiology*, 589(1), pp.149-167.

Csordás, G., Várnai, P., Golenár, T., Roy, S., Purkins, G., Schneider, T., Balla, T. & Hajnóczky, G. (2010). Imaging Interorganelle Contacts and Local Calcium Dynamics at the ER-Mitochondrial Interface. *Molecular Cell*, 39(1), pp.121-132.

Dally, S., Bredoux, R., Corvazier, E., Andersen, J., Clausen, J., Dode, L., Fanchaouy, M., Gelebart, P., Monceau, V., Del Monte, F., Gwathmey, J., Hajjar, R., Chaabane, C., Bobe, R., Raies, A. & Enouf, J. (2006). Ca<sup>2+</sup>-ATPases in non-failing and failing heart: evidence for a novel cardiac sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase 2 isoform (SERCA2c). *Biochem. J.*, 395(2), pp.249-258.

Day, R. & Davidson, M. (2009). The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chemical Society Reviews*, 38(10), p.2887.

De la Fuente, S., Fonteriz, R., de la Cruz, P., Montero, M. & Álvarez, J. (2012). Mitochondrial free [Ca<sup>2+</sup>] dynamics measured with a novel low-Ca<sup>2+</sup> affinity aequorin probe. *Biochem. J.*, 445(3), pp.371-376.

De la Fuente, S., Fonteriz, R., Montero, M. & Álvarez, J. (2013). Ca<sup>2+</sup> homeostasis in the endoplasmic reticulum measured with a new low-Ca<sup>2+</sup>-affinity targeted aequorin. *Cell Calcium*, 54(1), pp.37-45.

De la Fuente, S., Montenegro, P., Fonteriz, R., Moreno, A., Lobatón, C., Montero, M. & Álvarez, J. (2010). The dynamics of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> fluxes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1797(10), pp.1727-1735.

De Matteis, M. & Luini, A. (2008). Exiting the Golgi complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(4), pp.273-284.

De Stefani, D., Patron, M. & Rizzuto, R. (2015). Structure and function of the mitochondrial calcium uniporter complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1853(9), pp.2006-2011.

- De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabò, I. & Rizzuto, R. (2011). A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 476(7360), pp.336-340.
- Deak, F., Shin, O., Kavalali, E. & Sudhof, T. (2006). Structural Determinants of Synaptobrevin 2 Function in Synaptic Vesicle Fusion. *Journal of Neuroscience*, 26(25), pp.6668-6676.
- Dean, P. (1973). Ultrastructural morphometry of the pancreatic  $\beta$ -cell. *Diabetologia*, 9(2), pp.115-119.
- Deisseroth, K., Mermelstein, P., Xia, H. & Tsien, R. (2003). Signaling from synapse to nucleus: the logic behind the mechanisms. *Current Opinion in Neurobiology*, 13(3), pp.354-365.
- Del Castillo, J. & Katz, B. (1954). Quantal components of the end-plate potential. *The Journal of Physiology*, 124(3), pp.560-573.
- Deng, L., Markova, S., Vysotski, E., Liu, Z., Lee, J., Rose, J. & Wang, B. (2004). Crystal structure of a  $\text{Ca}^{2+}$ -discharged photoprotein: implications for mechanisms of the calcium trigger and bioluminescence. *Journal of Biological Chemistry*, 279(32), pp.33647-33652.
- Denton, R. (2009). Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1787(11), pp.1309-1316.
- Dickson, E., Duman, J., Moody, M., Chen, L. & Hille, B. (2012). Orai-STIM-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  release from secretory granules revealed by a targeted  $\text{Ca}^{2+}$  and pH probe. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(51), pp.E3539-E3548.
- Dispersyn, G., Nuydens, R., Borgers, M. & Geerts, H. (1999). Nimodipine and flunarizine have different effects on survival and morphology of PC12 cells during nerve growth factor deprivation. *European Journal of Pharmacology*, 384(1), pp.61-70.
- Docampo, R., de Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P. & Moreno, S. (2005). Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), pp.251-261.
- Dode, L., Andersen, J., Vanoevelen, J., Raeymaekers, L., Missiaen, L., Vilsen, B. & Wuytack, F. (2006). Dissection of the Functional Differences between Human Secretory Pathway  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase (SPCA) 1 and 2 Isoenzymes by Steady-state and Transient Kinetic Analyses. *Journal of Biological Chemistry*, 281(6), pp.3182-3189.
- Dolmetsch, R. (2003). Excitation-Transcription Coupling: Signaling by Ion Channels to the Nucleus. *Science Signaling*, 2003(166), pp.pe4-pe4.
- Dolphin, A. (2006). A short history of voltage-gated calcium channels. *British Journal of Pharmacology*, 147(S1), pp.S56-S62.
- Domínguez, N., Estévez-Herrera, J., Pardo, M., Pereda, D., Machado, J. & Borges, R. (2012). The Functional Role of Chromogranins in Exocytosis. *Journal of Molecular Neuroscience*, 48(2), pp.317-322.

- Douglas, W. (1968). Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *British Journal of Pharmacology*, 34(3), pp.451-474.
- Du, G., Sandhu, B., Khanna, V., Guo, X. & MacLennan, D. (2002). Topology of the Ca<sup>2+</sup> release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum (RyR1). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(26), pp.16725-16730.
- Duman, J., Chen, L., Palmer, A. & Hille, B. (2006). Contributions of Intracellular Compartments to Calcium Dynamics: Implicating an Acidic Store. *Traffic*, 7(7), pp.859-872.
- Endo, Y., Harada, K., Fujishiro, N., Funahashi, H., Shioda, S., Prestwich, G., Mikoshiba, K. & Inoue, M. (2006). Organelles Containing Inositol Trisphosphate Receptor Type 2 in Adrenal Medullary Cells. *The Journal of Physiological Sciences*, 56(6), pp.415-423.
- Ertel, E., Campbell, K., Harpold, M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T., Tanabe, T., Birnbaumer, L., Tsien, R. & Catterall, W. (2000). Nomenclature of Voltage-Gated Calcium Channels. *Neuron*, 25(3), pp.533-535.
- Faddy, H., Smart, C., Xu, R., Lee, G., Kenny, P., Feng, M., Rao, R., Brown, M., Bissell, M., Roberts-Thomson, S. & Monteith, G. (2008). Localization of plasma membrane and secretory calcium pumps in the mammary gland. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 369(3), pp.977-981.
- Faouzi, M., Hague, F., Potier, M., Ahidouch, A., Sevestre, H. & Ouadid-Ahidouch, H. (2011). Down-regulation of Orai3 arrests cell-cycle progression and induces apoptosis in breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells. *J. Cell. Physiol.*, 226(2), pp.542-551.
- Fasolato, C., Zottini, M., Clementi, E., Zacchetti, D., Meldolesi, J. & Pozzan, T. (1991). Intracellular Ca<sup>2+</sup> pools in PC12 cells. Three intracellular pools are distinguished by their turnover and mechanisms of Ca<sup>2+</sup> accumulation, storage, and release. *J Biol Chem.*, 25(266(30)), pp.20159-67.
- Fatt, P. & Katz, B. (1953). The electrical properties of crustacean muscle fibres. *The Journal of Physiology*, 120(1-2), pp.171-204.
- Fedida-Metula, S., Feldman, B., Koshelev, V., Levin-Gromiko, U., Voronov, E. & Fishman, D. (2012). Lipid rafts couple store-operated Ca<sup>2+</sup> entry to constitutive activation of PKB/Akt in a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-, Src- and PP2A-mediated pathway and promote melanoma tumor growth. *Carcinogenesis*, 33(4), pp.740-750.
- Fedorenko, O., Popugaeva, E., Enomoto, M., Stathopoulos, P., Ikura, M. & Bezprozvanny, I. (2014). Intracellular calcium channels: Inositol-1,4,5-trisphosphate receptors. *European Journal of Pharmacology*, 739, pp.39-48.
- Ferrero, E., Lo Buono, N., Horenstein, A., Funaro, A. & Malavasi, F. (2014). The ADP-ribosyl cyclases - the current evolutionary state of the ARCs. *Frontiers in Bioscience*, 19(6), p.986.

Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S., Tanasa, B., Hogan, P., Lewis, R., Daly, M. & Rao, A. (2006). A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*, 441(7090), pp.179-185.

Ficarella, R., Di Leva, F., Bortolozzi, M., Ortolano, S., Donaudy, F., Petrillo, M., Melchionda, S., Lelli, A., Domi, T., Fedrizzi, L., Lim, D., Shull, G., Gasparini, P., Brini, M., Mammano, F. & Carafoli, E. (2007). A functional study of plasma-membrane calcium-pump isoform 2 mutants causing digenic deafness. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(5), pp.1516-1521.

Fieni, F., Bae Lee, S., Jan, Y. & Kirichok, Y. (2012). Activity of the mitochondrial calcium uniporter varies greatly between tissues. *Nature Communications*, 3, p.1317.

Flavell, S. & Greenberg, M. (2008). Signaling Mechanisms Linking Neuronal Activity to Gene Expression and Plasticity of the Nervous System. *Annu. Rev. Neurosci.*, 31(1), pp.563-590.

Flucher, B., Obermair, G., Tuluc, P., Schredelseker, J., Kern, G. & Grabner, M. (2005). The role of auxiliary dihydropyridine receptor subunits in muscle. *J Muscle Res Cell Motil*, 26(1), pp.1-6.

Foresta, C. & Rossato, M (1997). Calcium influx pathways in human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*, 3(1), pp.1-4.

Foskett, J., White, C., Cheung, K. & Mak, D. (2007). Inositol Trisphosphate Receptor  $Ca^{2+}$  Release Channels. *Physiological Reviews*, 87(2), pp.593-658.

Fossier, P., Diebler, M., Mothet, J., Israel, M., Tauc, L. & Baux, G. (1998). Control of the calcium concentration involved in acetylcholine release and its facilitation: an additional role for synaptic vesicles?. *Neuroscience*, 85(1), pp.85-91.

Franzini-Armstrong, C. (1970). Studies of the triad: I. Structure of the Junction in Frog Twitch Fibers. *The Journal of Cell Biology*, 47(2), pp.488-499.

Friedman, J. & Voeltz, G. (2011). The ER in 3D: a multifunctional dynamic membrane network. *Trends in Cell Biology*, 21(12), pp.709-717.

Fritz, N., Macrez N., Mironneau J., Jeyakumar LH., Fleischer S. & Morel JL. (2005). Ryanodine receptor subtype 2 encodes  $Ca^{2+}$  oscillations activated by acetylcholine via the M2 muscarinic receptor/cADP-ribose signalling pathway in duodenum myocytes. *Journal of Cell Science*, 118(10), pp.2261-2270.

Fukuda, M. (2008). Membrane traffic in the secretory pathway. *Cell. Mol. Life Sci.*, 65(18), pp.2801-2813.

Gadsby, D. (2007). Structural biology: Ion pumps made crystal clear. *Nature*, 450(7172), pp.957-959.

Galione, A. (2011). NAADP Receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(1), pp.a004036-a004036.

Galione, A., Lee, H. & Busa, W. (1991).  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release in sea urchin egg homogenates: modulation by cyclic ADP-ribose. *Science*, 253(5024), pp.1143-1146.

Galione, A., Morgan, A., Arredouani, A., Davis, L., Rietdorf, K., Ruas, M. & Parrington, J. (2010). NAADP as an intracellular messenger regulating lysosomal calcium-release channels. *Biochim. Soc. Trans.*, 38(6), pp.1424-1431.

Gall D., Roussel C., Susa I., D'Angelo E., Rossi P., Bearzatto B., Galas MC., Blum D., Schurmans S. & Schiffmann SN. (2003). Altered neuronal excitability in cerebellar granule cells of mice lacking calcitonin. *J Neurosci*, 15;23(28), pp.9320-9327.

Gall, D., Gromada, J., Susa, I., Rorsman, P., Herchuelz, A. & Bokvist, K. (1999). Significance of Na/Ca Exchange for  $\text{Ca}^{2+}$  Buffering and Electrical Activity in Mouse Pancreatic  $\beta$ -Cells. *Biophysical Journal*, 76(4), pp.2018-2028.

Garcia, A., Garcia-De-Diego, A., Gandia, L., Borges, R. & Garcia-Sancho, J. (2006). Calcium Signaling and Exocytosis in Adrenal Chromaffin Cells. *Physiological Reviews*, 86(4), pp.1093-1131.

García, A., Padín, F., Fernández-Morales, J., Maroto, M. & García-Sancho, J. (2012). Cytosolic organelles shape calcium signals and exo–endocytotic responses of chromaffin cells. *Cell Calcium*, 51(3-4), pp.309-320.

Ge, Q., Dong, Y., Hu, Z., Wu, Z. & Xu, T. (2006). Characteristics of  $\text{Ca}^{2+}$ -exocytosis coupling in isolated mouse pancreatic  $\beta$ -cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27(7), pp.933-938.

Gehlert, S., Bloch, W. & Suhr, F. (2015).  $\text{Ca}^{2+}$ -Dependent Regulations and Signaling in Skeletal Muscle: From Electro-Mechanical Coupling to Adaptation. *IJMS*, 16(1), pp.1066-1095.

Gerasimenko, J., Sherwood, M., Tepikin, A., Petersen, O. & Gerasimenko, O. (2006). NAADP, cADPR and IP3 all release  $\text{Ca}^{2+}$  from the endoplasmic reticulum and an acidic store in the secretory granule area. *Journal of Cell Science*, 119(2), pp.226-238.

Gerasimenko, O., Gerasimenko, J., Belan, P. & Petersen, O. (1996). Inositol Trisphosphate and Cyclic ADP-Ribose–Mediated Release of  $\text{Ca}^{2+}$  from Single Isolated Pancreatic Zymogen Granules. *Cell*, 84(3), pp.473-480.

Gilon, P., Chae, H., Rutter, G. & Ravier, M. (2014). Calcium signaling in pancreatic  $\beta$ -cells in health and in Type 2 diabetes. *Cell Calcium*, 56(5), pp.340-361.

Gincel, D., Zaid, H. & Shoshan-Barmatz, V. (2001). Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *Biochem. J.*, 358(1), pp.147-155.

Giniatullin, R. & Nistri, A. (2013). Desensitization properties of P2X3 receptors shaping pain signaling. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7.

Gonçalves, P., Meireles, S., Neves, P. & Vale, M. (2000). Distinction between  $\text{Ca}^{2+}$  pump and  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  antiport activities in synaptic vesicles of sheep brain cortex. *Neurochemistry International*, 37(4), pp.387-396.

Greene, L. & Tischler, A. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(7), pp.2424-2428.

Guatimosim, S., Amaya, M., Guerra, M., Aguiar, C., Goes, A., Gómez-Viquez, N., Rodrigues, M., Gomes, D., Martins-Cruz, J., Lederer, W. & Leite, M. (2008). Nuclear  $Ca^{2+}$  regulates cardiomyocyte function. *Cell Calcium*, 44(2), pp.230-242.

Gündisch, D. & Eibl, C. (2011). Nicotinic acetylcholine receptor ligands, a patent review (2006 – 2011). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 21(12), pp.1867-1896.

Gunter, TE. & Pfeiffer, DR. (1990). Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol*, 258 (5 Pt 1), pp.C755-786.

Günteski-Hamblin, A., Clarke, D. & Shull, G. (1992). Molecular cloning and tissue distribution of alternatively spliced mRNAs encoding possible mammalian homologs of the yeast secretory pathway calcium pump. *Biochemistry*, 31(33), pp.7600-7608.

Guse, A. (2012). Linking NAADP to Ion Channel Activity: A Unifying Hypothesis. *Science Signaling*, 5(221), pp.pe18-pe18.

Guse, A., Gu, X., Zhang, L., Weber, K., Kramer, E., Yang, Z., Jin, H., Li, Q., Carrier, L. & Zhang, L. (2005). A Minimal Structural Analogue of Cyclic ADP-ribose: Synthesis and calcium release activity in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(16), pp.15952-15959.

Habermacher, C., Dunning, K., Chataigneau, T. & Grutter, T. (2016). Molecular structure and function of P2X receptors. *Neuropharmacology*, 104, pp.18-30.

Hackney, C., Mahendrasingam S., Penn A. & Fettiplace R. (2005). The Concentrations of Calcium Buffering Proteins in Mammalian Cochlear Hair Cells. *Journal of Neuroscience*, 25(34), pp.7867-7875.

Haigh, J. & Phillips, J. (1993). Indirect coupling of calcium transport in chromaffin granule ghosts to the proton pump. *NeuroReport*, 4(5), pp.571-574.

Haigh, J., Parris, R. & Phillips, J. (1989). Free concentrations of sodium, potassium and calcium in chromaffin granules. *Biochem. J.*, 259(2), pp.485-491.

Hakamata, Y., Nakai, J., Takeshima, H. & Imoto, K. (1992). Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain. *FEBS Letters*, 312(2-3), pp.229-235.

Haller, T., Dietl, P., Deetjen, P. & Völkl, H. (1996). The lysosomal compartment as intracellular calcium store in MDCK cells: a possible involvement in InsP3-mediated  $Ca^{2+}$  release. *Cell Calcium*, 19(2), pp.157-165.

Hao, M., Li, X., Rizzo, M., Rocheleau, J., Dawant, B. & Piston, D. (2005). Regulation of two insulin granule populations within the reserve pool by distinct calcium sources. *Journal of Cell Science*, 118(24), pp.5873-5884.

- He, Z., Feng, S., Tong, Q., Hilgemann, DW. & Philipson, KD. (2000). Interaction of PIP(2) with the XIP region of the cardiac Na/Ca exchanger. *Am J Physiol Cell Physiol*, 278(4), pp.C661-666.
- Head, J., Inouye, S., Teranishi, K. & Shimomura, O. (2000). The crystal structure of the photoprotein aequorin at 2.3 Å resolution. *Nature*, 405(6784), pp.372-376.
- Henderson, SA., Goldhaber, JI., So, JM., Han, T., Motter, C., Ngo, A., Chantawansri, C., Ritter, MR., Friedlander, M., Nicoll, DA., Frank, JS., Jordan, MC., Roos, KP., Ross, RS. & Philipson, KD. (2004). Functional Adult Myocardium in the Absence of Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> Exchange: Cardiac-Specific Knockout of NCX1. *Circulation Research*, 95(6), pp.604-611.
- Hengartner, M. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805), pp.770-776.
- Hilden, S. & Madias, N. (1989). H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange in rabbit renal cortical endosomes. *The Journal of Membrane Biology*, 112(2), pp.131-138.
- Hoenderop, J., Nilius, B. & Bindels, R. (2005). Calcium Absorption Across Epithelia. *Physiological Reviews*, 85(1), pp.373-422.
- Hofmann, T., Obukhov, A., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T., & Schultz, G. (1999). Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature*, 397(6716), pp.259-263.
- Hogan, P. & Rao, A. (2015). Store-operated calcium entry: Mechanisms and modulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 460(1), pp.40-49.
- Hohenegger, M., Suko, J., Gscheidlinger, R., Drobny, H. & Zidar, A. (2002). Nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate activates the skeletal muscle ryanodine receptor. *Biochem. J.*, 367(2), pp.423-431.
- Holmsen, H. & Weiss, H. (1979). Secretory Storage Pools in Platelets. *Annual Review of Medicine*, 30(1), pp.119-134.
- Hooper, R. & Patel, S. (2012). NAADP on Target. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp.325-347.
- Hoth, M. & Penner, R. (1992). Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*, 355(6358), pp.353-356.
- Hou, J., Min, L. & Pessin, J. (2009). Chapter 16 Insulin Granule Biogenesis, Trafficking and Exocytosis. *Vitamins & Hormones*, pp.473-506.
- Hou, X., Pedi, L., Diver, M. & Long, S. (2012). Crystal Structure of the Calcium Release-Activated Calcium Channel Orai. *Science*, 338(6112), pp.1308-1313.
- Hu, Z., Bonifas, J., Beech, J., Bench, G., Shigihara, T., Ogawa, H., Ikeda, S., Mauro, T. & Epstein, EH Jr. (2000). Mutations in ATP2C1, encoding a calcium pump, cause Hailey-Hailey disease. *Nature Genetics*, 24(1), pp.61-65.



- Huang, P., Zou, Y., Zhong, X., Cao, Q., Zhao, K., Zhu, M., Murrell-Lagnado, R. & Dong, X. (2014). P2X4 Forms Functional ATP-activated Cation Channels on Lysosomal Membranes Regulated by Luminal pH. *Journal of Biological Chemistry*, 289(25), pp.17658-17667.
- Huh, Y., Jeon, S., Yoo, J., Park, S. & Yoo, S. (2005). Effects of Chromogranin Expression on Inositol 1,4,5-Trisphosphate-Induced Intracellular Ca<sup>2+</sup> Mobilization. *Biochemistry*, 44(16), pp.6122-6132.
- Hutton, J., Penn, E. & Peshavaria, M. (1983). Low-molecular-weight constituents of isolated insulin-secretory granules. Bivalent cations, adenine nucleotides and inorganic phosphate. *Biochem. J.*, 210(2), pp.297-305.
- Hwang, J., Zorzato, F., Clarke, N. & Treves, S. (2012). Mapping domains and mutations on the skeletal muscle ryanodine receptor channel. *Trends in Molecular Medicine*, 18(11), pp.644-657.
- Iezzi, M., Theander, S., Janz, R., Loze, C. & Wollheim, C. (2005). SV2A and SV2C are not vesicular Ca<sup>2+</sup> transporters but control glucose-evoked granule recruitment. *Journal of Cell Science*, 118(23), pp.5647-5660.
- Inomoto, C., Umemura, S., Egashira, N., Minematsu, T., Takekoshi, S., Itoh, Y., Itoh, J., Taupenot, L., O'Connor, D. & Osamura, R. (2007). Granulogenesis in Non-neuroendocrine COS-7 Cells Induced by EGFP-tagged Chromogranin A Gene Transfection: Identical and Distinct Distribution of CgA and EGFP. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 55(5), pp.487-493.
- Inouye, S., Noguchi, M., Sakaki, Y., Takagi, Y., Miyata, T., Iwanaga, S., Miyata, T. & Tsuji, F. (1985). Cloning and sequence analysis of cDNA for the luminescent protein aequorin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(10), pp.3154-3158.
- Ishida, Y., Nayak, S., Mindell, J. & Grabe, M. (2013). A model of lysosomal pH regulation. *The Journal of General Physiology*, 141(6), pp.705-720.
- Islam, M. (2002). The Ryanodine Receptor Calcium Channel of  $\beta$ -Cells: Molecular Regulation and Physiological Significance. *Diabetes*, 51(5), pp.1299-1309.
- Iwamoto, T., Watano, T. & Shigekawa, M. (1996). A Novel Isothiourea Derivative Selectively Inhibits the Reverse Mode of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Exchange in Cells Expressing NCX1. *Journal of Biological Chemistry*, 271(37), pp.22391-22397.
- James, D. & Martin, T. (2013). CAPS and Munc13: CATCHRs that SNARE Vesicles. *Frontiers in Endocrinology*, 4.
- Jeon, D., Yang, Y., Jeong, M., Philipson, K., Rhim, H. & Shin, H. (2003). Enhanced Learning and Memory in Mice Lacking Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Exchanger 2. *Neuron*, 38(6), pp.965-976.
- Jiang, D., Zhao, L., Clish, C. & Clapham, D. (2013). Letm1, the mitochondrial Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter, is essential for normal glucose metabolism and alters brain function in Wolf-Hirschhorn syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(24), pp.E2249-E2254.
- Johannes, L., Lledo, P., Roa, M., Vincent, J., Henry, J. & Darchen, F. (1994). The GTPase Rab3a controls calcium-dependent exocytosis negatively. *Journal of Physiology-Paris*, 88(6), p.403.

- Joiner, M., Koval, O., Li, J., He, B., Allamargot, C., Gao, Z., Luczak, E., Hall, D., Fink, B., Chen, B., Yang, J., Moore, S., Scholz, T., Strack, S., Mohler, P., Sivitz, W., Song, L. & Anderson, M. (2012). CaMKII determines mitochondrial stress responses in heart. *Nature*, 491(7423), pp.269-273.
- Jouaville, L., Pinton, P., Bastianutto, C., Rutter, G. & Rizzuto, R. (1999). Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: Evidence for a long-term metabolic priming. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(24), pp.13807-13812.
- Kaether, C. & Gerdes, H. (1995). Visualization of protein transport along the secretory pathway using green fluorescent protein. *FEBS Letters*, 369(2-3), pp.267-271.
- Kaipio, K. & Pesonen, U. (2009). The intracellular mobility of NPY and a putative mitochondrial form of NPY in neuronal cells. *Neuroscience Letters*, 450(2), pp.181-185.
- Kaipio, K., Kallio, J. & Pesonen, U. (2005). Mitochondrial targeting signal in human neuropeptide Y gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337(2), pp.633-640.
- Karlin, A. (1993). Structure of nicotinic acetylcholine receptors. *Current Opinion in Neurobiology*, 3(3), pp.299-309.
- Kasri, N., Holmes, A., Bultynck, G., Parys, J., Bootman, M., Rietdorf, K., Missiaen, L., McDonald, F., Smedt, H., Conway, S., Holmes, A., Berridge, M. & Roderick, H. (2004). Regulation of InsP3 receptor activity by neuronal Ca<sup>2+</sup>-binding proteins. *EMBO J*, 23(2), pp.312-321.
- Kendall, J., Sala-Newby, G., Ghalaut, V., Dormer, R. & Cambell, A. (1992). Engineering the Ca<sup>2+</sup>-activated photoprotein aequorin with reduced affinity for calcium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 187(2), pp.1091-1097.
- Kerr, J., Wyllie, A. & Currie, A. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer*, 26(4), pp.239-257.
- Kimura, T., Nakamori, M., Lueck, J., Pouliquin, P., Aoike, F., Fujimura, H., Dirksen, R., Takahashi, M., Dulhunty, A. & Sakoda, S. (2005). Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase in myotonic dystrophy type 1. *Human Molecular Genetics*, 14(15), pp.2189-2200.
- Kirichok, Y., Krapivinsky, G. & Clapham, D. (2004). The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature*, 427(6972), pp.360-364.
- Kirichok, Y., Navarro, B. & Clapham, D. (2006). Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca<sup>2+</sup> channel. *Nature*, 439(7077), pp.737-740.
- Kober, L., Zehe, C. & Bode, J. (2012). Development of a novel ER stress based selection system for the isolation of highly productive clones. *Biotechnol. Bioeng.*, 109(10), pp.2599-2611.

- Kondratskyi, A., Kondratska, K., Skryma, R. & Prevarskaya, N. (2015). Ion channels in the regulation of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1848(10), pp.2532-2546.
- Konieczny, V., Keebler, M. & Taylor, C. (2012). Spatial organization of intracellular  $Ca^{2+}$  signals. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 23(2), pp.172-180.
- Kopell, W. & Westhead, E. (1982). Osmotic pressures of solutions of ATP and catecholamines relating to storage in chromaffin granules. *J Biol Chem.*, 257(10), pp.5707-10.
- Koshimizu, H., Kim, T., Cawley, N. & Loh, Y. (2010). Chromogranin A: A new proposal for trafficking, processing and induction of granule biogenesis. *Regulatory Peptides*, 160(1-3), pp.153-159.
- Koulen, P., Cai, Y., Geng, L., Maeda, Y., Nishimura, S., Witzgall, R., Ehrlich, B. & Somlo, S. (2002). Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel. *Nature Cell Biology*, 4(3), pp.191-197.
- Krieger-Brauer, H. & Gratzl, M. (1983). Effects of Monovalent and Divalent Cations on  $Ca^{2+}$  Fluxes Across Chromaffin Secretory Membrane Vesicles. *Journal of Neurochemistry*, 41(5), pp.1269-1276.
- Kroemer, G., Galluzzi, L. & Brenner, C. (2007). Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiological Reviews*, 87(1), pp.99-163.
- Kuhr, F., Smith, K., Song, M., Levitan, I. & Yuan, J. (2012). New mechanisms of pulmonary arterial hypertension: role of  $Ca^{2+}$  signaling. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 302(8), pp.H1546-H1562.
- LaConte, L., Chavan, V. & Mukherjee, K. (2014). Identification and Glycerol-Induced Correction of Misfolding Mutations in the X-Linked Mental Retardation Gene CASK. *PLoS ONE*, 9(2), p.e88276.
- Lai, P. & Michelangeli, F. (2012). Bis(2-hydroxy-3-tert-butyl-5-methyl-phenyl)-methane (bis-phenol) is a potent and selective inhibitor of the secretory pathway  $Ca^{2+}$  ATPase (SPCA1). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 424(3), pp.616-619.
- Lam, A. & Galione, A. (2013). The endoplasmic reticulum and junctional membrane communication during calcium signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(11), pp.2542-2559.
- Lamason, R. Mohideen, MA., Mest, JR., Wong, AC., Norton, HL., Aros, MC., Juryne, MJ., Mao, X., Humphreys, VR., Humbert, JE., Sinha, S., Moore, JL., Jagadeeswaran, P., Zhao, W., Ning, G., Makalowska, I., McKeigue, PM., O'donnell, D., Kittles, R., Parra, EJ., Mangini, NJ., Grunwald, DJ., Shriver, MD., Canfield, VA. & Cheng, KC. (2005). SLC24A5, a Putative Cation Exchanger, Affects Pigmentation in Zebrafish and Humans. *Science*, 310(5755), pp.1782-1786.
- Lamb, H., Mee, C., Xu, W., Liu, L., Blond, S., Cooper, A., Charles, I. & Hawkins, A. (2006). The Affinity of a Major  $Ca^{2+}$  Binding Site on GRP78 Is Differentially Enhanced by ADP and ATP. *Journal of Biological Chemistry*, 281(13), pp.8796-8805.

- Lang, T., Wacker, I., Steyer, J., Kaether, C., Wunderlich, I., Soldati, T., Gerdes, H. & Almers, W. (1997). Ca<sup>2+</sup>-Triggered Peptide Secretion in Single Cells Imaged with Green Fluorescent Protein and Evanescent-Wave Microscopy. *Neuron*, 18(6), pp.857-863.
- Lange, I., Yamamoto, S., Partida-Sanchez, S., Mori, Y., Fleig, A. & Penner, R. (2009). TRPM2 Functions as a Lysosomal Ca<sup>2+</sup>-Release Channel in  $\beta$  Cells. *Science Signaling*, 2(71), pp.ra23-ra23.
- Lanner, J., Georgiou, D., Joshi, A. & Hamilton, S. (2010). Ryanodine Receptors: Structure, Expression, Molecular Details, and Function in Calcium Release. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(11), pp.a003996-a003996.
- Laslop, A. & Mahata, S. (2002). Neuropeptides and Chromogranins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 971(1), pp.294-299.
- Launay, P., Fleig, A., Perraud, A., Scharenberg, A., Penner, R. & Kinet, J. (2002). TRPM4 Is a Ca<sup>2+</sup>-Activated Nonselective Cation Channel Mediating Cell Membrane Depolarization. *Cell*, 109(3), pp.397-407.
- Lee HC., Galione A. & Walseth TF. (1994). Cyclic ADP-ribose: metabolism and calcium mobilizing function. *Vitam Horm*, 48, pp.199-257.
- Lee, H. (2000). Multiple Calcium Stores: Separate but Interacting. *Science Signaling*, 2000(40), pp.pe1-pe1.
- Lee, H., Jeong, J. & Lee, K. (2009). Characterization of Vesicles Secreted from Insulinoma NIT-1 Cells. *J. Proteome Res.*, 8(6), pp.2851-2862.
- Lin, P., Le-Niculescu, H., Hofmeister, R., Michael McCaffery, J., Jin, M., Hennemann, H., McQuistan, T., De Vries, L. & Farquhar, M. (1998). The Mammalian Calcium-binding Protein, Nucleobindin (CALNUC), Is a Golgi Resident Protein. *J Cell Biol*, 141(7), pp.1515-1527.
- Lindau, M., Albillos, A., Dernick, G., Horstmann, H., Almers, W. & de Toledo, G. (1997). The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry. *Nature*, 389(6650), pp.509-512.
- Lin-Moshier, Y., Walseth, T., Churamani, D., Davidson, S., Slama, J., Hooper, R., Brailoiu, E., Patel, S. & Marchant, J. (2012). Photoaffinity Labeling of Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate (NAADP) Targets in Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 287(4), pp.2296-2307.
- Lissandron, V., Podini, P., Pizzo, P. & Pozzan, T. (2010). Unique characteristics of Ca<sup>2+</sup> homeostasis of the trans-Golgi compartment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(20), pp.9198-9203.
- Ljubojevic, S. & Bers, D. (2015). Nuclear Calcium in Cardiac Myocytes. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 65(3), pp.211-217.
- Llinás, R., Sugimori, M. & Cherksey, B. (1989). Voltage-Dependent Calcium Conductances in Mammalian Neurons. *Ann NY Acad Sci*, 560(1 Calcium Chann), pp.103-111.

- Llopis, J., McCaffery, J., Miyawaki, A., Farquhar, M. & Tsien, R. (1998). Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12), pp.6803-6808.
- Lloyd-Evans, E., Morgan, A., He, X., Smith, D., Elliot-Smith, E., Sillence, D., Churchill, G., Schuchman, E., Galione, A. & Platt, F. (2008). Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. *Nature Medicine*, 14(11), pp.1247-1255.
- Lloyd-Evans, E., Waller-Evans, H., Peterneva, K. & Platt, F. (2010). Endolysosomal calcium regulation and disease. *Biochim. Soc. Trans.*, 38(6), pp.1458-1464.
- López, J., Redondo, P., Salido, G., Pariente, J. & Rosado, J. (2006). Two distinct Ca<sup>2+</sup> compartments show differential sensitivity to thrombin, ADP and vasopressin in human platelets. *Cellular Signalling*, 18(3), pp.373-381.
- Low, W., Kasir, J. & Rahamimoff, H. (1993). Cloning of the rat heart Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger and its functional expression in HeLa cells. *FEBS Letters*, 316(1), pp.63-67.
- Luik, R., Wang, B., Prakriya, M., Wu, M. & Lewis, R. (2008). Oligomerization of STIM1 couples ER calcium depletion to CRAC channel activation. *Nature*, 454(7203), pp.538-542.
- Luzio, J., Bright, N. & Pryor, P. (2007). The role of calcium and other ions in sorting and delivery in the late endocytic pathway. *Biochim. Soc. Trans.*, 35(5), pp.1088-1091.
- Lytton, J. (2007). Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchangers: three mammalian gene families control Ca<sup>2+</sup> transport. *Biochem. J.*, 406(3), pp.365-382.
- Macgregor, A., Yamasaki, M., Rakovic, S., Sanders, L., Parkesh, R., Churchill, G., Galione, A. & Terrar, D. (2007). NAADP Controls Cross-talk between Distinct Ca<sup>2+</sup> Stores in the Heart. *Journal of Biological Chemistry*, 282(20), pp.15302-15311.
- MacLennan, D. & Kranias, E. (2003). Calcium: Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(7), pp.566-577.
- Mahapatra, N., Mahata, M., Hazra, P., McDonough, P., O'Connor, D. & Mahata, S. (2004). A dynamic pool of calcium in catecholamine storage vesicles. Exploration in living cells by a novel vesicle-targeted chromogranin A-aequorin chimeric photoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, 279(49), pp.51107-51121.
- Mahapatra, S., Calorio, C., Vandael, D., Marcantoni, A., Carabelli, V. & Carbone, E. (2012). Calcium channel types contributing to chromaffin cell excitability, exocytosis and endocytosis. *Cell Calcium*, 51(3-4), pp.321-330.
- Majewski, L. & Kuznicki, J. (2015). SOCE in neurons: Signaling or just refilling?. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1853(9), pp.1940-1952.

- Mannella, C., Marko, M., Penczek, P., Barnard, D. & Frank, J. (1994). The internal compartmentation of rat-liver mitochondria: Tomographic study using the high-voltage transmission electron microscope. *Microscopy Research and Technique*, 27(4), pp.278-283.
- Marchenko, S., Yarotsky, V., Kovalenko, T., Kostyuk, P. & Thomas, R. (2005). Spontaneously active and InsP<sub>3</sub>-activated ion channels in cell nuclei from rat cerebellar Purkinje and granule neurones. *The Journal of Physiology*, 565(3), pp.897-910.
- Marengo, F. (2005). Calcium gradients and exocytosis in bovine adrenal chromaffin cells. *Cell Calcium*, 38(2), pp.87-99.
- Marius, P., Guerra, M., Nathanson, M., Ehrlich, B. & Leite, M. (2006). Calcium release from ryanodine receptors in the nucleoplasmic reticulum. *Cell Calcium*, 39(1), pp.65-73.
- Marsault, R., Murgia, M., Pozzan, T. & Rizzuto, R. (1997). Domains of high Ca<sup>2+</sup> beneath the plasma membrane of living A7r5 cells. *The EMBO Journal*, 16(7), pp.1575-1581.
- Marshall, C., Fox, J., Butland, S., Ouellette, B., Brinkman, F. & Tibbits, G. (2005). Phylogeny of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger (NCX) genes from genomic data identifies new gene duplications and a new family member in fish species. *Physiol. Genomics*, 21(2), pp.161-173.
- Martin, T. (2015). PI(4,5)P<sub>2</sub>-binding effector proteins for vesicle exocytosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(6), pp.785-793.
- Maruyama, T., Kanaji, T., Nakade, S., Kanno, T. & Mikoshiba, K. (1997). 2APB, 2-Aminoethoxydiphenyl Borate, a Membrane-Penetrable Modulator of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-Induced Ca<sup>2+</sup> Release. *Journal of Biochemistry*, 122(3), pp.498-505.
- Masgrau R., Churchill GC., Morgan AJ., Ashcroft SJ. & Galione A. (2003). NAADP: a new second messenger for glucose-induced Ca<sup>2+</sup> responses in clonal pancreatic β-cells. *Curr Biol*, 4;13(3), pp.247-251.
- McCormack, JG., Halestrap, AP. & Denton, RM. (1990) Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiological Reviews*, 70(2), pp.391-425.
- McKemy, D., Neuhausser, W. & Julius, D. (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*, 416(6876), pp.52-58.
- McNally, J., Custer, E., Ortiz-Miranda, S., Woodbury, D., Kraner, S., Salzberg, B. & Lemos, J. (2014). Functional ryanodine receptors in the membranes of neurohypophysial secretory granules. *The Journal of General Physiology*, 143(6), pp.693-702.
- Mellman, I. (1989). Organelles Observed: Lysosomes. *Science*, 244(4906), pp.853-854.
- Mellman, I., Fuchs, R. & Helenius, A. (1986). Acidification of the Endocytic and Exocytic Pathways. *Annu. Rev. Biochem.*, 55(1), pp.663-700.

Merglen, A., Theander, S., Rubi, B., Chaffard, G., Wollheim, C. & Maechler, P. (2004). Glucose Sensitivity and Metabolism-Secretion Coupling Studied during Two-Year Continuous Culture in INS-1E Insulinoma Cells. *Endocrinology*, 145(2), pp.667-678.

Merrins, M. & Stuenkel, E. (2008). Kinetics of Rab27a-dependent actions on vesicle docking and priming in pancreatic  $\beta$ -cells. *The Journal of Physiology*, 586(22), pp.5367-5381.

Messenger, S., Falkowski, M. & Groblewski, G. (2014).  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated secretory granule exocytosis in pancreatic and parotid acinar cells. *Cell Calcium*, 55(6), pp.369-375.

Michalak, M. & Opas, M. (2009). Endoplasmic and sarcoplasmic reticulum in the heart. *Trends in Cell Biology*, 19(6), pp.253-259.

Michikawa, T., Hirota, J., Kawano, S., Hiraoka, M., Yamada, M., Furuichi, T. & Mikoshiba, K. (1999). Calmodulin Mediates Calcium-Dependent Inactivation of the Cerebellar Type 1 Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor. *Neuron*, 23(4), pp.799-808.

Mignery GA. & Südhof TC. (1990) The ligand binding site and transduction mechanism in the inositol-1,4,5-triphosphate receptor. *EMBO J*, 9(12), pp.3893-8.

Miklavc, P., Mair, N., Wittekindt, O., Haller, T., Dietl, P., Felder, E., Timmler, M. & Frick, M. (2011). Fusion-activated  $\text{Ca}^{2+}$  entry via vesicular P2X4 receptors promotes fusion pore opening and exocytotic content release in pneumocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(35), pp.14503-14508.

Mikoshiba, K. (2007). The IP3 receptor/ $\text{Ca}^{2+}$  channel and its cellular function. *Biochemical Society Symposium*, 74(1), p.9.

Minke, B. (2006). TRP channels and  $\text{Ca}^{2+}$  signaling. *Cell Calcium*, 40(3), pp.261-275.

Missiaen, L., Van Acker, K., Van Baelen, K., Raeymaekers, L., Wuytack, F., Parys, J., De Smedt, H., Vanoevelen, J., Dode, L., Rizzuto, R. & Callewaert, G. (2004). Calcium release from the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum in HeLa cells stably expressing targeted aequorin to these compartments. *Cell Calcium*, 36(6), pp.479-487.

Mitchell, K., Lai, F. & Rutter, G. (2003). Ryanodine Receptor Type I and Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate Receptors Mediate  $\text{Ca}^{2+}$  Release from Insulin-containing Vesicles in Living Pancreatic  $\beta$ -Cells (MIN6). *Journal of Biological Chemistry*, 278(13), pp.11057-11064.

Mitchell, K., Pinton, P., Varadi, A., Tacchetti, C., Ainscow, E., Pozzan, T., Rizzuto, R. & Rutter, G. (2001). Dense core secretory vesicles revealed as a dynamic  $\text{Ca}^{2+}$  store in neuroendocrine cells with a vesicle-associated membrane protein aequorin chimera. *J Cell Biol*, 155(1), pp.41-52.

Mitchell, K., Tsuboi, T. & Rutter, G. (2004). Role for Plasma Membrane-Related  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-1 (ATP2C1) in Pancreatic  $\beta$ -Cell  $\text{Ca}^{2+}$  Homeostasis Revealed by RNA Silencing. *Diabetes*, 53(2), pp.393-400.

- Miyawaki, A., Furuichi, T., Ryou, Y., Yoshikawa, S., Nakagawa, T., Saitoh, T. & Mikoshiba, K. (1991). Structure-function relationships of the mouse inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(11), pp.4911-4915.
- Moisescu, D. & Ashley, C. (1977). The effect of physiologically occurring cations upon aequorin light emission. Determination of the binding constants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 460(2), pp.189-205.
- Mojžišová, A., Križanová, O., Žáčiková, L., Komínková, V. & Ondriaš, K. (2000). Effect of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate on ryanodine calcium release channel in heart. *Pflügers Arch - Eur J Physiol*, 441(5), pp.674-677.
- Monck, J., Robinson, I., Escobar, A., Vergara, J. & Fernandez, J. (1994). Pulsed laser imaging of rapid  $\text{Ca}^{2+}$  gradients in excitable cells. *Biophysical Journal*, 67(2), pp.505-514.
- Montero, M., Alonso, M., Carnicero, E., Cuchillo-Ibáñez, I., Albillos, A., García, A., García-Sancho, J. & Álvarez, J. (2000). Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  transients that modulate secretion. *Nature Cell Biology*, 2(2), pp.57-61.
- Montero, M., Álvarez, J., Scheenen, W., Rizzuto, R., Meldolesi, J. & Pozzan, T. (1997a).  $\text{Ca}^{2+}$  Homeostasis in the Endoplasmic Reticulum: Coexistence of High and Low  $[\text{Ca}^{2+}]$  Subcompartments in Intact HeLa Cells. *J Cell Biol*, 139(3), pp.601-611.
- Montero, M., Barrero, M. & Álvarez, J. (1997b).  $[\text{Ca}^{2+}]$  microdomains control agonist-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release in intact HeLa cells. *FASEB J.*, 11(11), pp.881-885.
- Moreno, A., Lobatón, C., SantoDomingo, J., Vay, L., Hernández-SanMiguel, E., Rizzuto, R., Montero, M. & Álvarez, J. (2005). Calcium dynamics in catecholamine-containing secretory vesicles. *Cell Calcium*, 37(6), pp.555-564.
- Moreno, A., SantoDomingo, J., Fonteriz, R., Lobatón, C., Montero, M. & Álvarez, J. (2010). A confocal study on the visualization of chromaffin cell secretory vesicles with fluorescent targeted probes and acidic dyes. *Journal of Structural Biology*, 172(3), pp.261-269.
- Morgan, A. & Galione, A. (2008). Investigating cADPR and NAADP in intact and broken cell preparations. *Methods*, 46(3), pp.194-203.
- Morgan, A., Platt, F., Lloyd-Evans, E. & Galione, A. (2011). Molecular mechanisms of endolysosomal  $\text{Ca}^{2+}$  signalling in health and disease. *Biochem. J.*, 439(3), pp.349-378.
- Morgan, D., Welton, A., Heick, A. & Christakos, S. (1986). Specific in vitro activation of  $\text{Ca},\text{Mg}$ -ATPase by vitamin d-dependent rat renal calcium binding protein (calbindin D28K). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 138(2), pp.547-553.



- Morise, H., Shimomura, O., Johnson, F. & Winant, J. (1974). Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry*, 13(12), pp.2656-2662.
- Morishima, N., Nakanishi K., Takenouchi H., Shibata T. & Yasuhiko Y. (2002). An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *Journal of Biological Chemistry*, 277(37), pp.34287-34294.
- Morita, K., Kitayama, T., Kitayama, S. & Dohi, T. (2006). Cyclic ADP-Ribose Requires FK506-Binding Protein to Regulate Intracellular  $Ca^{2+}$  Dynamics and Catecholamine Release in Acetylcholine-Stimulated Bovine Adrenal Chromaffin Cells. *J Pharmacol Sci*, 101(1), pp.40-51.
- Mundorf, M., Troyer, K., Hochstetler, S., Near, J. & Wightman, R. (2000). Vesicular  $Ca^{2+}$  Participates in the Catalysis of Exocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 275(13), pp.9136-9142.
- Nagai, T., Ibata, K., Park, E., Kubota, M., Mikoshiba, K. & Miyawaki, A. (2002). A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat. Biotechnol.*, 20(1), pp.87-90.
- Nagai, T., Sawano, A., Park, E. & Miyawaki, A. (2001). Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense  $Ca^{2+}$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(6), pp.3197-3202.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. & Yuan, J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- $\beta$ . *Nature*, 403(6765), pp.98-103.
- Nakai, J., Ohkura, M. & Imoto, K. (2001). A high signal-to-noise  $Ca^{2+}$  probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.*, 19(2), pp.137-141.
- Nakamura, K., Zuppini, A., Arnaudeau, S., Lynch, J., Ahsan, I., Krause, R., Papp, S., De Smedt, H., Parys, J., Müller-Esterl, W., Lew, D., Krause, K., Demaurex, N., Opas, M. & Michalak, M. (2001). Functional specialization of calreticulin domains. *J Cell Biol*, 154(5), pp.961-972.
- Newcomb, R., Szoke, B., Palma, A., Wang, G., Chen, X., Hopkins, W., Cong, R., Miller, J., Urge, L., Tarczy-Hornoch, K., Loo, J., Dooley, D., Nadasdi, L., Tsien, R., Lemos, J. & Miljanich, G. (1998). Selective Peptide Antagonist of the Class E Calcium Channel from the Venom of the Tarantula *Hysterocrates gigas* †. *Biochemistry*, 37(44), pp.15353-15362.
- Nicoll, D., Ottolia, M., Goldhaber, J. & Philipson, K. (2013). 20 Years from NCX Purification and Cloning: Milestones. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp.17-23.
- Nilius, B. & Owsianik, G. (2011). The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol*, 12(3), p.218.
- Nimmervoll, B., Flucher, B. & Obermair, G. (2013). Dominance of P/Q-type calcium channels in depolarization-induced presynaptic fm dye release in cultured hippocampal neurons. *Neuroscience*, 253, pp.330-340.
- Nita, L., Hershinkel, M. & Sekler, I. (2015). Life after the birth of the mitochondrial  $Na^+/Ca^{2+}$  exchanger, NCLX. *Science China Life Sciences*, 58(1), pp.59-65.

- Njus, D., Kelley, P. & Harnadek, G. (1986). Bioenergetics of secretory vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics*, 853(3-4), pp.237-265.
- Obermüller, S., Calegari, F., King, A., Lindqvist, A., Lundquist, I., Salehi, A., Francolini, M., Rosa, P., Rorsman, P., Huttner, W. & Barg, S. (2010). Defective Secretion of Islet Hormones in Chromogranin-B Deficient Mice. *PLoS ONE*, 5(1), p.e8936.
- Obermuller, S., Lindqvist, A., Karanauskaite, J., Galvanovskis, J., Rorsman, P. & Barg, S. (2005). Selective nucleotide-release from dense-core granules in insulin-secreting cells. *Journal of Cell Science*, 118(18), pp.4271-4282.
- Oda, K. (1992). Calcium depletion blocks proteolytic cleavages of plasma protein precursors which occur at the Golgi and/or trans-Golgi network. Possible involvement of Ca<sup>2+</sup>-dependent Golgi endoproteases. *J Biol Chem.*, 267(24), pp.17465-71.
- Ogunbayo, O., Zhu, Y., Rossi, D., Sorrentino, V., Ma, J., Zhu, M. & Evans, A. (2011). Cyclic Adenosine Diphosphate Ribose Activates Ryanodine Receptors, whereas NAADP Activates Two-pore Domain Channels. *Journal of Biological Chemistry*, 286(11), pp.9136-9140.
- Ohmiya, Y. & Tsuji, F. (1993). Bioluminescence of the Ca<sup>2+</sup>-binding photoprotein, aequorin, after histidine modification. *FEBS Letters*, 320(3), pp.267-270.
- Okunade, G., Miller, M., Azhar, M., Andringa, A., Sanford, L., Doetschman, T., Prasad, V. & Shull, G. (2007). Loss of the Atp2c1 Secretory Pathway Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SPCA1) in Mice Causes Golgi Stress, Apoptosis, and Midgestational Death in Homozygous Embryos and Squamous Cell Tumors in Adult Heterozygotes. *Journal of Biological Chemistry*, 282(36), pp.26517-26527.
- Oldershaw, KA. & Taylor, CW. (1990). 2,5-Di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone mobilizes inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive and -insensitive Ca<sup>2+</sup> stores. *FEBS Letters*, 274(1-2), pp.214-216.
- Olivares, M., González-Jamett, A., Guerra, M., Baez-Matus, X., Haro-Acuña, V., Martínez-Quiles, N. & Cárdenas, A. (2014). Src Kinases Regulate De Novo Actin Polymerization during Exocytosis in Neuroendocrine Chromaffin Cells. *PLoS ONE*, 9(6), p.e99001.
- Oliveira, A., Guimaraes, E., Andrade, L., Menezes, G. & Fatima Leite, M. (2014). Decoding Calcium Signaling Across the Nucleus. *Physiology*, 29(5), pp.361-368.
- Olivera, B., Miljanich, G., Ramachandran, J. & Adams, M. (1994). Calcium Channel Diversity and Neurotransmitter Release: The  $\omega$ -Conotoxins and  $\omega$ -Agatoxins. *Annu. Rev. Biochem.*, 63(1), pp.823-867.
- Orečná, M., Hafko, R., Bacová, Z., Podskocová, J., Chorvát, D Jr. & Strbák, V. (2008). Different secretory response of pancreatic islets and insulin secreting cell lines INS-1 and INS-1E to osmotic stimuli. *Physiol Res.*, 57(6), pp.935-945.

Orrenius, S., Gogvadze, V. & Zhivotovsky, B. (2015). Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 460(1), pp.72-81.

Pahl, HL. & Baeuerle, PA. (1995). A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF-kappa B. *EMBO J.*, 14(11), pp.2580-2588.

Palmer, A. & Tsien, R. (2006). Measuring calcium signaling using genetically targetable fluorescent indicators. *Nat Protoc*, 1(3), pp.1057-1065.

Papadopoulos, A., Tomatis, V., Kasula, R. & Meunier, F. (2013). The Cortical Acto-Myosin Network: From Diffusion Barrier to Functional Gateway in the Transport of Neurosecretory Vesicles to the Plasma Membrane. *Frontiers in Endocrinology*, 4. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1763(11), pp.1175-1183.

Parekh, A. (2003). Mitochondrial Regulation of Intracellular Ca<sup>2+</sup> Signaling: More Than Just Simple Ca<sup>2+</sup> Buffers. *Physiology*, 18(6), pp.252-256.

Park, J. & Loh, Y. (2008). How Peptide Hormone Vesicles Are Transported to the Secretion Site for Exocytosis. *Molecular Endocrinology*, 22(12), pp.2583-2595.

Park, M., Ashby, M., Erdemli, G., Petersen, O. & Tepikin, A. (2001). Perinuclear, perigranular and sub-plasmalemmal mitochondria have distinct functions in the regulation of cellular calcium transport. *The EMBO Journal*, 20(8), pp.1863-1874.

Park, M., Petersen, O. & Tepikin, A. (2000). The endoplasmic reticulum as one continuous Ca<sup>2+</sup> pool: visualization of rapid Ca<sup>2+</sup> movements and equilibration. *The EMBO Journal*, 19(21), pp.5729-5739.

Parker, I. & Yao, Y. (1996). Ca<sup>2+</sup> transients associated with openings of inositol trisphosphate-gated channels in *Xenopus* oocytes. *The Journal of Physiology*, 491(3), pp.663-668.

Parrington, J. & Tunn, R. (2014). Ca<sup>2+</sup> signals, NAADP and two-pore channels: role in cellular differentiation. *Acta Physiologica*, 211(2), pp.285-296.

Passafaro, M., Codignola, A., Rogers, M., Cooke, I. & Sher, E. (2000). Modulation of N-type calcium channels translocation in RINm5F insulinoma cells. *Pharmacological Research*, 41(3), pp.325-334.

Passafaro, M., Rosa, P., Sala, C., Clementi, F. & Sher, E. (1996). N-type Ca<sup>2+</sup> Channels Are Present in Secretory Granules and Are Transiently Translocated to the Plasma Membrane during Regulated Exocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 271(47), pp.30096-30104.

Passier, R., Zeng, H., Frey, N., Naya, F., Nicol, R., McKinsey, T., Overbeek, P., Richardson, J., Grant, S. & Olson, E. (2000). CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. *Journal of Clinical Investigation*, 105(10), pp.1395-1406.

Patel, S. & Cai, X. (2015). Evolution of acidic Ca<sup>2+</sup> stores and their resident Ca<sup>2+</sup>-permeable channels. *Cell Calcium*, 57(3), pp.222-230.

- Patel, S. & Docampo, R. (2010). Corrigendum: Acidic calcium stores open for business: expanding the potential for intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signaling. *Trends in Cell Biology*, 20(11), p.627.
- Pedersen, S., Owsianik, G. & Nilius, B. (2005). TRP channels: An overview. *Cell Calcium*, 38(3-4), pp.233-252.
- Pedrazzini, T., Pralong, F. & Grouzmann, E. (2003). Neuropeptide Y: the universal soldier. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 60(2), pp.350-377.
- Petit, P., Lajoix, A. & Gross, R. (2009). P2 purinergic signalling in the pancreatic  $\beta$ -cell: Control of insulin secretion and pharmacology. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37(2), pp.67-75.
- Pezzati, R., Bossi, M., Podini, P., Meldolesi, J. & Grohovaz, F. (1997). High-resolution calcium mapping of the endoplasmic reticulum-Golgi-exocytic membrane system. Electron energy loss imaging analysis of quick frozen-freeze dried PC12 cells. *Molecular Biology of the Cell*, 8(8), pp.1501-1512.
- Picard, M., Shirihai, O., Gentil, B. & Burelle, Y. (2013). Mitochondrial morphology transitions and functions: implications for retrograde signaling?. *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 304(6), pp.R393-R406.
- Pinto, M., Kihara, A., Goulart, V., Tonelli, F., Gomes, K., Ulrich, H. & Resende, R. (2015). Calcium signaling and cell proliferation. *Cellular Signalling*, 27(11), pp.2139-2149.
- Pinton, P., Pozzan, T. & Rizzuto, R. (1998). The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *EMBO J*, 17(18), pp.5298-5308.
- Pizzo, P., Lissandron, V., Capitanio, P. & Pozzan, T. (2011).  $\text{Ca}^{2+}$  signalling in the Golgi apparatus. *Cell Calcium*, 50(2), pp.184-192.
- Podesta, M., Benvenuto, F., Pitto, A., Figari, O., Bacigalupo, A., Bruzzone, S., Guida, L., Franco, L., Paleari, L., Bodrato, N., Usai, C., De Flora, A. & Zocchi, E. (2005). Concentrative Uptake of Cyclic ADP-ribose Generated by  $\text{BST-1}^+$  Stroma Stimulates Proliferation of Human Hematopoietic Progenitors. *Journal of Biological Chemistry*, 280(7), pp.5343-5349.
- Pouli, E., Karagenc, N., Wasmeier, C., Hutton, C., Bright, N., Arden, S., Schofield, J. & Rutter, A. (1998). A phogrin-aequorin chimera to image free  $\text{Ca}^{2+}$  in the vicinity of secretory granules. *Biochem. J.*, 330(3), pp.1399-1404.
- Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P. & Meldolesi, J. (1994). Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev.*, 74(3), pp.595-636.
- Prasad, V. Boivin, GP., Miller, ML., Liu, LH., Erwin, CR., Warner, BW. & Shull, GE. (2005). Haploinsufficiency of *Atp2a2*, Encoding the Sarco(endo)plasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Isoform 2  $\text{Ca}^{2+}$  Pump, Predisposes Mice to Squamous Cell Tumors via a Novel Mode of Cancer Susceptibility. *Cancer Research*, 65(19), pp.8655-8661.

Prins, D. & Michalak, M. (2011). Organellar Calcium Buffers. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(3), pp.a004069-a004069.

Putney, J. (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*, 7(1), pp.1-12.

Putney, J. (1990). Receptor-regulated calcium entry. *Pharmacology & Therapeutics*, 48(3), pp.427-434.

Qiu, J., Tan, Y., Hagenston, A., Martel, M., Kneisel, N., Skehel, P., Wyllie, D., Bading, H. & Hardingham, G. (2013). Mitochondrial calcium uniporter Mcu controls excitotoxicity and is transcriptionally repressed by neuroprotective nuclear calcium signals. *Nature Communications*, 4.

Quesada, I., Chin, W. & Verdugo, P. (2003). ATP-Independent Luminal Oscillations and Release of  $Ca^{2+}$  and  $H^{+}$  from Mast Cell Secretory Granules: Implications for Signal Transduction. *Biophysical Journal*, 85(2), pp.963-970.

Quesada, I., Chin, W., Steed, J., Campos-Bedolla, P. & Verdugo, P. (2001). Mouse Mast Cell Secretory Granules Can Function as Intracellular Ionic Oscillators. *Biophysical Journal*, 80(5), pp.2133-2139.

Quill, T., Sugden, S., Rossi, K., Doolittle, L., Hammer, R. & Garbers, D. (2003). Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(25), pp.14869-14874.

Qureshi, O., Paramasivam, A., Yu, J. & Murrell-Lagnado, R. (2007). Regulation of P2X4 receptors by lysosomal targeting, glycan protection and exocytosis. *Journal of Cell Science*, 120(21), pp.3838-3849.

Raposo, G., Marks, M. & Cutler, D. (2007). Lysosome-related organelles: driving post-Golgi compartments into specialisation. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(4), pp.394-401.

Ravier, M., Tsuboi, T. & Rutter, G. (2008). Imaging a target of  $Ca^{2+}$  signalling: Dense core granule exocytosis viewed by total internal reflection fluorescence microscopy. *Methods*, 46(3), pp.233-238.

Regan, M., Lin, D., Emerick, M. & Agnew, W. (2005). The effect of higher order RNA processes on changing patterns of protein domain selection: A developmentally regulated transcriptome of type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Proteins*, 59(2), pp.312-331.

Reiffen, F. & Gratzl, M. (1986). Calcium binding to chromaffin vesicle matrix proteins: effect of pH, magnesium, and ionic strength. *Biochemistry*, 25(15), pp.4402-4406.

Reinhardt, TA. & Horst, RL. (1999).  $Ca^{2+}$ -ATPases and their expression in the mammary gland of pregnant and lactating rats. *Am J Physiol*, 276 (4 Pt 1), pp.796-802.

Ridgway, E. & Ashley, C. (1967). Calcium transients in single muscle fibers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 29(2), pp.229-234.

Ridgway, E., Gilkey, J. & Jaffe, L. (1977). Free calcium increases explosively in activating medaka eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(2), pp.623-627.

- Rindler, M., Xu, C., Gumper, I., Smith, N. & Neubert, T. (2007). Proteomic Analysis of Pancreatic Zymogen Granules: Identification of New Granule Proteins. *J. Proteome Res.*, 6(8), pp.2978-2992.
- Rizzuto, R. & Pozzan T. (2006). Microdomains of Intracellular Ca<sup>2+</sup>: Molecular Determinants and Functional Consequences. *Physiological Reviews*, 86(1), pp.369-408.
- Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A. & Mammucari, C. (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(9), pp.566-578.
- Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F., Fogarty, K., Lifshitz, L., Tuft, R. & Pozzan, T. (1998). Close Contacts with the Endoplasmic Reticulum as Determinants of Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Responses. *Science*, 280(5370), pp.1763-1766.
- Rizzuto, R., Simpson, A., Brini, M. & Pozzan, T. (1992). Rapid changes of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature*, 358(6384), pp.325-327.
- Ronco, V., Potenza, D., Denti, F., Vullo, S., Gagliano, G., Tognolina, M., Guerra, G., Pinton, P., Genazzani, A., Mapelli, L., Lim, D. & Moccia, F. (2015). A novel Ca<sup>2+</sup>-mediated cross-talk between endoplasmic reticulum and acidic organelles: Implications for NAADP-dependent Ca<sup>2+</sup> signalling. *Cell Calcium*, 57(2), pp.89-100.
- Rorsman, P., Braun, M. & Zhang, Q. (2012). Regulation of calcium in pancreatic  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells in health and disease. *Cell Calcium*, 51(3-4), pp.300-308.
- Rosado, J. (2011). Acidic Ca<sup>2+</sup> stores in platelets. *Cell Calcium*, 50(2), pp.168-174.
- Rosé, S., Lejen, T., Casaletti, L., Larson, R., Pene, T. & Trifaró, J. (2003). Myosins II and V in chromaffin cells: myosin V is a chromaffin vesicle molecular motor involved in secretion. *Journal of Neurochemistry*, 85(2), pp.287-298.
- Rose, S., Lejen, T., Zhang, L. & Trifaro, J. (2001). Chromaffin Cell F-actin Disassembly and Potentiation of Catecholamine Release in Response to Protein Kinase C Activation by Phorbol Esters Is Mediated through Myristoylated Alanine-rich C Kinase Substrate Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(39), pp.36757-36763.
- Ross, W., Nakamura, T., Watanabe, S., Larkum, M. & Lasser-Ross, N. (2005). Synaptically Activated Ca<sup>2+</sup> Release From Internal Stores in CNS Neurons. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 25(2), pp.283-295.
- Rossi, D. & Sorrentino, V. (2002). Molecular genetics of ryanodine receptors Ca<sup>2+</sup>-release channels. *Cell Calcium*, 32(5-6), pp.307-319.
- Rowland, A. & Voeltz, G. (2012). Endoplasmic reticulum–mitochondria contacts: function of the junction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(10), pp.607-625.

Ruas, M., Rietdorf, K., Arredouani, A., Davis, L., Lloyd-Evans, E., Koegel, H., Funnell, T., Morgan, A., Ward, J., Watanabe, K., Cheng, X., Churchill, G., Zhu, M., Platt, F., Wessel, G., Parrington, J. & Galione, A. (2010). Purified TPC Isoforms Form NAADP Receptors with Distinct Roles for Ca<sup>2+</sup> Signaling and Endolysosomal Trafficking. *Current Biology*, 20(8), pp.703-709.

Rudolf, R., Mongillo, M., Rizzuto, R. & Pozzan, T. (2003). Innovation: Looking forward to seeing calcium. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(7), pp.579-586.

Rudolf, R., Salm, T., Rustom, A. & Gerdes, H. (2001). Dynamics of Immature Secretory Granules: Role of Cytoskeletal Elements during Transport, Cortical Restriction, and F-Actin-dependent Tethering. *Molecular Biology of the Cell*, 12(5), pp.1353-1365.

Saito, M., Hanson, P. & Schlesinger, P. (2007). Luminal Chloride-dependent Activation of Endosome Calcium Channels: patch clamp study of enlarged endosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 282(37), pp.27327-27333.

Salceda, R. & Sánchez-Chávez, G. (2000). Calcium uptake, release and ryanodine binding in melanosomes from retinal pigment epithelium. *Cell Calcium*, 27(4), pp.223-229.

Sammels, E., Parys, J., Missiaen, L., De Smedt, H. & Bultynck, G. (2010). Intracellular Ca<sup>2+</sup> storage in health and disease: A dynamic equilibrium. *Cell Calcium*, 47(4), pp.297-314.

SantoDomingo, J. & Demaurex, N. (2010). Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1797(6-7), pp.907-912.

SantoDomingo, J., Fonteriz, R., Lobatón, C., Montero, M., Moreno, A. & Álvarez, J. (2010). Ca<sup>2+</sup> Dynamics in the Secretory Vesicles of Neurosecretory PC12 and INS1 Cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 30(8), pp.1267-1274.

SantoDomingo, J., Vay, L., Camacho, M., Hernández-SanMiguel, E., Fonteriz, R., Lobatón, C., Montero, M., Moreno, A. & Álvarez, J. (2008). Calcium dynamics in bovine adrenal medulla chromaffin cell secretory granules. *European Journal of Neuroscience*, 28(7), pp.1265-1274.

Sanz-Clemente, A., Nicoll, R. & Roche, K. (2013). Diversity in NMDA Receptor Composition: Many Regulators, Many Consequences. *The Neuroscientist*, 19(1), pp.62-75.

Sarkadi, B. (1980). Active calcium transport in human red cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 604(2), pp.159-190.

Saroussi, S. & Nelson, N. (2009). The little we know on the structure and machinery of V-ATPase. *Journal of Experimental Biology*, 212(11), pp.1604-1610.

Sato, S., Ward, C., Krouse, M., Wine, J. & Kopito, R. (1996). Glycerol Reverses the Misfolding Phenotype of the Most Common Cystic Fibrosis Mutation. *Journal of Biological Chemistry*, 271(2), pp.635-638.

- Sawano, H., Koumoto, Y., Ohta, K., Sasaki, Y., Segawa, S. & Tachibana, H. (1992). Efficient in vitro folding of the three-disulfide derivatives of hen lysozyme in the presence of glycerol. *FEBS Letters*, 303(1), pp.11-14.
- Schatzmann, H. (1973). Dependence on calcium concentration and stoichiometry of the calcium pump in human red cells. *The Journal of Physiology*, 235(2), pp.551-569.
- Scheenen, W., Wollheim, C., Pozzan, T. & Fasolato, C. (1998).  $\text{Ca}^{2+}$  depletion from granules inhibits exocytosis. A study with insulin-secreting cells. *Journal of Biological Chemistry*, 273(30), pp.19002-19008.
- Scherer, P., Lederkremer, G., William, S., Fogliano, M., Baldini, G. & Lodish, H. (1996). Cab45, a novel ( $\text{Ca}^{2+}$ )-binding protein localized to the Golgi lumen. *The Journal of Cell Biology*, 133(2), pp.257-268.
- Scherer, W., Syverton, J. & Gey, G. (1953). Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *Journal of Experimental Medicine*, 97(5), pp.695-710.
- Schrag, J., Bergeron, J., Li, Y., Borisova, S., Hahn, M., Thomas, D. & Cygler, M. (2001). The Structure of Calnexin, an ER Chaperone Involved in Quality Control of Protein Folding. *Molecular Cell*, 8(3), pp.633-644.
- Schuber, F. & Lund, F. (2004). Structure and Enzymology of ADP-ribosyl Cyclases: Conserved Enzymes that Produce Multiple Calcium Mobilizing Metabolites. *CMM*, 4(3), pp.249-261.
- Schulze, D., Muqhal, M., Lederer, W. & Ruknudin, A. (2003). Sodium/Calcium Exchanger (NCX1) Macromolecular Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 278(31), pp.28849-28855.
- Schwaller, B. (2010). Cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  Buffers. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(11), pp.a004051-a004051.
- Schwaller, B., Meyer, M. & Schiffmann, S. (2002). 'New' functions for 'old' proteins: The role of the calcium-binding proteins calbindin D-28k, calretinin and parvalbumin, in cerebellar physiology. Studies with knockout mice. *The Cerebellum*, 1(4), pp.241-258.
- Sela, D., Ram, E. & Atlas, D. (1991). ATP receptor. A putative receptor-operated channel in PC-12 cells. *J Biol Chem.*, 266(27), pp.17990-17994.
- Seo, M., Enomoto, M., Ishiyama, N., Stathopoulos, P. & Ikura, M. (2015). Structural insights into endoplasmic reticulum stored calcium regulation by inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1853(9), pp.1980-1991.
- Sepúlveda, M., Marcos, D., Berrocal, M., Raeymaekers, L., Mata, A. & Wuytack, F. (2008). Activity and localization of the Secretory Pathway  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase isoform 1 (SPCA1) in different areas of the mouse brain during postnatal development. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 38(4), pp.461-473.



- Shannon, T., Ginsburg, K. & Bers, D. (2000). Reverse Mode of the Sarcoplasmic Reticulum Calcium Pump and Load-Dependent Cytosolic Calcium Decline in Voltage-Clamped Cardiac Ventricular Myocytes. *Biophysical Journal*, 78(1), pp.322-333.
- Sherwood, M., Prior, I., Voronina, S., Barrow, S., Woodsmith, J., Gerasimenko, O., Petersen, O. & Tepikin, A. (2007). Activation of trypsinogen in large endocytic vacuoles of pancreatic acinar cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(13), pp.5674-5679.
- Shi, Y., Chai, J., Du, C., Wu, J., Kyin, S. & Wang, X. (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature*, 406(6798), pp.855-862.
- Shibata, Y., Shemesh, T., Prinz, W., Palazzo, A., Kozlov, M. & Rapoport, T. (2010). Mechanisms Determining the Morphology of the Peripheral ER. *Cell*, 143(5), pp.774-788.
- Shim, A., Tirado-Lee, L. & Prakriya, M. (2015). Structural and Functional Mechanisms of CRAC Channel Regulation. *Journal of Molecular Biology*, 427(1), pp.77-93.
- Shimomura, O. & Inouye, S. (1996). Titration of Recombinant Aequorin with Calcium Chloride. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 221(1), pp.77-81.
- Shimomura, O., Johnson, F. & Saiga, Y. (1962). Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 59(3), pp.223-239.
- Sine, S. (2012). End-Plate Acetylcholine Receptor: Structure, Mechanism, Pharmacology, and Disease. *Physiological Reviews*, 92(3), pp.1189-1234.
- Singh, A. & Rajender, S. (2015). CatSper channel, sperm function and male fertility. *Reproductive BioMedicine Online*, 30(1), pp.28-38.
- Smith, R., Duncan, M. & Moir, D. (1985). Heterologous protein secretion from yeast. *Science*, 229(4719), pp.1219-1224.
- Sokolow, S., Manto, M., Gailly, P., Molgó, J., Vandebrouck, C., Vanderwinden, J., Herchuelz, A. & Schurmans, S. (2004). Impaired neuromuscular transmission and skeletal muscle fiber necrosis in mice lacking Na/Ca exchanger 3. *Journal of Clinical Investigation*, 113(2), pp.265-273.
- Sooy, K., Schermerhorn, T., Noda, M., Surana, M., Rhoten, W., Meyer, M., Fleischer, N., Sharp, G. & Christakos, S. (1999). Calbindin-D28k Controls  $[Ca^{2+}]_i$  and Insulin Release: Evidence obtained from calbindin-D28k knockout mice and cell lines. *Journal of Biological Chemistry*, 274(48), pp.34343-34349.
- Sorin, A., Rosas, G. & Rao, R. (1997). PMR1, a  $Ca^{2+}$ -ATPase in yeast Golgi, has properties distinct from sarco/endoplasmic reticulum and plasma membrane calcium pumps. *J Biol Chem*, 11;272(15), pp.9895-9901.
- Stanley, E. (1993). Presynaptic Calcium Channels and the Transmitter Release Mechanism. *Ann NY Acad Sci*, 681(1 Myasthenia Gr), pp.368-372.

- Steen, M., Kirchberger, T. and Guse, A. (2007). NAADP mobilizes calcium from the endoplasmic reticular calcium store in T-lymphocytes. *GBM Fall meeting Hamburg 2007*, 2007(Fall).
- Stewart, T., Yapa, K. & Monteith, G. (2015). Altered calcium signaling in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1848(10), pp.2502-2511.
- Stojilkovic, S. (2005). Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytosis and SNARE function. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 16(3), pp.81-83.
- Straub, S., Shanmugam, G. & Sharp, G. (2004). Stimulation of Insulin Release by Glucose Is Associated With an Increase in the Number of Docked Granules in the  $\beta$ -Cells of Rat Pancreatic Islets. *Diabetes*, 53(12), pp.3179-3183.
- Strehler EE. & Zacharias DA. (2001). Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol Rev*, 81(1), pp.21-50.
- Strehler, E. (2015). Plasma membrane calcium ATPases: From generic Ca<sup>2+</sup> sump pumps to versatile systems for fine-tuning cellular Ca<sup>2+</sup>. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 460(1), pp.26-33.
- Strehler, E., Filoteo, A., Penniston, J. & Caride, A. (2007). Plasma-membrane Ca<sup>2+</sup> pumps: structural diversity as the basis for functional versatility. *Biochim. Soc. Trans.*, 35(5), pp.919-922.
- Suckale, J. & Solimena, M. (2010). The insulin secretory granule as a signaling hub. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 21(10), pp.599-609.
- Südhof, T. (2013). Neurotransmitter Release: The Last Millisecond in the Life of a Synaptic Vesicle. *Neuron*, 80(3), pp.675-690.
- Supattapone S., Worley PF., Baraban JM. & Snyder SH. (1988). Solubilization, purification, and characterization of an inositol trisphosphate receptor. *J Biol Chem*, 25;263(3), pp.1530-4.
- Szász, I., Sarkadi, B., Schubert, A. & Gárdos, G. (1978). Effects of lanthanum on calcium-dependent phenomena in human red cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 512(2), pp.331-340.
- Tait, S. & Green, D. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(9), pp.621-632.
- Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E., Grønborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brügger, B., Ringler, P., Müller, S., Rammner, B., Gräter, F., Hub, J., De Groot, B., Mieskes, G., Moriyama, Y., Klingauf, J., Grubmüller, H., Heuser, J., Wieland, F. & Jahn, R. (2006). Molecular Anatomy of a Trafficking Organelle. *Cell*, 127(4), pp.831-846.
- Takasawa, S., Nata, K., Yonekura, H. & Okamoto, H. (1993). Cyclic ADP-ribose in insulin secretion from pancreatic  $\beta$ -cells. *Science*, 259(5093), pp.370-373.

Tallini, Y., Ohkura, M., Choi, B., Ji, G., Imoto, K., Doran, R., Lee, J., Plan, P., Wilson, J., Xin, H., Sanbe, A., Gulick, J., Mathai, J., Robbins, J., Salama, G., Nakai, J. & Kotlikoff, M. (2006). Imaging cellular signals in the heart in vivo: Cardiac expression of the high-signal  $\text{Ca}^{2+}$  indicator GCaMP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(12), pp.4753-4758.

Tanabe, T., Beam, K., Powell, J. & Numa, S. (1988). Restoration of excitation—contraction coupling and slow calcium current in dysgenic muscle by dihydropyridine receptor complementary DNA. *Nature*, 336(6195), pp.134-139.

Tarasov, A., Semplici, F., Ravier, M., Bellomo, E., Pullen, T., Gilon, P., Sekler, I., Rizzuto, R. & Rutter, G. (2012). The Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  Uniporter MCU Is Essential for Glucose-Induced ATP Increases in Pancreatic  $\beta$ -Cells. *PLoS ONE*, 7(7), p.e39722.

Taupenot, L., Harper, K. & O'Connor, D. (2003). The Chromogranin–Secretogranin Family. *New England Journal of Medicine*, 348(12), pp.1134-1149.

Taylor, C., Genazzani, A. & Morris, S. (1999). Expression of inositol trisphosphate receptors. *Cell Calcium*, 26(6), pp.237-251.

Thastrup, O., Cullen, P., Drobak, B., Hanley, M. & Dawson, A. (1990). Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(7), pp.2466-2470.

Thirion, S., Troadec, J., Pivovarova, N., Pagnotta, S., Andrews, S., Leapman, R. & Nicaise, G. (1999). Stimulus-secretion coupling in neurohypophysial nerve endings: A role for intravesicular sodium?. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(6), pp.3206-3210.

Tian, L., Hires, S., Mao, T., Huber, D., Chiappe, M., Chalasani, S., Petreanu, L., Akerboom, J., McKinney, S., Schreiter, E., Bargmann, C., Jayaraman, V., Svoboda, K. & Looger, L. (2009). Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nature Methods*, 6(12), pp.875-881.

Tikunov, B. & Rome, L. (2009). Is high concentration of parvalbumin a requirement for superfast relaxation?. *J Muscle Res Cell Motil*, 30(1-2), pp.57-65.

Timofeeva, Y. & Volynski, K. (2015). Calmodulin as a major calcium buffer shaping vesicular release and short-term synaptic plasticity: facilitation through buffer dislocation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9.

Ton, V., Mandal, D., Vahadji, C. & Rao, R. (2002). Functional Expression in Yeast of the Human Secretory Pathway  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ -ATPase Defective in Hailey-Hailey Disease. *Journal of Biological Chemistry*, 277(8), pp.6422-6427.

Tooze, S. (1991). Biogenesis of secretory granules Implications arising from the immature secretory granule in the regulated pathway of secretion. *FEBS Letters*, 285(2), pp.220-224.

- Torregrosa-Hetland, C., Villanueva, J., López-Font, I., Garcia-Martinez, V., Gil, A., Gonzalez-Vélez, V., Segura, J., Viniestra, S. & Gutiérrez, L. (2010). Association of SNAREs and Calcium Channels with the Borders of Cytoskeletal Cages Organizes the Secretory Machinery in Chromaffin Cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 30(8), pp.1315-1319.
- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H. & Ogawa, H. (2000). Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature*, 405(6787), pp.647-655.
- Trenker, M., Malli, R., Fertschai, I., Levak-Frank, S. & Graier, W. (2007). Uncoupling proteins 2 and 3 are fundamental for mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uniport. *Nature Cell Biology*, 9(4), pp.445-452.
- Trifaró, J., Rosé, S., Lejen, T. & Elzagallaai, A. (2000). Two pathways control chromaffin cell cortical F-actin dynamics during exocytosis. *Biochimie*, 82(4), pp.339-352.
- Trosper, T. & Philipson, K. (1983). Effects of divalent and trivalent cations on  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchange in cardiac sarcolemmal vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 731(1), pp.63-68.
- Trus, M., Corkey, R., Nesher, R., Richard, A., Deeney, J., Corkey, B. & Atlas, D. (2007). The L-type Voltage-Gated  $\text{Ca}^{2+}$  Channel Is the  $\text{Ca}^{2+}$  Sensor Protein of Stimulus–Secretion Coupling in Pancreatic  $\beta$ -Cells. *Biochemistry*, 46(50), pp.14461-14467.
- Tsien, R., Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J., Adams, J. & Ikura, M. (1997). Fluorescent indicators for  $\text{Ca}^{2+}$  based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, 388(6645), pp.882-887.
- Tsujimoto, Y., Nakagawa, T. & Shimizu, S. (2006). Mitochondrial membrane permeability transition and cell death. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1757(9-10), pp.1297-1300.
- Uchida, K., Miyauchi, H., Furuichi, T., Michikawa, T. & Mikoshiba, K. (2003). Critical Regions for Activation Gating of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 278(19), pp.16551-16560.
- Van Baelen, K., Vanoevelen, J., Callewaert, G., Parys, J., De Smedt, H., Raeymaekers, L., Rizzuto, R., Missiaen, L. & Wuytack, F. (2003). The contribution of the SPCA1  $\text{Ca}^{2+}$  pump to the  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation in the Golgi apparatus of HeLa cells assessed via RNA-mediated interference. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 306(2), pp.430-436.
- Van Petegem, F. (2012). Ryanodine Receptors: Structure and Function. *Journal of Biological Chemistry*, 287(38), pp.31624-31632.
- Vandecaetsbeek, I., Raeymaekers, L., Wuytack, F. & Vangheluwe, P. (2009a). Factors controlling the activity of the SERCA2a pump in the normal and failing heart. *BioFactors*, 35(6), pp.484-499.
- Vandecaetsbeek, I., Trekels, M., De Maeyer, M., Ceulemans, H., Lescrinier, E., Raeymaekers, L., Wuytack, F. & Vangheluwe, P. (2009b). Structural basis for the high  $\text{Ca}^{2+}$  affinity of the ubiquitous SERCA2b  $\text{Ca}^{2+}$  pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(44), pp.18533-18538.

Vangheluwe, P., Schuermans, M., Zádor, E., Walkens, E., Raeymaekers, L. & Wuytack, F. (2005). Sarcolipin and phospholamban mRNA and protein expression in cardiac and skeletal muscle of different species. *Biochem. J.*, 389(1), pp.151-159.

Vangheluwe, P., Sepúlveda, M., Missiaen, L., Raeymaekers, L., Wuytack, F. & Vanoevelen, J. (2009). Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ - and  $\text{Mn}^{2+}$ -Transport ATPases. *Chemical Reviews*, 109(10), pp.4733-4759.

Vanoevelen, J., Raeymaekers, L., Dode, L., Parys, J., De Smedt, H., Callewaert, G., Wuytack, F. & Missiaen, L. (2005). Cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  signals depending on the functional state of the Golgi in HeLa cells. *Cell Calcium*, 38(5), pp.489-495.

Vay, L., Gu, C. & McNaughton, P. (2012). The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. *British Journal of Pharmacology*, 165(4), pp.787-801.

Venkatachalam, K. & Montell, C. (2007). TRP Channels. *Annu. Rev. Biochem.*, 76(1), pp.387-417.

Venkatachalam, K., Wong, C. & Zhu, M. (2015). The role of TRPMLs in endolysosomal trafficking and function. *Cell Calcium*, 58(1), pp.48-56.

Verkhatsky, A. (2005). Physiology and Pathophysiology of the Calcium Store in the Endoplasmic Reticulum of Neurons. *Physiological Reviews*, 85(1), pp.201-279.

Verma AK., Filoteo AG., Stanford DR., Wieben ED., Penniston JT., Strehler EE., Fischer R., Heim R., Vogel G., Mathews S., et al. (1988). Complete primary structure of a human plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump. *J Biol Chem*, 5;263(28), pp.14152-14159.

Vitale, M., Seward, E. & Trifaró, J. (1995). Chromaffin cell cortical actin network dynamics control the size of the release-ready vesicle pool and the initial rate of exocytosis. *Neuron*, 14(2), pp.353-363.

Voets, T., Neher, E. & Moser, T. (1999). Mechanisms Underlying Phasic and Sustained Secretion in Chromaffin Cells from Mouse Adrenal Slices. *Neuron*, 23(3), pp.607-615.

Vysotski, E. & Lee, J. (2004).  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulated Photoproteins: Structural Insight into the Bioluminescence Mechanism. *Accounts of Chemical Research*, 37(6), pp.405-415.

Wagner II, L. & Yule, D. (2012). Differential regulation of the InsP 3 receptor type-1 and -2 single channel properties by InsP 3,  $\text{Ca}^{2+}$  and ATP. *The Journal of Physiology*, 590(14), pp.3245-3259.

Wakamori, M. (1998). Single Tottering Mutations Responsible for the Neuropathic Phenotype of the P-type Calcium Channel. *Journal of Biological Chemistry*, 273(52), pp.34857-34867.

Waldeck-Weiermair, M., Jean-Quartier, C., Rost, R., Khan, M., Vishnu, N., Bondarenko, A., Imamura, H., Malli, R. & Graier, W. (2011). Leucine Zipper EF Hand-containing Transmembrane Protein 1 (Letm1) and Uncoupling Proteins 2 and 3 (UCP2/3) Contribute to Two Distinct Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  Uptake Pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 286(32), pp.28444-28455.

- Walensky, L. & Snyder, S. (1995). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *The Journal of Cell Biology*, 130(4), pp.857-869.
- Wang, H., Pathan N., Ethell IM., Krajewski S., Yamaguchi Y., Shibasaki F., McKeon F., Bobo T., Franke TF. & Reed JC. (1999).  $Ca^{2+}$ -Induced Apoptosis Through Calcineurin Dephosphorylation of BAD. *Science*, 284(5412), pp.339-343.
- Wang, S., Trumble, W., Liao, H., Wesson, C., Dunker, A. & Kang, C. (1998). Crystal structure of calsequestrin from rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Nat Struct Mol Biol*, 5(6), pp.476-483.
- Wang, X., Zhang, X., Dong, X., Samie, M., Li, X., Cheng, X., Goschka, A., Shen, D., Zhou, Y., Harlow, J., Zhu, M., Clapham, D., Ren, D. & Xu, H. (2012). TPC Proteins Are Phosphoinositide- Activated Sodium-Selective Ion Channels in Endosomes and Lysosomes. *Cell*, 151(2), pp.372-383.
- Wang, Z., Liu, H., Gu, Y. & Chapman, E. (2011). Reconstituted synaptotagmin I mediates vesicle docking, priming, and fusion. *J Cell Biol*, 195(7), pp.1159-1170.
- Watson, P., Reusch, J., McCune, S., Leinwand, L., Luckey, S., Konhilas, J., Brown, D., Chicco, A., Sparagna, G., Long, C. & Moore, R. (2007). Restoration of CREB function is linked to completion and stabilization of adaptive cardiac hypertrophy in response to exercise. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 293(1), pp.H246-H259.
- Wegrzyn, J., Bark, S., Funkelstein, L., Mosier, C., Yap, A., Kazemi-Esfarjani, P., La Spada, A., Sigurdson, C., O'Connor, D. & Hook, V. (2010). Proteomics of Dense Core Secretory Vesicles Reveal Distinct Protein Categories for Secretion of Neuroeffectors for Cell–Cell Communication. *J. Proteome Res.*, 9(10), pp.5002-5024.
- Wegrzyn, J., Lee, J., Neveu, J., Lane, W. & Hook, V. (2007). Proteomics of Neuroendocrine Secretory Vesicles Reveal Distinct Functional Systems for Biosynthesis and Exocytosis of Peptide Hormones and Neurotransmitters. *J. Proteome Res.*, 6(5), pp.1652-1665.
- Wei, L., Hanna, A., Beard, N. & Dulhunty, A. (2009). Unique isoform-specific properties of calsequestrin in the heart and skeletal muscle. *Cell Calcium*, 45(5), pp.474-484.
- West, M., Zurek, N., Hoenger, A. & Voeltz, G. (2011). A 3D analysis of yeast ER structure reveals how ER domains are organized by membrane curvature. *J Cell Biol*, 193(2), pp.333-346.
- Wheeler, D., Barrett, C., Groth, R., Safa, P. & Tsien, R. (2008). CaMKII locally encodes L-type channel activity to signal to nuclear CREB in excitation–transcription coupling. *J Cell Biol*, 183(5), pp.849-863.
- Wiederkehr, A. & Wollheim, C. (2012). Mitochondrial signals drive insulin secretion in the pancreatic  $\beta$ -cell. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 353(1-2), pp.128-137.
- Winkler, H. & Westhead, E. (1980). The molecular organization of adrenal chromaffin granules. *Neuroscience*, 5(11), pp.1803-1823.
- Winkler, H. (1977). The biogenesis of adrenal chromaffin granules. *Neuroscience*, 2(5), pp.657-683.

- Wu, J. & Lukas, R. (2011). Naturally-expressed nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Biochemical Pharmacology*, 82(8), pp.800-807.
- Wu, J., Liu, L., Matsuda, T., Zhao, Y., Rebane, A., Drobizhev, M., Chang, Y., Araki, S., Arai, Y., March, K., Hughes, T., Sagou, K., Miyata, T., Nagai, T., Li, W. & Campbell, R. (2013). Improved Orange and Red Ca<sup>2+</sup> Indicators and Photophysical Considerations for Optogenetic Applications. *ACS Chem. Neurosci.*, 4(6), pp.963-972.
- Wu, J., Prole, D., Shen, Y., Lin, Z., Gnanasekaran, A., Liu, Y., Chen, L., Zhou, H., Chen, S., Usachev, Y., Taylor, C. & Campbell, R. (2014). Red fluorescent genetically encoded Ca<sup>2+</sup> indicators for use in mitochondria and endoplasmic reticulum. *Biochem. J.*, 464(1), pp.13-22.
- Wu, L., Hamid, E., Shin, W. & Chiang, H. (2014). Exocytosis and Endocytosis: Modes, Functions, and Coupling Mechanisms. *Annual Review of Physiology*, 76(1), pp.301-331.
- Wuytack, F., Papp, B., Verboomen, H., Raeymaekers, L., Dode, L., Bobe, R., Enouf, J., Bokkala, S., Authi, KS. & Casteels, R. (1994). A sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase 3-type Ca<sup>2+</sup> pump is expressed in platelets, in lymphoid cells, and in mast cells. *J Biol Chem*, 14 269(2), pp.1410-1416.
- Wuytack, F., Raeymaekers, L. & Missiaen, L. (2002). Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium*, 32(5-6), pp.279-305.
- Xie, L., Zhang, M., Zhou, W., Wu, Z., Ding, J., Chen, L. & Xu, T. (2006). Extracellular ATP Stimulates Exocytosis via Localized Ca<sup>2+</sup> Release from Acidic Stores in Rat Pancreatic  $\beta$  Cells. *Traffic*, 7(4), pp.429-439.
- Xu, P., Lu, J., Li, Z., Yu, X., Chen, L. & Xu, T. (2006). Aggregation of STIM1 underneath the plasma membrane induces clustering of Orail. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 350(4), pp.969-976.
- Yamasaki, M., Thomas, J., Churchill, G., Garnham, C., Lewis, A., Cancela, J., Patel, S. & Galione, A. (2005). Role of NAADP and cADPR in the Induction and Maintenance of Agonist-Evoked Ca<sup>2+</sup> Spiking in Mouse Pancreatic Acinar Cells. *Current Biology*, 15(9), pp.874-878.
- Yamasaki-Mann, M., Demuro, A. & Parker, I. (2009). cADPR stimulates SERCA activity in *Xenopus* oocytes. *Cell Calcium*, 45(3), pp.293-299.
- Yang, S. & Berggren, P. (2006). The Role of Voltage-Gated Calcium Channels in Pancreatic  $\beta$ -Cell Physiology and Pathophysiology. *Endocrine Reviews*, 27(6), pp.621-676.
- Yao, Y., Choi, J. & Parker, I. (1995). Quantal puffs of intracellular Ca<sup>2+</sup> evoked by inositol trisphosphate in *Xenopus* oocytes. *The Journal of Physiology*, 482(3), pp.533-553.
- Yeung-Yam-Wah, V., Lee, A. & Tse, A. (2012). Arachidonic acid mobilizes Ca<sup>2+</sup> from the endoplasmic reticulum and an acidic store in rat pancreatic  $\beta$  cells. *Cell Calcium*, 51(2), pp.140-148.

- Yeung-Yam-Wah, V., Lee, A., Tse, F. & Tse, A. (2010). Arachidonic acid stimulates extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  entry in rat pancreatic  $\beta$  cells via activation of the noncapacitative arachidonate-regulated  $\text{Ca}^{2+}$  (ARC) channels. *Cell Calcium*, 47(1), pp.77-83.
- Yoo, S. & Albanesi, J. (1990). Inositol 1,4,5-trisphosphate-triggered  $\text{Ca}^{2+}$  release from bovine adrenal medullary secretory vesicles. *J Biol Chem.*, 265(23), pp.13446-13448.
- Yoo, S. & Hur, Y. (2012). Enrichment of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/ $\text{Ca}^{2+}$  channels in secretory granules and essential roles of chromogranins. *Cell Calcium*, 51(3-4), pp.342-350.
- Yoo, S. & Lewis, M. (1996). Effects of pH and  $\text{Ca}^{2+}$  on Heterodimer and Heterotetramer Formation by Chromogranin A and Chromogranin B. *Journal of Biological Chemistry*, 271(29), pp.17041-17046.
- Yoo, S. (2010). Secretory granules in inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in the cytoplasm of neuroendocrine cells. *The FASEB Journal*, 24(3), pp.653-664.
- Yu, X., Carroll, S., Rigaud, J. & Inesi, G. (1993).  $\text{H}^+$  countertransport and electrogenicity of the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  pump in reconstituted proteoliposomes. *Biophysical Journal*, 64(4), pp.1232-1242.
- Zádor, E., Vangheluwe, P. & Wuytack, F. (2007). The expression of the neonatal sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  pump (SERCA1b) hints to a role in muscle growth and development. *Cell Calcium*, 41(4), pp.379-388.
- Zhang, F. & Li, P. (2007). Reconstitution and Characterization of a Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate (NAADP)-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  Release Channel from Liver Lysosomes of Rats. *Journal of Biological Chemistry*, 282(35), pp.25259-25269.
- Zhang, Y., Kang, Y., Chang, N., Lam, P., Liu, Y., Olkkonen, V. & Gaisano, H. (2009). Cab45b, a Munc18b-interacting Partner, Regulates Exocytosis in Pancreatic  $\beta$ -Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 284(31), pp.20840-20847.
- Zhao, Y., Araki, S., Wu, J., Teramoto, T., Chang, Y., Nakano, M., Abdelfattah, A., Fujiwara, M., Ishihara, T., Nagai, T. & Campbell, R. (2011). An Expanded Palette of Genetically Encoded  $\text{Ca}^{2+}$  Indicators. *Science*, 333(6051), pp.1888-1891.
- Zhao, Y., Lam, C. & Lee, H. (2012). The Membrane-Bound Enzyme CD38 Exists in Two Opposing Orientations. *Science Signaling*, 5(241), pp.ra67-ra67.
- Zheng, J., Wenzhi, B., Miao, L., Hao, Y., Zhang, X., Yin, W., Pan, J., Yuan, Z., Song, B. & Ji, G. (2010).  $\text{Ca}^{2+}$  release induced by cADP-ribose is mediated by FKBP12.6 proteins in mouse bladder smooth muscle. *Cell Calcium*, 47(5), pp.449-457.
- Zhou, Y., Wang, X., Wang, X., Loktionova, N., Cai, X., Nwokonko, R., Vrana, E., Wang, Y., Rothberg, B. & Gill, D. (2015). STIM1 dimers undergo unimolecular coupling to activate Orai1 channels. *Nature Communications*, 6, p.8395.





