



Universidad de Valladolid

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

TESIS DOCTORAL:

**Monitorización directa de la señalización de Ca^{2+}
en el lumen endolisosomal: nuevo sensor
bioluminiscente basado en Aequorina**

Presentada por Patricia Torres Vidal para optar al
grado de
Doctor/a por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:
Dra. María Teresa Alonso Alonso
Dr. Jonathan Rojo Ruiz

00 | ÍNDICE

Abreviaturas	1
Resumen	5
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 Los endosomas tardíos y endolisosomas como parte de la vía endocítica	11
1.1.1 Endocitosis. Vía endocítica y función	11
1.1.2 Componentes de la vía endocítica	12
1.1.3 Regulación en la vía endocítica	15
1.1.3.1 Implicación de los endosomas en la señalización celular	16
1.1.3.2 Morfología y maduración de los componentes de la vía endocítica.....	18
a. Cambios en la morfología durante la maduración	18
b. Acidificación y motilidad durante la maduración	20
c. Intercambio de Rab durante la maduración	22
d. La conversión de los fosfatidilinositol (PI) durante la maduración	23
e. Generación de vesículas intraluminales (ILVs) durante la maduración	23
1.2 Crosstalk	24
1.2.1 Entre mitocondrias y endolisosomas (LE).....	26
1.2.2 Entre Aparato de Golgi y LE	26
1.2.3 Entre Retículo endoplasmático y LE	27
1.3 Señalización de Ca^{2+} en los endosomas tardíos: almacenamiento y liberación ..	31
1.3.1 Importancia del Ca^{2+} en endosomas tardíos y lisosomas	32
1.3.2 Entrada de Ca^{2+} . Posibles bombas de Ca^{2+}	33
1.3.3 Salida de Ca^{2+} . Canales de Ca^{2+}	37
a. TRPMLs	38
b. TPCs	40
c. IP3 y RyR	40
d. P2X4	40
e. Otros canales de calcio	41
1.4 Medidas de calcio en los endosomas y compartimentos ácidos	41
1.4.1 Primeras medidas de calcio en endosomas y lisosomas	41
1.4.2 Problemas en la medida de la $[\text{Ca}^{2+}]$ lisosomal hasta el momento: GECIs fluorescentes	42

1.4.3	Posibilidades: GECIs bioluminiscentes y Aequorina como herramienta de medida.....	44
1.5	Fisiopatología relacionada con los endosomas tardíos y lisosomas	50
1.6	Hipótesis y objetivos.....	50
2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
2.1.	Construcción genética.....	53
2.2.	Producción de virus	53
2.3.	Expresión bacteriana de proteínas GA y GA1	54
2.4.	Actividad y calibración de Ca^{2+} a varios pHs de sondas bioluminiscentes: GA y GA1.....	55
2.5.	Cultivo celular y expresión genética.....	56
2.6.	Medidas de la $[\text{Ca}^{2+}]$ por bioluminiscencia	59
2.7.	Inmunofluorescencia	61
2.8.	Microscopía confocal	61
2.9.	Colocalización Fiji-ImageJ.....	62
2.10.	Análisis estadístico	62
3.	RESULTADOS	
3.1	Caracterización del nuevo sensor de Ca^{2+} para organelas ácidas.....	64
3.1.1	Generación de un nuevo indicador de Ca^{2+} endolisosomal	66
3.1.2	Localización del indicador endolisosomal ELGA mediante el uso de confocal.....	70
3.1.3	Calibración de la sonda en función del pH	72
3.1.4	Monitorización de la $[\text{Ca}^{2+}]$ en células reportada por ELGA1	76
a.	Experimentos en intactas en diferentes tipos celulares.....	76
b.	Experimentos en permeabilizadas.....	80
3.2	Almacenamiento y liberación del Ca^{2+} medido con ELGA1.....	83
3.2.1	Rellenado de Ca^{2+} del depósito diana	83
a.	Experimentos clásicos de lisosoma:	
	GPN, bafilomicina A1, ionóforos	83
b.	Entrada de Ca^{2+} debido a SERCA.....	85
3.2.2	Liberación de Ca^{2+} del depósito diana.....	88
a.	Canal TRPML1	88
	∴ Dosis-Respuesta ML-SA1	90
	∴ Inhibidores de TRPML1.....	91
b.	Canales TPC.....	93
c.	Canal IP3	95
	∴ Dosis-Respuesta IP3.....	95

∴ Línea celular mutante HEK293T: IP3R-3KO	96
∴ Experimentos en diferentes tipos celulares	98
3.3 Relación entre LE y RE. Experimentos de TRPML1 en RE	99
 4. DISCUSIÓN.....	102
4.1 Calibración de un nuevo sensor de Ca^{2+} localizado en la vía endocítica	104
4.2 Localización de ELGA1	105
4.3 Almacenamiento de Ca^{2+} en los orgánulos ácidos medidos con ELGA1	108
4.4 Liberación de Ca^{2+} en los orgánulos ácidos medidos con ELGA1	110
4.5 Crosstalk entre EL y ER	110
4.6 Ventajas y posibles futuros trabajos	113
 5. CONCLUSIONES.....	114
 6. BIBLIOGRAFÍA.....	117

00 | FIGURAS Y TABLAS

Figura 1	11
Figura 2	13
Figura 3	14
Figura 4	17
Figura 5	20
Figura 6	21
Figura 7	25
Figura 8	27
Figura 9	28
Figura 10	20
Figura 11	30
Figura 12	31
Figura 13	33
Figura 14	34
Figura 15	36
Figura 16	37
Figura 17	39
Figura 18	44
Figura 19	46
Figura 20	48
Figura 21	49
Figura 22	53
Figura 23	61
Figura 24	67
Figura 25	68
Figura 26	69

Figura 27	71
Figura 28	73
Figura 29	74
Figura 30	75
Figura 31	76
Figura 32	77
Figura 33	78
Figura 34	79
Figura 35	80
Figura 36	82
Figura 37	84
Figura 38	86
Figura 39	87
Figura 40	89
Figura 41	90
Figura 42	91
Figura 43	92
Figura 44	94
Figura 45	95
Figura 46	96
Figura 47	97
Figura 48	98
Figura 49	99
Figura 50	100
Figura 51	101
Tabla 1	15
Tabla 2	36
Tabla 3	42

Tabla 4 55

Tabla 5 56

Tabla 6 57

Tabla 7 58

Tabla 8 60

Tabla 9 62

Tabla 10 63

Tabla 11 112



ABREVIATURAS

[Ca ²⁺]	Concentración de calcio
[Ca ²⁺] _{EL}	Concentración de calcio endolisosomal
MP	Membrana plasmática
TNG	Trans Golgi
EE	Endosomas tempranos
LE	Endosomas tardíos
EL	Endolisomas
ILVs	Vesículas intraluminales
MVBs	Cuerpos multivesiculares libres
M6P	Manosa 6 fosfato
EGF	Factor de crecimiento epitelial
PI(3)P	Fosfatidilinositol -3-fosfato
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
mTOR	Ser/Thr kinase mammalian target of rapamycin
mTORC1	Mammalian target of rapamycin complex 1
TRPML1	Potencial transitorio del receptor de mucopolina 1
SREBP	Proteína de unión al elemento regulador del colesterol 1
TFEB	Factor de transcripción EB
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
LBPA	Ácido lisobisfosfatídico
v-ATPasa	ATPasa de tipo vacuolar
<i>ECV</i>	Vesículas transportadoras endosomales
ORP1L	proteína relacionada con la proteína de unión al oxisterol 1L
RILP	Proteína lisosomal que interactúa con Rab
FYCO1	Efectores de Rab7
EEA1	Antígeno 1 del endosoma temprano
PI	Fosfatidilinositol
PIKfyve	Fosfatidilinositol 3-fosfato 5-quinasa
MCS	Sitios de contacto de la membrana
MLIV	mucopolipidosis tipo IV
GERL	Contacto Golgi-RE-lisosomas
LAMP1 y 2	Proteína de membrana asociada a los lisosomas 1 y 2
CICR	Liberación de Ca ²⁺ inducida por Ca ²⁺

SOCE	Entrada de Ca^{2+} operada por el almacén
SERCA	Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoendoplasmático
Tg	Tapsigargina
TBH	2,5-di(t-butil)-1,4-benzohidroquinona
SPCA	Vía secretora $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ ATPases
PMCA	ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática
CAX	Antiportador de $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$
VGCCs	Canales de Ca^{2+} activados por voltaje
BAPTA	Ácido 1,2-bis-(o-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético
EGTA	Ácido tetraacético de etilenglicol
GECIs	Indicadores de calcio codificados genéticamente
Dig	Digitonina
ML-SA1	Agonista sintético de mucolipina 1
CaM	Calmodulina
TPCs	Canal de dos poros
NAADP	Fosfato de dinucleótido de adenina de ácido nicotínico
BafA1	Bafilomicina A1
GPN	Glicil-L-fenilalanina 2-naftilamida
VAMP7	Proteína de membrana asociada a vesículas
IP3R-3KO	línea mutante HEK293 nula para las tres isoformas de IP3R



RESUMEN

El Ca^{2+} es un segundo mensajero ubicuo y universal, indispensable en el citosol para llevar a cabo muchas de las funciones celulares, como la neurotransmisión. Es esencial para las células conseguir rápidamente tanto su utilización como su almacenamiento en orgánulos, ya que el Ca^{2+} es tan tóxico como necesario para ellas. Además, en el lumen de los orgánulos el Ca^{2+} también cumple funciones específicas para ellos.

Los principales orgánulos encargados del almacenamiento del Ca^{2+} son el retículo endoplasmático (RE) y el aparato de Golgi, por lo que son los más conocidos y estudiados; pero en los últimos años se le ha dado mucha importancia en este campo a los depósitos de Ca^{2+} de los orgánulos ácidos, ya que son capaces de acumular y liberar el ion tras la activación de canales específicos. En este sentido, el Ca^{2+} podría estar implicado en la autofagia, la actividad de mTOR, la fusión y fisión, la modificación de la dinámica de Ca^{2+} de otros orgánulos (como mitocondria y RE), o la regulación del tráfico lisosomal y su tamaño. Por lo tanto, se ha dedicado mucho esfuerzo al desarrollo de indicadores de Ca^{2+} codificados genéticamente como herramientas para medir el Ca^{2+} luminal en compartimentos ácidos. Sin embargo, esta tarea es extremadamente compleja, ya que la mayoría de los indicadores fluorescentes de Ca^{2+} son sensibles al pH, extinguiéndose la señal fluorescente a pH ácido. Por el contrario, los sensores de Ca^{2+} basados en bioluminiscencia son potencialmente ventajosos, ya que son relativamente resistentes a las variaciones de pH. En este sentido, la aequorina es una proteína bioluminiscente de unión al Ca^{2+} que emite luz azul cuando se reconstituye con su cofactor celenteracina.

Las aequorinas son excelentes indicadores para monitorizar la dinámica subcelular del Ca^{2+} , ya que pueden adaptarse a las diferentes concentraciones de Ca^{2+} y pueden dirigirse a organelas diana de forma específica. En el pasado, nuestro laboratorio ha desarrollado nuevos indicadores de Ca^{2+} basados en aequorina dirigidos a diferentes orgánulos, y en los últimos años ha estado desarrollando el indicador denominado ELGA1 dirigido al lumen endolisosomal. En esta tesis, nos planteamos medir con ELGA1 la concentración de Ca^{2+} luminal de organelas ácidas y su capacidad para liberar el ion ante estímulos específicos, así como determinar en qué compartimentos ácidos es capaz de medir ELGA1, consiguiendo en gran parte nuestros objetivos. Hay que tener en cuenta que existe una gran variedad de compartimentos ácidos, cuyas características

aún se están perfilando en la literatura, por lo que no es tarea fácil determinar en cuáles reporta ELGA1; en esta tesis conseguimos reducir teóricamente la lista a un pequeño número de candidatos, y proponemos el endosoma tardío como el candidato principal, a raíz de experimentos que se describirán a lo largo de la tesis. Por conveniencia, para referirnos a todos los compartimentos ligeramente ácidos de nuestro interés en todas sus posibles variantes, utilizaremos el término “endolisosomas” (EL) de manera genérica (aun sabiendo que esta denominación no es del todo correcta, ya que los endolisosomas son un compartimento específico de la vía endolisosomal).

Descubrimos que la aequorina se reconstituye a partir de pH 5.5, aunque en orgánulos con alta concentración de Ca^{2+} (no necesariamente EL) sólo es posible medir a partir de pH 6. En consecuencia, aprovechamos esta característica para, a través de ELGA1, describir la dinámica del Ca^{2+} en los EL a pH 6 y superior. Demostramos que la captación luminal de Ca^{2+} reportada por ELGA1 es sensible a la taspigargina, y que los niveles de Ca^{2+} en estado estacionario son de $396 \pm 30 \mu\text{M}$ en células HEK293T (permeabilizadas), que se reducen selectivamente tras la sobreexpresión del canal TRPML1 (canal de Ca^{2+} específico de endosomas tardíos y lisosomas). Observamos que el agonista específico de TRPML1 denominado ML-SA1 es capaz de liberar Ca^{2+} del lumen del orgánulo. Además IP3, un mensajero movilizador de Ca^{2+} , evoca respuestas luminales robustas en células de tipo silvestre, pero no en células con los receptores de IP3 inactivados. Es más, tras perder la respuesta de IP3R debido a la inactivación de los tipo 1, 2 y 3, ésta se recupera parcialmente al expresar IP3R1. Por último, la estimulación con agonistas formadores de IP3 (como ATP) provoca la liberación de Ca^{2+} en células vivas intactas.

Para terminar, observamos con sorpresa, por un lado, que los resultados de los experimentos con ELGA1 eran muy similares a los ya bien conocidos del RE, a pesar de que ELGA1 se localiza en EL; y por otro, que TRPML1 también generaba liberación de Ca^{2+} en RE, a pesar de que este canal no se localiza en dicho orgánulo, ya que es específico de endosomas tardíos y lisosomas. Explicamos estos resultados mediante una posible comunicación o *crosstalk* entre estos dos orgánulos a través de TRPML1 en los sitios de contacto entre ambos, de los que se informa en la literatura. Esta hipótesis cuadraría con otros experimentos reflejados en la literatura que muestran una relación indirecta entre TRPML1 y el RE.

01 | INTRODUCCIÓN

1.1. Los endosomas tardíos y endolisosomas como parte de la vía endocítica.

1.1.1. Endocitosis. Vía endocítica y función

Las células necesitan comunicarse con el exterior y cumplir sus funciones internas, y lo consiguen gracias a un complejo sistema de membranas dinámicas y en continuo tráfico. El tráfico de componentes depende de las diferentes vías secretora, endocítica y de recuperación. La **vía biosintética-secretora** permite desde el interior hacia el exterior, mediante la exocitosis, secretar y añadir a la membrana plasmática (MP): proteínas de nueva síntesis, lípidos y carbohidratos. De forma complementaria, mediante la endocitosis (desde el exterior hacia el interior) se ingieren partículas externas hacia la célula. La **vía endocítica** comienza con la endocitosis y continúa con la eliminación y la recuperación de componentes, la cual es posible gracias a la cooperación con la **vía de recuperación**. Todos estos procesos se llevan a cabo según las necesidades de la célula y de forma organizada (**Figura 1**). Durante la tesis nos centraremos principalmente en la vía endocítica ya que, como veremos, parece nuestra zona de actuación más probable.

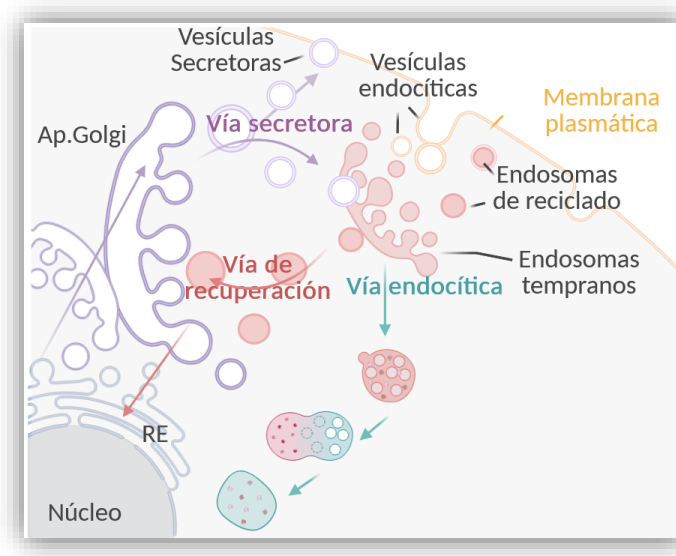


Figura 1. Tráfico de componentes: vías endocítica, de recuperación y secretora. El tráfico de moléculas y macromoléculas, membranas y otros componentes pasan al exterior o interior celular, cambian de posición en la célula, se reciclan y eliminan gracias a las vías secretora, endocítica y de recuperación (imagen creada con BioRender.com).

La **endocitosis** es un proceso celular de invaginación de la membrana plasmática, y posterior fisión y formación de vacuolas y vesículas, para la internalización de fluidos, moléculas y macromoléculas, partículas, otras células, virus, etc. (revisado por (Huotari and Helenius, 2011; NELSON and COX, 2013)).

Se pueden distinguir dos tipos de endocitosis según el tamaño (*Alberts et al.*, 2008):

- **Pinocitosis:** se ingieren pequeños solutos y fluidos en vesículas de unos 100nm de diámetro de aspecto uniforme. Se lleva a cabo continuamente por la mayoría de las células sin que estas cambien de tamaño, ya que se produce un recambio de la membrana gracias a la exocitosis (la célula puede renovarse en muy poco tiempo). Tienen lugar en zonas de la MP con *depresiones recubiertas de clatrina*. Por tanto, la pinocitosis es un proceso constitutivo de endocitosis de partículas de pequeño tamaño, en el que las depresiones recubiertas se separan constantemente de la MP formando vesículas recubiertas.
- **Fagocitosis:** se ingieren grandes partículas y se forman vesículas de unos 250nm denominadas fagosomas y con formas dispares según el cago. Se ingieren con mayor eficacia por células especializadas en fagocitosis. Es un proceso regulado que se tiene que activar extracelularmente (por ejemplo por la fosfatidilserina expuesta en las células apoptóticas). Además, las células animales vivas contienen proteínas señales de “no me comas” que impiden la activación de la fagocitosis.

Por tanto, la **vía endocítica** es un proceso de pinocitosis llevado a cabo por una serie de orgánulos que se encuentran en diferentes estados de maduración y que tienen diferentes funciones y características en su composición. La vía endocítica es fundamental para el reciclado de componentes de membrana y la eliminación de residuos, pero también es fundamental para las señales de alimentación y metabólicas de la célula (Wang *et al.*, 2014b). Es esencial para la captación de alimentos, inmunidad, señalización, adhesión, recambio de la membrana (turnover) y desarrollo. Las proteínas (*housekeeping* y otras) y demás moléculas endocitadas son recicladas directamente de vuelta a la MP o al trans Golgi (TNG), mientras que el resto, es enviado al lisosomas para ser eliminado (Scott, Vacca and Gruenberg, 2014).

1.1.2. Componentes de la vía endocítica

Las vesículas endocíticas (vesículas de transporte recubiertas de clatrina (COPI)) pasan en un minuto a los endosomas tempranos (**EE** de las siglas en inglés: *Early Endosome*), que se encuentran cerca de la MP, y tras unos 5-15min, pasan a los endosomas tardíos (**LE** de las siglas en inglés: *Late Endosome*) que, en general, se encuentran cerca del núcleo y del aparato de Golgi. Finalmente, los LE maduran en lisosomas (Huotari and Helenius, 2011).

Los **EE** son el primer punto recolector de cargo desde la MP y de enzimas hidrolítica desde el Golgi. Aportan componentes de nueva formación y permiten la eliminación de residuos. Contienen un pH de entre 6.8 y 5.9. En la vía endocítica, los EE migran hacia el interior celular a través de los microtúbulos, lo que va generando depresiones hacia el interior del orgánulo o *vesículas intraluminales* (ILVs, de las siglas en inglés: *intraluminal vesicles*), las cuales, se desprenden o maduran desde los EE y pasan a ser **cuerpos multivesiculares libres** (MVBs, siglas del inglés: *multivesicular bodies*) (Scott, Vacca and Gruenberg, 2014). Estos MVBs pueden fusionarse entre sí para formar **LE** o fusionarse

con LE ya formados, cuyo pH pasa a 6-5.5. El que las células tengan un solo LE conectado o muchos desconectados parece depender del tipo y del estado celular (Alberts *et al.*, 2008). Los LE maduran en lisosomas formando **endolisosomas** previos o se fusionan con **lisosomas** ya formados (Luzio, Pryor and Bright, 2007), estos contienen un pH de 4.5-5. No existe una diferencia real entre endosomas tardío y lisosomas sino que son el mismo orgánulo en diferentes estados de maduración. Los lisosomas se consideran los últimos orgánulos de la vía endocítica y es donde se degradan las partículas. La vía endocítica no es la única que aporta componentes a los lisosomas, también reciben cargos de la autofagia y de la fagocitosis (**Figura 2**) (Alberts *et al.*, 2008).

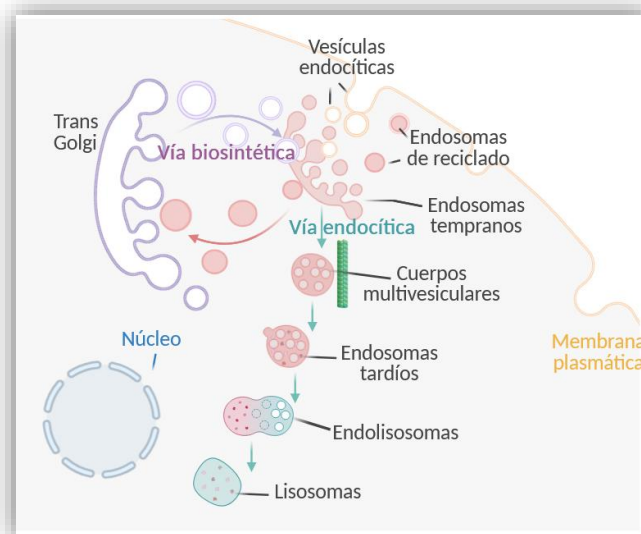


Figura 2. Componentes de la vía endocítica. La vía endocítica comienza en la membrana plasmática y llega hasta la zona del núcleo entre 5 y 15 minutos. Comienza por los EE que son los receptores de cargo y enzimas y acaban por los lisosomas que llevan a cabo la digestión completa del cargo con las enzimas completamente activas. Los EE van desarrollando vesículas intraluminares hasta que se liberan formando los MVBs; estos se fusionan con LE ya formados o se fusionan entre ellos para formar LE. Los LE finalmente maduran en lisosomas. No existe una diferencia real entre LE, endolisosomas y lisosomas ya que son el mismo orgánulo pero en estados madurativos diferentes, aunque los LE llevan a cabo señalización importante para la célula y la vía endocítica. (Imagen creada con BioRender.com).

A lo largo de la maduración de los endosomas en la vía endocítica es característica la acidificación del lumen debido principalmente a la v-ATPasa, lo que permite la activación de las hidrolasas. Aunque algunos estudios apuntan a subconjuntos no ácidos de lisosomas, e incluso, a una maduración de *endosomas tardíos-endolisosomas-lisosomas*, más compleja que la maduración lineal planteada hasta la fecha. Se propone (Bright, Davis and Luzio, 2016) un pH fluctuante para la regeneración de los lisosomas. Según los autores habría una maduración cíclica en la que, los lisosomas de almacenamiento terminales, serían compartimentos no ácidos e inactivos para hidrolasas ácidas. Estos lisosomas terminales se formarían a partir de endolisosomas y tendrían la función de almacenamiento y maduración de hidrolasas ácidas. Después los lisosomas terminales,

junto con los endosomas tardíos, formarían los endolisosomas que serían ácidos y activos para las hidrolasas (Bright, Davis and Luzio, 2016) (**Figura 3**). El pH también podría depender de la posición celular de los lisosomas (Johnson *et al.*, 2016): aquellos con una mayor expresión de Arl8b mantienen una posición más periférica y un pH de 5.98 frente a los lisosomas perinucleares que tienen un pH de 5.12. Los lisosomas periféricos son menos frecuentes y podrían deberse a compensaciones por problemas con la vía biosintética (Johnson *et al.*, 2016).

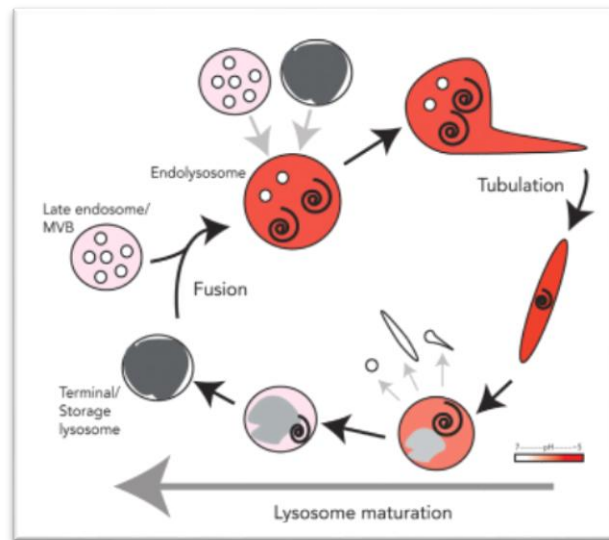


Figura 3. Posible fluctuación del pH de los lisosomas. Esquema que muestra el ciclo de regeneración de los lisosomas. Los endolisosomas estarían formados por endosomas tardíos y por lisosomas de almacenamiento terminales. Después los endolisosomas madurarían y se condensarían para volver a formar de nuevo los lisosomas terminales. Los endolisosomas serían activos para hidrolasas y tendrían pH ácido, mientras que los lisosomas de almacenamiento terminales serían inactivos para las hidrolasas y tendrían pH menos ácido. Los autores representan en gris el contenido electrodenso. Imagen seleccionada de (Bright, Davis and Luzio, 2016).

En el sistema de clasificación de las hidrolasas lisosómicas se genera un solo marcador de manosa 6 fosfato (M6P). Éste se añade sólo a la glucoproteína adecuada gracias a dos enzimas diferentes, una en cis-Golgi y otra en TNG. El TGN, a un pH de 6.5-6.7, contiene proteínas receptoras de M6P que se unen a las hidrolasas por el lumen, y a las proteínas de clatrina por el lado citosólico, formando así las vesículas de transporte hacia los EE de la vía biosintética (Alberts *et al.*, 2008; Hasanagic, Waheed and Eissenberg, 2015). El mecanismo de M6P y su receptor podría no ser la única vía de transporte hacia los lisosomas. Gracias a enfermedades humanas y modelos animales se conocen dos mecanismos, independientes, para dirigir hacia los lisosomas proteínas de membrana e hidrolasas lisosomales (Hasanagic, Waheed and Eissenberg, 2015). En cualquier caso, las vesículas pierden su cubierta y se fusionan con los EE donde las hidrolasas llevan a cabo una digestión leve. Tras la maduración del EE a LE el pH pasa a 6-5.5 y la mayoría de los receptores de M6P sueltan la hidrolasa lisosómica. Más adelante, los **endolisosomas**

contienen todas las hidrolasas activas. Las hidrolasas se activan tanto por el pH como por la proteólisis de los dominios inhibidores de las proenzimas (Alberts *et al.*, 2008).

1.1.3. Regulación en la vía endocítica. Estructura y funciones de sus componentes

La señalización que llevan a cabo los endosomas es muy compleja, ya que están implicados por un lado en la señalización celular, y por otro, en la señalización para su propia maduración.

La complejidad no se encuentra sólo en la señalización, sino que además, como hemos visto en el epígrafe anterior, sus componentes se encuentran en una dinámica constante de fusión y fisión, en la que comparten información y materiales de forma directa con otras membranas. Toda esta complejidad y heterogeneidad hacen muy complicado el conocimiento de toda la vía endocítica, y de su señalización. Actualmente aún se intenta conocer y simplificar el conocimiento sobre la vía.

Es prácticamente imposible, por ahora, separar la composición estructural de los componentes de la vía endocítica de la señalización para la maduración de estos componentes. Ya que los propios componentes de membrana están implicados en su maduración y su señalización.

Por tanto, en este epígrafe expondremos, por un lado, la implicación de los endosomas en la señalización celular (parte de lo que se conoce), y por otro, la composición y estructura y la señalización y maquinaria para la maduración de los componentes de la vía endocítica.

Es importante que EE y TGN sean compartimentos bien separados para poder estudiar la vía, en plantas y hongos no parece estar tan clara esa diferencia (Huotari and Helenius, 2011) (**Tabla 1**). Tener en cuenta que existen estudios sobre endosomas y lisosomas realizados con estos modelos.

Tabla 1. Las herramientas utilizadas para estudiar la vía endocítica	
Zona marcada o modelo utilizado	Marcaje
El cargo	Receptores y cargo como transferrina y su receptor o el factor de crecimiento epitelial (EGF) y su receptor. Son ubiquitinados por la parte citosólica y llevados al lisosoma para su degradación.
Fluidos	Con dextrano y otros solutos fluorescentes.
Membranas	Con lípidos fluorescentes
Virus y bacterias	Usan compartimentos endosomales
Levaduras y hongos filamentosos	comparables a los de las células animales.

**Tabla modificada de (Huotari and Helenius, 2011)

1.1.3.1. Implicación de los endosomas en la señalización celular

Algunos complejos de señalización son específicos de EE y pueden cambiar o modular la señalización inicial de la MP, ya que los EE están enriquecidos en PI(3)P (de las siglas en inglés: *phosphatidylinositol-3-phosphate*). Esto implica, por ejemplo, que la modificación postraduccional de las moléculas de señalización (como receptores acoplados a proteínas G) también ocurra en los endosomas (Platta and Stenmark, 2011).

Los LE también pueden regular eventos de señalización específicos y contienen los componentes para ello (por ejemplo, continúa la señalización iniciada por EGFR (de las siglas en inglés: *epidermal growth factor receptor*)). Los LE son esenciales en la mayoría de las células para el transporte del colesterol, la monitorización de nutrientes y la consecuente adaptación para procesar el metabolismo celular y el crecimiento celular (Scott, Vacca and Gruenberg, 2014). Además, los LE juegan un papel esencial en la señalización proinflamatoria de los macrófagos (Platta and Stenmark, 2011).

El regulador mTOR (de las siglas en inglés: *Ser/Thr kinase mammalian target of rapamycin*, rapamicina es un fármaco que inhibe mTOR), ensamblado al complejo mTORC1 (siglas del inglés: *mammalian target of rapamycin complex 1*), parece jugar un papel esencial en las funciones de señalización de los LE y endolisosomas. mTORC1 se regula por muchos eventos, siendo la translocación a la membrana de los endolisosomas el evento crucial (donde colocaliza con TRPML1 (de las siglas en inglés: *Transient receptor potential mucolipin 1*) (Li et al., 2016)), promovido por la disponibilidad de nutrientes (aminoácidos libres y glucosa) y regulado por las RAG GTPasas. La v-ATPasa (ATPasa de tipo vacuolar) también es esencial para la regulación de mTORC1, pero no se sabe si la señal se transmite directamente desde la bomba o si lo hace indirectamente a través de PAT1 (de las siglas en inglés: *proton-dependent amino acid exporter1*) (Scott, Vacca and Gruenberg, 2014). Algunas de las funciones de mTORC1 que se conocen son:

- Integra nutrientes con otras señales del entorno del LE, como las de factores de crecimiento, de estrés, etc.
- Regula el metabolismo a través de SREBP (de las siglas en inglés: *sterol regulatory element-binding protein 1*) a nivel pre y pos transcripcional; y a través de la translocación nuclear y la activación de TFEB (siglas del inglés: *transcription factor EB*), que es el principal regulador de la biogénesis de los endolisosomas. Algunas funciones conocidas de TFEB son:
 - Integrar los cambios en el entorno para regular la función y organización coordinada de los endosomas y lisosomas (Scott, Vacca and Gruenberg, 2014).
 - Controlar tanto las secreciones endolisosomales, como la biogénesis y la autofagia de los lisosomas (Medina and Ballabio, 2015).
 - Regular, tras un aumento transitorio citosólico de Ca^{2+} , la unión de LE y MVBs a la MP en células no especializadas. La función no se conoce, podría ser la de reparar la MP (Scott, Vacca and Gruenberg, 2014).

Por tanto, el Ca^{2+} y mTORC1 (que regula la monitorización de nutrientes) regulan TFEB, que a su vez regula la biogénesis endolisosomal (Scott, Vacca and Gruenberg, 2014) (**Figura 4**)

- En privación de factores de crecimiento o en inanición, mTORC1 está inactivo y TFEB se desfosforila y activa vía calcineurina, que a su vez es activada por Ca^{2+} citosólico
- Cuando los nutrientes están presentes mTORC1 está activo, fosforila TFEB e inhibe su actividad.

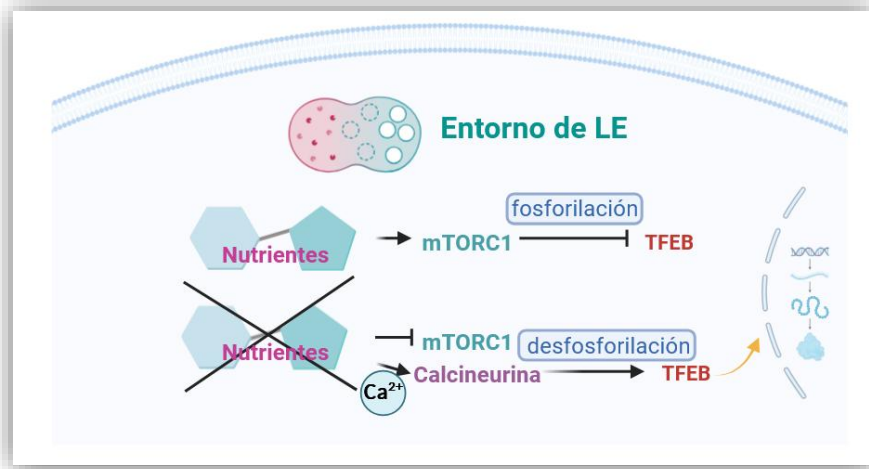


Figura 4. Activación de TFEB por mTRC1 según los nutrientes del entorno. En privación de factores de crecimiento o en inanición, mTORC1 está inactivo y TFEB se desfosforila y activa vía calcineurina activada por Ca^{2+} citosólico. Lo que activa a su vez la biogénesis endolisosomal. Cuando los nutrientes están presentes mTORC1 está activo, fosforila TFEB e inhibe su actividad. Creado con BioRender.com

Hay otros mecanismos que disparan la biogénesis de lisosomas y LE como la salida de Ca^{2+} desde LE por TRPML1 o por estrés de retículo (también vía TFEB/TFE3). Además, TFEB también puede ser fosforilado por ERK (de las siglas en inglés: *extracellular signal-regulated kinase*) (Malek et al., 2022).

Es interesante saber para esta tesis que la tapsigargina inhibe mTOR por inducción de AMPK dependiente de Ca^{2+} y reduce la fosforilación de TFEB, lo que induce su translocación nuclear y la biogénesis de LE (aunque tras 3 horas deja de ocurrir) (Medina and Ballabio, 2015).

1.1.3.2. Morfología y maduración de los componentes de la vía endocítica

La maduración de los endosomas que se requiere antes de la fusión con los lisosomas requiere unos 10-40 min. Esta maduración conlleva cambio en el pH, movimiento hacia el

área perinuclear, intercambio de los componentes de membrana (principalmente de Rab5 por Rab7), cambio en los patrones de fusión, formación de ILVs adicionales, adquisición de los componentes lisosomales y cambios en la morfología. Es interesante saber que además, la maduración de LE a lisosomas no parece ocurrir a temperaturas inferiores a 19-20°C. A continuación se desarrollan de forma resumida estos puntos.

Cambios en la morfología durante la maduración

Los **EE** Son heterogéneos en función, morfología y composición (**Figura 5**). Son relativamente pequeños y están cerca de la MP, aunque la distribución depende del tipo celular. Tienen una estructura compleja con dominios vacuolares y tubulares. Además en ellos comienza la formación de las ILV.

Antes del descubrimiento de las **LE**, se les denominaba lisosomas ligeros por la baja densidad en los gradientes. Los LE son típicamente redondos u ovals con un diámetro de entre 250-1000 nm con alta densidad de ILVs de unos 50-100 nm. La membrana de los LE son altamente negativas al igual que la de las ILV (Huotari and Helenius, 2011).

Los **lisosomas** denominados clásicos son densos, redondeados y pequeños. Tienen (a diferencia de los LE) una alta densidad en gradientes y pueden ser separados de los endosomas por fracciones subcelulares. LE y lisosomas tienen una membrana especial: la mayoría de proteínas están muy glucosiladas (como LAMP1 y 2) y además contienen transportadores de macromoléculas que depositan los productos de la digestión en el citosol (Scott, Vacca and Gruenberg, 2014; Huotari and Helenius, 2011). Por otro lado, también se encuentran las ATPasas de H⁺ vacuolar, al igual que en el resto de la vía, pero en este orgánulo acidifica el lumen hasta un pH de 4.5-5. Esta v-ATPasa actúa en contra de gradiente, de forma que usando ATP genera H⁺. En el interior del orgánulo encontramos las hidrolasas ácidas completamente activas. Contienen unos 40 tipos diferentes de hidrolasas: nucleasas, glucosidasas, fosfatasas, sulfatasas, fosfolipasas y lipasas, que se activan tanto por el pH ácido del lumen como por la proteólisis de las enzimas (Alberts *et al.*, 2008; Scott, Vacca and Gruenberg, 2014; Huotari and Helenius, 2011). Los encargados del potencial de membrana del lisosoma (estimado entre -20 y -40 mV) parecen ser los canales de potasio activados por voltaje (K_v) y los canales de Na⁺ tipo TPC.

Composición de las membranas de las **ILVs** durante la maduración:

La membrana de las ILVs tienen más cantidad de colesterol y esfingolípidos en estado tempranos, mientras que en estados más tardíos, como parte de LE y lisosomas, disminuyen y contienen más concentración de BMP/LBPA (de las siglas en inglés: *lysobisphosphatidic acid*) y ceramida. Esto se debe al transporte de colesterol hacia RE por acción de NPC1 y NPC2 (cuyas formas mutantes se encuentran en la enfermedad de Niemann Pick). NPC2 es una proteína soluble que extrae colesterol de las ILVs; NPC1 se

encuentra en la membrana y transfiere el colesterol a su través. La cantidad de BMP/LBPA (fosfolípidos especialmente concentrados en endolisosomas) correlaciona con el nivel total de colesterol en la célula, seguramente por su rol de control de colesterol en el almacenamiento endosomal (Huotari and Helenius, 2011).

LBPA tiene la capacidad de deformar las membranas in vitro y parece que ocurre lo mismo en la formación de ILVs en LE in vivo. LBPA y PI(3)P tienen una distribución opuesta en la vía endocítica (Scott, Vacca and Gruenberg, 2014):

- LE contienen alta cantidad de **LBPA** y es abundante en ILVs de LE y no en EE ni ECV/MVBs.
- **PI(3)P** está menos presente en LE y más en EE, ILVs de ECV/MVBs (donde no parece colocalizar LBPA).

Se sugieren diferentes poblaciones de LE según el contenido de membrana de sus ILVs, según si contienen mayor concentración de EGFR y PI(3)P o de BMP/LBPA (Huotari and Helenius, 2011).

La ambigüedad, la heterogeneidad y falta de sincronización parecen la explicación para la falta de consenso en conceptos y modelos para esta vía (Huotari and Helenius, 2011).

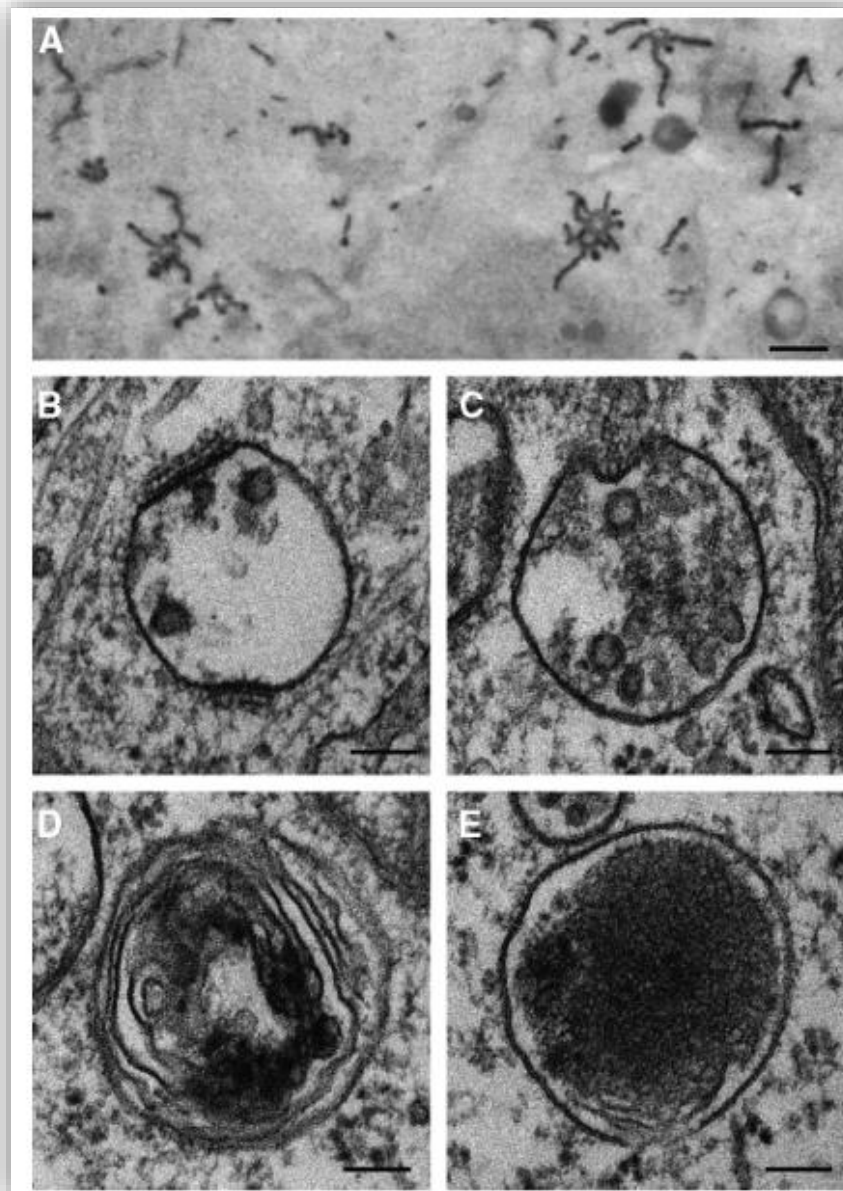


Figura 5. Morfología de endosomas y lisosomas por microscopio electrónico de endosomas tempranos (A y B), de endosomas tardíos (C), endolisosomas (D) y lisosomas (E). Son imágenes de células HeLa realizadas a 500 nm (A) y a 100 nm (B-E). Imagen seleccionada de (Huotari and Helenius, 2011).

Acidificación y motilidad durante la maduración

Acidificación

La acidificación es muy importante en el proceso de maduración. Clásicamente los EE se encuentran en un rango de 6.8-6.1, los LE en uno de 6.0-4.8 y los lisosomas en torno a 4.5. El bajo pH permite la actividad de las hidrolasas ácidas, el tráfico de membranas, el transporte del cargo, la regulación de la bomba v-ATPasa (su concentración en la

membrana, su isoforma y la asociación y disociación a los complejos V0 y V1) y la inactivación de patógenos (Huotari and Helenius, 2011).

La bomba de protones V-ATPasa es la encargada de la acidificación de los componentes de la vía endocítica. Está formada por dos complejos, V0 sirve como poro transmembrana para H^+ y V1 hidroliza ATP en la zona citosólica. Su localización en la membrana depende de la concentración de colesterol (Huotari and Helenius, 2011). La bomba genera un potencial de membrana positivo de unos +19 mV, lo que es favorable para la salida del Ca^{2+} , mientras que el lumen es negativo por el potencial de Donnan (debido a las proteínas alojadas), lo que favorece la entrada de H^+ , Ca^{2+} , etc. (Morgan *et al.*, 2011). Los inhibidores de la V-ATPasa son ionóforos carboxílicos: monensina y nigericina; bafilomicina A y concanamicina (Huotari and Helenius, 2011). La inhibición de la V-ATPasa afecta el paso del cargo de EE a LE (lo que influye en la maduración de los lisosomas) aunque esto podría depender del tipo celular; y también reduce la formación de ILVs.

La bomba añade entre 2 y 4 H^+ por cada ATP, pero la acidificación también depende de ATPasa Na^+/K^+ y de canales de Cl^- , Ca^{2+} , Na^+ y K^+ (Huotari and Helenius, 2011). El mayor cambio en el pH parece ocurrir con el reclutamiento de Rab7 (Podinovskaia, 2021). Además, se sabe que una mayor concentración de Rab7 en la membrana hace que haya una mayor acidificación, esta relación Rab7-pH se debe a que Rab7 recluta RILP, que a su vez, regula el reclutamiento y estabiliza V1G1 de la V-ATPasa (Johnson *et al.*, 2016).

Un ambiente iónico también podría afectar la maduración de los endosomas. Se produce un incremento de ion cloro durante la maduración y la concentración de ion calcio parece ser más baja al principio de la vía, y luego aumenta. Además es importante en los procesos de fusión para la formación de lisosomas y endolisosomas (Huotari and Helenius, 2011).

Motilidad

Los movimientos de los endosomas permiten su maduración y su función (**Figura 6**). Estos movimientos son indispensables para la fusión, el transporte, la degradación y el reciclado del cargo. La localización de los endosomas en el citoplasma influye en su cantidad, tamaño, y contenido del cargo según la distancia a la que se encuentran desde el núcleo. La conversión a LE puede ocurrir en la periferia de la célula, en la zona central y en la perinuclear (Huotari and Helenius, 2011).

Los endosomas dependen de los microtúbulos para moverse y por tanto de las dineínas y kinesinas para su anclaje a estos. Las kinesinas son una gran familia que se especializa principalmente en el **transporte en dirección más-final** (del inglés: *plus-end*), por el contrario, las dineínas se encargan de la **dirección del transporte menos-final** (del inglés: *minus-end*), que lleva a los LE hacia los lisosomas en la zona perinuclear. Rab7-GTP une a ORP1L (las siglas del inglés: *oxysterol-binding protein-related protein 1L*) (Johansson *et al.*, 2005) y a RILP (las siglas en inglés: *Rab-interacting lysosomal protein*) que reclutan en turnos la subunidad p150 de la dineína. Una baja concentración de colesterol detectado

por ORP1L en la membrana de los LE, da lugar a un cambio conformacional y la detención de la motilidad. Otro efector de Rab7: FYCO1 media la direccionalidad *plus-end* de los LE y autofagosomas (no se demuestra si a través de kinesinas) (Huotari and Helenius, 2011).

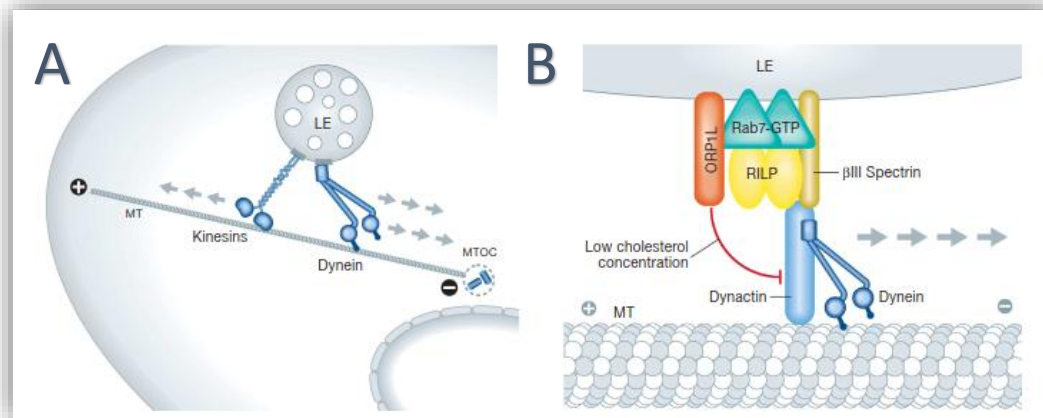


Figura 6. Motilidad de los LE. La motilidad de los LE a través de los MT (microtúbulo) **(A)** puede ocurrir en dirección *más-final* (hacia la membrana plasmática) gracias a las quinesinas y dirección *menos-final* (hacia la zona nuclear) gracias a las dineínas. **(B)** Esquema del complejo de unión a MT en dirección *menos*, formado por Rab7, RILP, ORP1L, dinactina, dineína y espectrina. Rab7 activado une a RILP y ORP1L; entonces se unen a espectrina β III y dineína activándose la motilidad. Imagen seleccionada de Huotari and Helenius, 2011.

La esnapina es una proteína de unión a SNARE implicada en la fusión de vesículas sinápticas y tiene un rol indispensable en el transporte retrógrado de los LE. Las proteínas SNARE permiten la fusión de las membranas y además aseguran que la unión sea la correcta. Se conocen 35 SNARE diferentes en células animales asociadas a diferentes orgánulos de la vía secretora o endocítica. v-SNARE se encuentra en la membrana de la vesícula y t-SNARE en la membrana de la célula diana. En el proceso de exocitosis regulada son necesarios el apareamiento de los dos tipos de proteínas, y la posterior entrada de ion calcio localizado, para terminar de ejecutarse. Las proteínas Rab ejercen un nivel más de control en la correcta localización de las proteínas SNARES, ya que controlan la liberación de proteínas inhibidores de t-SNARE. Por tanto, el transporte vesicular normal no se producirá si no contiene las proteínas SNARE y Rab adecuadas (Alberts *et al.*, 2008). Por estudios con pacientes de Niemann Pick se sabe que el colesterol también regula la motilidad de los LE (Huotari and Helenius, 2011).

Por el contrario, hay estudios que plantean el citoesqueleto de actina como el principal encargado de la dirección menos-final. Si la actina se elimina no se produce el paso de cargo EE-LE. Además, la actina se requiere para procesos de fisión de los EE y parece tener un papel en la fusión de los LE, lisosomas, fagosomas y autofagosomas (Huotari and Helenius, 2011).

Intercambio de Rab durante la maduración

Los EE son la primera parada para los receptores internalizados mediante la endocitosis mediada por receptor. Son aquellos orgánulos que contienen Rab5 desde el principio de la vía y cuyos efectores son EEA1 (de las siglas en inglés: *Early Endosome Antigen 1*) (Platta and Stenmark, 2011) y VPS34/p150. Además, el EE es el principal regulador de la conversión a LE.

Según uno de los modelos planteados en la maduración de los endosomas, los LE de nueva formación se generan a partir de un complejo previo a Rab7. Se generaría un híbrido transitorio Rab5/Rab7, en el que Rab7 parece ser reclutado por un GTP-Rab5, que luego pasa a GDP-Rab5. Los túbulos y el resto de dominios de los EE se pierden para formar LE. Rab7 también parece esencial para la maduración y para el transporte del cargo hacia los lisosomas. El proceso real no se conoce aún pero debería involucrar una maquinaria compleja, en la que primero hay un aumento de Rab5 y luego una eliminación absoluta. La hidrólisis de GTP a GDP es muy importante y podrían estar involucrados RLIP (que contacta con LE y dineínas y que está relacionada con el transporte retrógrado) y el complejo HOPS (relacionado con la fusión de LE) (Luzio, Pryor and Bright, 2007). Además, de forma negativa en la maduración se involucra a Rubicon (por secuestro de UVRAG) (Sun *et al.*, 2010) y PLEKHM1 que son efectores de Rab7 (Huotari and Helenius, 2011).

La conversión de los fosfatidilinositol (PI) durante la maduración

La conversión de los PIs es importante en la maduración de los endosomas y ocurre en sus membranas, también regula la maquinaria de ESCRT que es la responsable de la formación de ILVs.

En el proceso de conversión PI se fosforila dando lugar a PI(3)P en EE; además PI(3)P también se encuentra en la membrana de las ILVs (Huotari and Helenius, 2011)); luego se vuelve a fosforilar en LE generando PI(3,5)P₂. PI(3)P se encuentra en la parte citosólica de los EE y es sintetizado a partir de PI por la quinasa VPS34 (PI(3)K de tipo 3), la activación de Rab7 es la que controla la síntesis de PI(3)P. Luego, se genera PI(3,5)P₂ por la quinasa PIKfyve (siglas del inglés: *phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase*).

En células de mamíferos las vacuolas inducidas por inhibición de PIKfyve son no ácidas, además PIKfyve podría participar en la exocitosis y en la regulación de canales de calcio como TRPML1. PI(3,5)P₂ es importante principalmente en la vía degradativa, activa directamente canales de calcio y regulan la fusión y la fisión (Huotari and Helenius, 2011).

Generación de ILVs durante la maduración

La formación de las ILVs de los cuerpos multivesiculares, y la posterior liberación, es uno de los eventos más importantes en la biogénesis de los LE, y por tanto, también lo es en

la maduración de los endosomas. Gracias a la formación de las ILVs se desactiva la señalización de los receptores y las hidrolasas se contienen en el interior de los endosomas (debido a la carga negativa generada por el fosfolípido BMP/LBPA de las ILVs, ya que las hidrolasas contienen una gran carga positiva) (Huotari and Helenius, 2011).

La formación de las ILVs dependen del complejo ESCRT, de sus zonas de unión (las clatrininas, y los PI(3)P y PI(3,5)P₂) y de las kinasas de lípidos. Las proteínas ESCRT se unen secuencialmente a los PI pasando la carga de un complejo al siguiente, y finalmente, participan en la clasificación del cargo en los cuerpos multivesiculares (Platta and Stenmark, 2011; *Alberts et al.*, 2008; Huotari and Helenius, 2011). Actualmente, en células mamíferas se ha propuesto la maquinaria de BMP/LBPA y ceramida demostrada *in vitro* para la formación de ILVs independiente de EGF (Huotari and Helenius, 2011).

Por otro lado, ni la ausencia de ATPasa, ni de Rab5 y Rab7 parecen impedir la formación de ILVs; mientras que la ausencia de RILP (efector de Rab7, une a ESCRT-II y se relaciona con los motores de dineína/dinactina) disminuye la formación de ILVs (Huotari and Helenius, 2011; Russell, Nickerson and Odorizzi, 2006).

1.2. Crosstalk

El uso de vesículas de transporte es el medio de comunicación más estudiado de la vía endocítica. Pero como hemos visto, los componentes de la vía también utilizan la difusión y el transporte activo (como en el caso de iones o de colesterol), como medios de comunicación con otros orgánulos. En este epígrafe nos centraremos en otro método que utilizan los componentes de la vía endocítica para la comunicación: los *sitios de contactos de membrana* (MCS de las siglas en inglés: *membrane contact sites*). Los MCSs se han estudiado principalmente por microscopía electrónica, pero nuevas técnicas, como la fluorescencia en célula viva, han hecho ver que existen estos contactos entre todos los orgánulos. Incluyendo las membranas que se encuentran dentro de los orgánulos, como ocurre con las ILVs que se encuentran en los cuerpos multivesiculares (**Figura 7**) (Prinz, Toulmay and Balla, 2020).

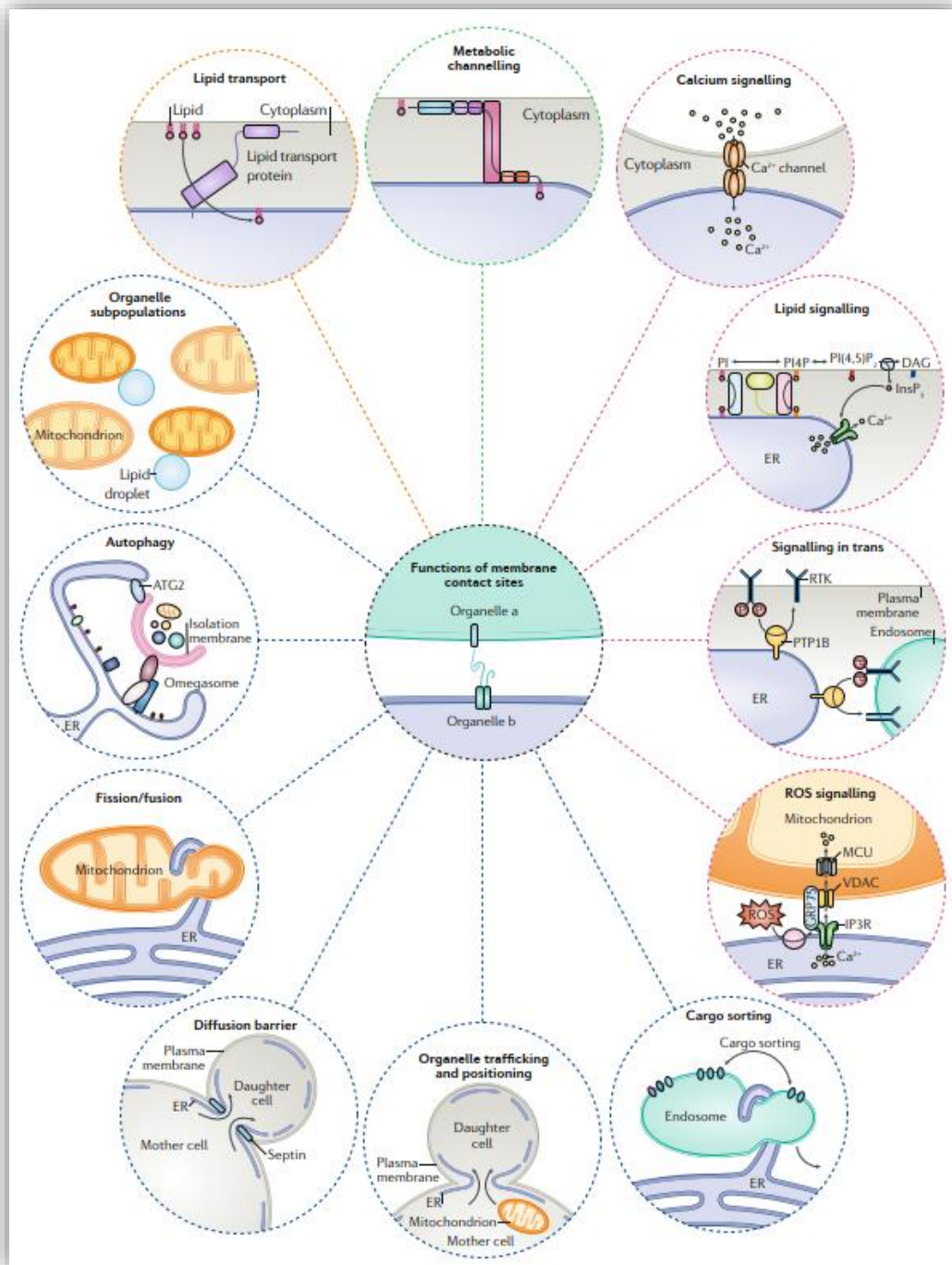


Figura 7. MCSs. Esquema de los MCSs entre diferentes tipos de orgánulos. Muestra las diferentes funciones que pueden llevarse a cabo gracias a estos contactos: señalización (en rosa), regulación de la dinámica de las membranas (azul), transporte de lípidos (naranja), canalización metabólica (verde). MCSs, Sitios de contacto entre membranas. Imagen seleccionada de (Prinz, Toulmay and Balla, 2020).

Existe mucha diversidad de MCSs según la distancia entre orgánulos, la composición, las funciones o el número de contactos entre orgánulos (Prinz, Toulmay and Balla, 2020).

1.2.1. Entre mitocondrias y LE

Se ha demostrado que existen sitios de contacto entre mitocondrias y lisosomas y también entre mitocondrias y LE (Wong, Ysselstein and Krainc, 2018), las cuales permiten la ejecución de funciones mitocondriales como la fisión. Además, en estos sitios de unión se encuentran los TRPML1 canales catiónicos de calcio que permite la salida del ion desde los lisosomas, y la posterior entrada de éste hacia la mitocondria (Peng, Wong and Krainc, 2020). La entrada de calcio hacia la mitocondria desde los sitios de contacto están regulados en la cara extracelular de la membrana mitocondrial por VDAC1 (de las siglas en inglés: *voltage-dependent anion channel 1*) y en la membrana interna por el transportador MCU (de las siglas en inglés: *mitochondrial calcium uniporter*). Se ha comprobado que no existe colaboración ni desde el RE ni desde la MP. El Ca^{2+} entrante en la mitocondria se relaciona con actividades mitocondriales como la señalización de ROS o la fosforilación oxidativa. Además, en el mismo estudio se demuestra que la mucopolidosis tipo IV (MLIV), enfermedad causada por la pérdida de la función de TRPML1, está asociada con malformaciones en los sitios de contacto entre mitocondria y lisosoma (Peng, Wong and Krainc, 2020).

1.2.2. Entre Aparato de Golgi y LE

En los últimos años se propone una posible relación entre el TGN y la vía endocítica, ya que el TGN puede fusionarse con estructuras endocíticas marcadas con Rab5 y adquirir identidad de endosomas tempranos, y además en el transporte retrógrado se produce una situación de vecindad muy próxima donde parece llevarse a cabo la autofagia (Podinovskaia, 2021; Shi *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2023). En un estudio reciente de 2023 realizado en *Drosophila*, se ha encontrado una alta concentración de lisosomas en las zonas de ERES-Golgi (del inglés: *ER exit sites*), pero no de LE (seguramente por el momento del proceso endocítico). Debido a estos datos los autores proponen un inicial “GERL” en el que se relacionarían Golgi-RE-lisosomas. La estructura formada por el contacto entre lisosoma y TGN es parecida al de las cisternas del Golgi (**Figura 8**), además en estas zonas también pueden encontrarse lisosomas libres. La asociación y disociación parece dinámica, interconvertible y de vida relativamente larga (Zhou *et al.*, 2023).

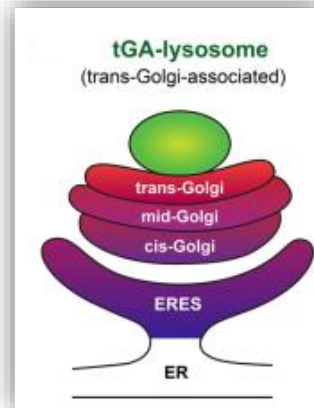


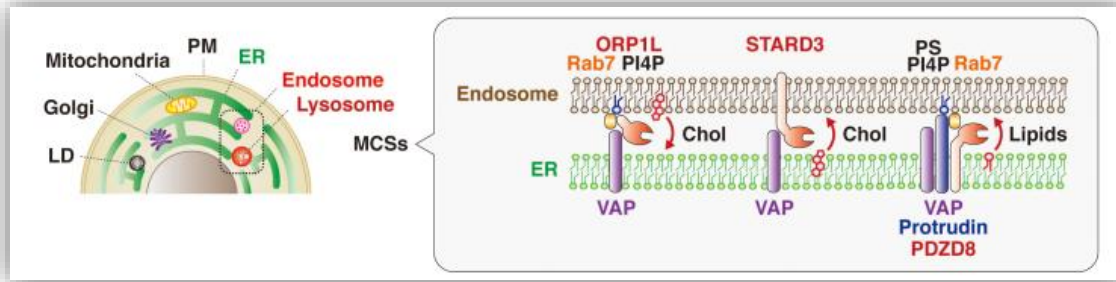
Figura 8. Esquema sobre la propuesta de formación de “GERL” en el que se relacionarían Golgi-RE-lisomas. Imagen seleccionada de (Zhou *et al.*, 2023).

1.2.3. Entre retículo endoplasmático y LE

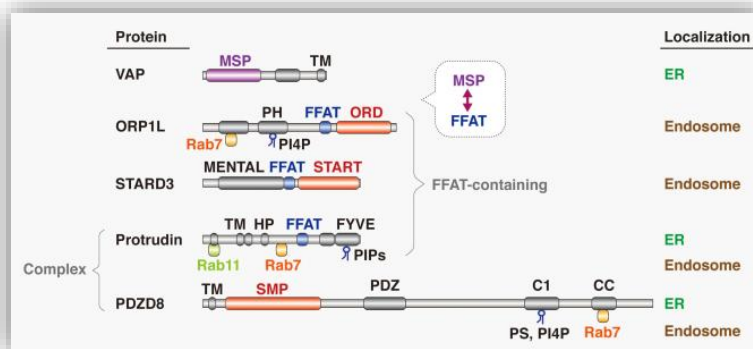
Los sitios de contacto entre RE y LE son esenciales para la clasificación de proteínas, la entrega de lípidos y para la dinámica y motilidad de los LE (Khan *et al.*, 2021). En apartados anteriores se ha comentado lo esencial de la motilidad para la maduración de los endosomas y su relación con las dineínas y las kinesinas. Sin embargo, la velocidad y la capacidad de estos sistemas de motilidad no cuadran *in vitro* con la velocidad de maduración de los endosomas, a no ser que se relacione con el RE, en cuyo caso, se aumentaría la velocidad de la motilidad y se ajustaría al tiempo de maduración de los endosomas (Wijdeven *et al.*, 2015).

Se ha demostrado la existencia de sitios de contacto entre RE y LE en neuronas (Shirane, 2020) y en otros tipos celulares (López-Sanjurjo *et al.*, 2013). La función principal de estos MCSs parece ser la **transferencia de colesterol y de otros lípidos** desde LE hacia RE, y al contrario (**Figura 9**). En la regulación generada por protrudina (proteína descubierta por su relación con el crecimiento de las neuritas) la dirección de los lípidos es desde ER hacia lisosomas (Shirane, 2020).

A



B



C

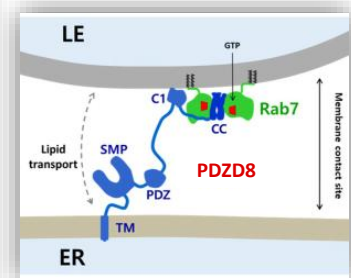


Figura 9. Estructura y localización de las proteínas en el MCS entre RE y LE. (A) Esquema que representa los diferentes sitios de contacto entre RE y algunos orgánulos, entre los que se encuentran los LE y los lisosomas. Nótese que VAP (proteína localizada en RE) unida a ORP1L (localizada en LE) permite el transporte de colesterol desde LE hacia ER, mientras que VAP unida a STARD3 (localizada en LE) permite el paso desde ER hacia LE. El paso de lípidos desde ER hacia EL se genera por el constructo VAP-pretrudina-PDZD8 unidos a Rab7. Las proteínas implicadas en los MCS son: VAP (*vesicle-associated membrane protein (VAMP)-associated protein*), ORP1L (*oxysterol-binding protein-related protein 1L*), STARD3 (*steroidogenic acute regulatory protein (StAR) domain 3*), Protrudina y PDZD8 (*PDZ domain-containing protein 8*). **(B)** Esquema de la estructura y localización de las diferentes proteínas que forman parte del MCSs entre RE y LE. Los motivos MSP (*the major sperm protein domain*) de VAP interactúa con los motivos FFAT (*two phenylalanine in an acidic tract*) de ORP1L y de STARD3 (ORD y START son dominios de transferencia de lípidos) **(C)** Esquema de la localización en los MCS de los componentes de PDZD8: SMP (*synaptotagmin-like mitochondrial lipid-binding protein*), PDZ, C1, CC, Ps. Imagen A y B seleccionada de (Shirane, 2020); Imagen C seleccionada de (Khan *et al.*, 2021).

Además, el MCS entre RE y LE parece estar implicado en la **maduración de los LE** a través del complejo VAP-protrudina-PDZD8. Se facilita el movimiento de los endosomas en dirección *más-fin*, ya que protrudina recluta la kinesina 1, en concreto a KIF5 (subunidad de kinesina1), lo que podría permitir la motilidad directamente (Shirane, 2020). Por otro lado, el complejo VAP-ORP1L también estaría implicado en la motilidad: según los cambios de colesterol contenidos en LE, ORP1L bloquearía el reclutamiento del complejo motor de dineína a través de RILP. Recordemos que el colesterol puede sintetizarse y

pasar de RE a LE o recogerse como LDL del citosol. Cuando ORP1L (localizado en LE) detecta colesterol se prioriza la dirección *menos-fin* de los microtúbulos, por el contrario, si hay baja [colesterol] en LE éste expone el motivo FFAT, lo que permite la unión a VAPA (localizada en RE), inhibiendo el desplazamiento *menos-fin* y pasando a la dirección *más-fin* (Wijdeven *et al.*, 2015)

Por otro lado, PDZD8 se conoce en las **MAMs** (de las siglas en inglés: *mitochondria-associated ER membranes*) por su capacidad para el traspaso de ion calcio y la regulación de su dinámica en neuronas. La unión entre PDZD8 y Rab7-GTP, se ha determinado por cristalización (Guillén-Samander, Bian and De Camilli, 2019; Khan *et al.*, 2021), y a su vez, PDZD8 une con protrudina (**Figura 9**) (Shirane, 2020). Esta unión entre Rab7, PDZD8 y protrudina parece conectar también a las mitocondrias (**Figura 10**), igualmente relacionada con el traspaso de lípidos y la maduración de los endosomas. Además, se ha detectado colocalización con WDR91 (efector de Rab7 que participa en la interconversión entre Rab5-Rab7) pero no se ha detectado colocalización con Rab5 ni con LAMP1, lo que lleva a pensar que los LE deberían encontrarse en proceso de maduración (Elbaz-Alon *et al.*, 2020; Guillén-Samander, Bian and De Camilli, 2019). Este estado madurativo en proceso cuadra con la conocida unión en los sitios de contactos de membrana entre protrudina con Rab7 (característica de LE) y con PI(3)P (característica de EE) (Wijdeven *et al.*, 2015).

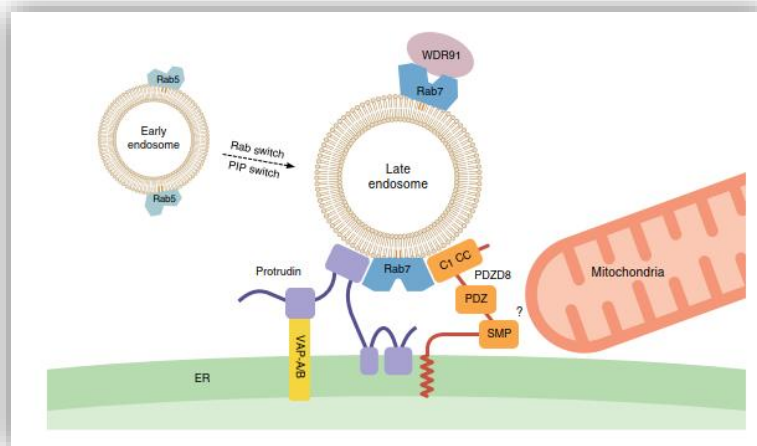


Figura 10. Esquema de crosstalk entre ER, LE y mitocondrias a través de PDZD8. Imagen seleccionada de (Elbaz-Alon *et al.*, 2020).

Además, en los MCS protrudina parece promover la fagocitosis de células que muestran fosfatidil serina en su superficie, promoviendo la translocación de orgánulos con VAMP7 y FYCO1 hacia la superficie. VAMP7 se encuentra en las membranas de LE y lisosomas (Elfmark, 2023).

Algunos autores sugieren que en los sitios de contactos de membrana podría existir un intercambio de **Ca²⁺** desde RE hacia lisosomas que permitiría el relleno de estos últimos a partir de IP3R. Sugieren un canal en el lisosoma que podría unir directamente a IP3R (**Figura 11**). El canal de calcio podría ser TRPML1 que puede liberar y captar calcio (Garrity *et al.*, 2016; Kilpatrick *et al.*, 2016; López-Sanjurjo *et al.*, 2013 Jan 1; López-Sanjurjo *et al.*, 2013).

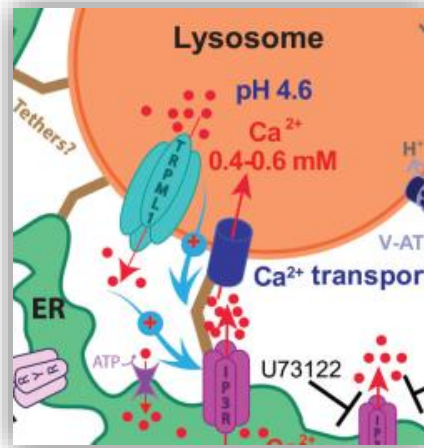


Figura 11. Entrada de Ca^{2+} en el LE desde el MCS. Esquema representativo de la entrada de Ca^{2+} desde los Canals de IP3 del RE hacia el lisosoma. Imagen recortada de (Garrity *et al.*, 2016).

La existencia de CICR (de las siglas en inglés: *Ca²⁺-induced Ca²⁺ release*) entre RE y endolisosomas también ha sido propuesta por algunos autores (**Figura 12 A**). En ésta se activaría PLC de lisosomas generando PIP2 y produciendo IP3, que a su vez, activaría al IP3R de RE. El Ca²⁺ que saldría desde RE y desde lisosoma activaría los receptores de RyR aumentando la cantidad de Ca²⁺ en el citosol. También se propone la salida de Ca²⁺ desde la membrana plasmática debido a la salida de Ca²⁺ desde los lisosomas (**Figura 12 B**): SOCE (de las siglas en inglés: *store-operated Ca²⁺ entry*) (Brailoiu and Brailoiu, 2016).

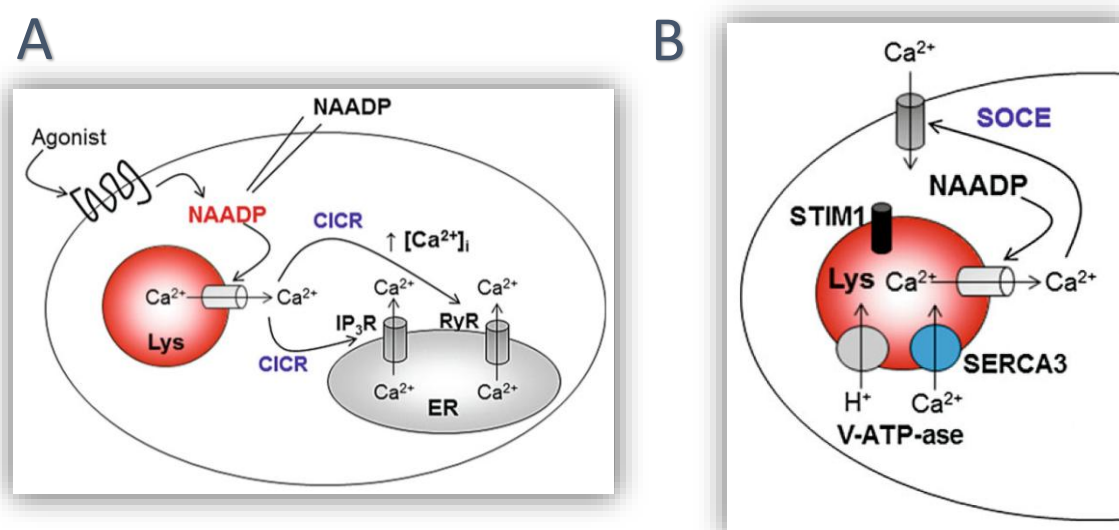


Figura 12. Representación CICR y SOCE debido a lisosomas. (A) se representa CICR en plaquetas: PLC se activaría en lisosomas generando el IP₃ que activaría los canales de calcio de RE. A su vez, la salida de Ca²⁺ debido a NAADP en lisosomas y a IP₃R en RE activaría los canales de rianodina y aumentaría la [Ca²⁺]_i. (B) Se representa SOCE en plaquetas a través de lisosomas: Se vacía el depósito de Ca²⁺ mediante la inhibición de SERCA3 y la activación de los canales de Ca²⁺ con NAADP, entonces se produce el acercamiento del orgánulo a la membrana y la entrada de Ca²⁺ al citosol gracias a STIM1. CICR, *Ca²⁺ induced Ca²⁺ release*; SOCE, *Store-operated calcium entry*; NAADP, *Nicotinic acid adenine dinucleotide*; IP₃R, *inositol 1,4,5-trisphosphate receptors*; RyR, canales de rianodina. Imagen seleccionada de (Brailoiu and Brailoiu, 2016).

1.3. Señalización de Ca²⁺ en los endosomas tardíos: almacenamiento y liberación

El Ca²⁺ es un segundo mensajero ubicuo implicado en muchos procesos esenciales para el organismo como la contracción muscular, la neurotransmisión o la expresión génica (Clapham, 2007). El Ca²⁺ no puede ser degradado, debe ser expulsado al exterior celular o almacenado internamente para evitar la toxicidad celular que podría llevarla a apoptosis. La concentración de Ca²⁺ citosólico debe mantenerse en unos 100 nM, mientras que en el espacio extracelular se encuentra a 1-2 mM, y en los orgánulos de alta capacidad a unos 500 μM. Esta diferencia en la [Ca²⁺] permite su rápida entrada al citosol por gradiente electroquímico (Krebs, Agellon and Michalak, 2015).

Los principales orgánulos encargados del almacenamiento de Ca²⁺ son el RE y el Ap de Golgi, aunque también se encargan de ello otros pequeños orgánulos específicos según el tipo celular. Por otro lado, el núcleo y la mitocondria son orgánulos tamponadores de Ca²⁺, es decir, que son capaces de captar Ca²⁺ en momentos puntuales, cuando es necesario para la célula, y de liberarlo después.

La alta concentración de Ca²⁺ es necesaria para el funcionamiento de muchas enzimas y proteínas que unen a Ca²⁺ con baja afinidad, como la calreticulina. Mientras que la baja

concentración del ion lleva a estrés reticular y a muerte celular (Gallego-Sandín, Alonso and García-Sancho, 2011).

El aparato de Golgi utiliza su almacenamientos de alta concentración de Ca^{2+} para llevar a cabo algunas de sus funciones básicas como el tráfico de vesículas o las modificaciones de macromoléculas (Gallego-Sandín, Alonso and García-Sancho, 2011).

En los últimos años, los endolisosomas se han descrito como otro tipo de orgánulo, presente en todos los tipos celulares, con la capacidad de almacenar altas concentraciones de Ca^{2+} . El almacenamiento de Ca^{2+} en el lumen del lisosoma se conoce desde los años 70 por microscopía electrónica y por histoquímica, pero no se conocía el papel que juega ni las concentraciones (Patel and Docampo, 2010). Además, en apartados anteriores se ha explicado la importancia reguladora de mTORC1 (imprescindible en la biogénesis de los endolisosomas) y su relación con la capacidad de la célula para llevar a cabo sus funciones bioquímicas.

1.3.1. Importancia del Ca^{2+} en endosomas tardíos y lisosomas

Las primeras medidas de Ca^{2+} del lumen lisosomal in vivo se realizaron en 2002 (Christensen, Myers and Swanson, 2002) y los resultados fueron consistentes con medidas indirectas anteriores (Haller *et al.*, 1996). Estas primeras medidas luminare fueron difíciles debido a la dependencia de las sondas de calcio fluorescentes al pH. Finalmente fueron no dirigidas, se utilizó la endocitosis de un coctel de marcadores de pH y de Ca^{2+} y se determinó la localización por el aspecto del marcaje: tubular y vesicular típico de lisosomas. A continuación, determinaron a partir del marcaje qué orgánulos tenían pH 4 y en esos mismos orgánulos midieron los cambios de calcio. Determinaron que las dos sondas que utilizaron: furaDX y OGBDx miden calcio entre 10^{-2} y 10^{-4} M. De esta forma, se observó que la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{lisosomal}}$ es de $6,0 \pm 0,9 \times 10^{-4}$ M (con una muestra de 24 células) con furaDX (ratiométrica) y de $4,0 \pm 0,7 \times 10^{-4}$ M (con una muestra de 18 células) con OGBDx (no ratiométrica), por tanto, concluyeron que se trataba de un orgánulo de alta concentración de Ca^{2+} (Christensen, Myers and Swanson, 2002).

La liberación de calcio desde los orgánulos ácidos se relaciona con actividades tan importantes para la célula como: la autofagia, la actividad de mTOR, la fusión y fisión, la modificación de la dinámica de Ca^{2+} de otros orgánulos (como mitocondria y RE) o la regulación del tráfico lisosomal y su tamaño (Yang *et al.*, 2019a; Kilpatrick *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016; Peng, Wong and Krainc, 2020; D *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2019b).

Como hemos visto en el apartado anterior, los LE y los lisosomas están implicados en la detección de señales nutricionales de la célula, y en la posterior ruta metabólica desencadenada. Además, están implicados en muchos otros procesos fundamentales para la célula como la comunicación con otros orgánulos, en la que la dinámica del Ca^{2+} podría ser necesaria, ya que la vía endocítica necesita tanto realizar fusión y fisión, como actuar en MCSs para relacionarse con otros orgánulos. En estos procesos el Ca^{2+} es fundamental, no sólo en el soporte estructural, sino también en la señalización, como en el caso de la regulación a través de mTOR y mTORC1. En este apartado revisaremos los principales actores propuestos para la entrada y la salida del Ca^{2+} desde los endolisosomas (**Figura 13**).

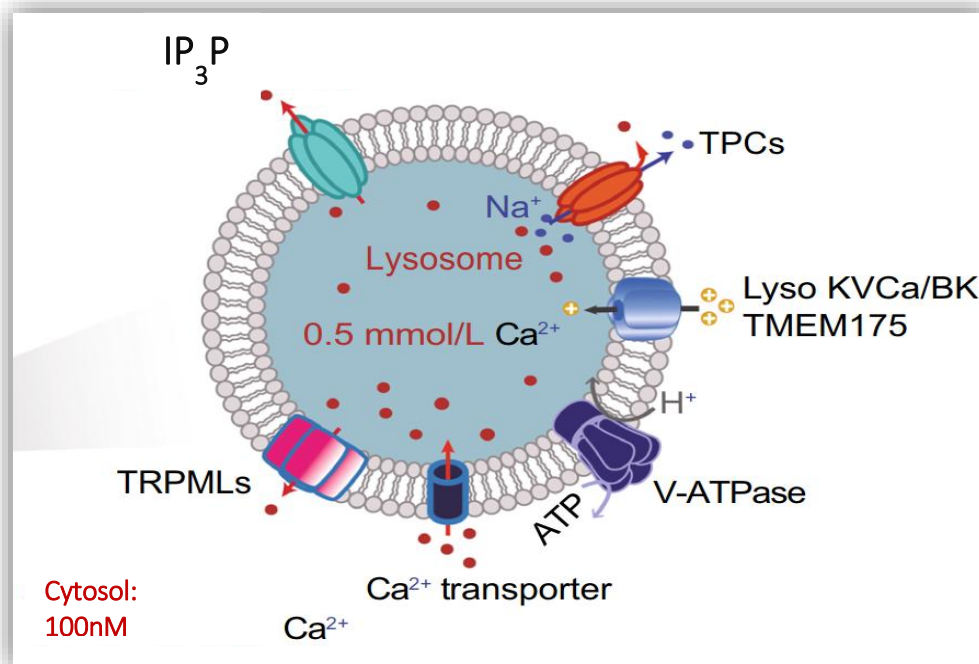


Figura 13. Principales componentes relacionados con la entrada y salida de Ca^{2+} de los endolisosomas. Esquema sobre los principales componentes implicados en la salida de Ca^{2+} : TPCs, TRPML1, IP_3 R, RyR, y en la entrada de Ca^{2+} : diferentes bombas e intercambiadores. Imagen modificada de (Yang *et al.*, 2019b)

1.3.2. Entrada de Ca^{2+} . Posibles bombas de Ca^{2+}

La entrada de Ca^{2+} a los endolisosomas desde el citosol no se conoce aún. Podría deberse a intercambiadores o a bombas (**Figura 14**) ya que la entrada debe generarse en contra de gradiente electroquímico. Algunos autores se decantan por intercambiadores debido a la velocidad de entrada del Ca^{2+} (Garrity *et al.*, 2016). En cualquier caso, los principales candidatos para la entrada de Ca^{2+} son (**Tabla 2**):

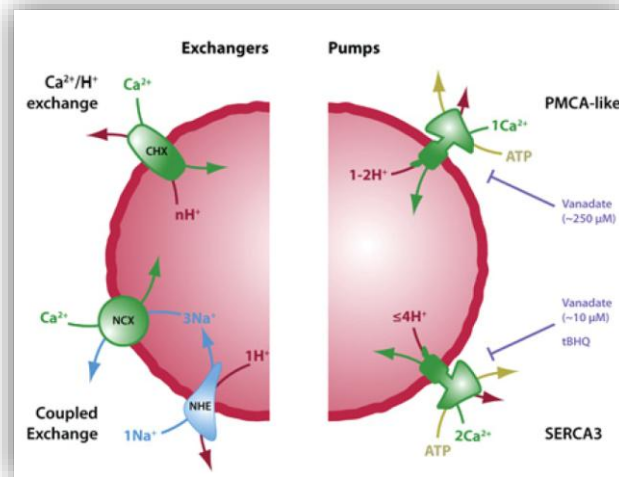


Figura 14. Posibles intercambiadores y bombas encargados de la entrada de Ca^{2+} al lumen de los orgánulos acídicos. Esquema de sistemas de baja afinidad y alta capacidad (izquierda): diferentes ejemplos de posibles antiportadores de Ca^{2+} con H^+ (CHX, $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ exchanger) o con Na^+ (NCX, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger; ó NCKX, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}-\text{K}^+$ exchanger); y de alta afinidad y baja capacidad (derecha): tipo PMCA que intercambia una molécula de Ca^{2+} por 1-2 de H^+ o tipo SERCA3 que intercambia dos de Ca^{2+} por unos 4 de H^+ . Imagen seleccionada de (Morgan *et al.*, 2011).

Sistemas de alta afinidad y baja capacidad (Patel and Docampo, 2010; Patel and Muallem, 2011; Gerasimenko *et al.*, 1998):

- SERCA (de las siglas en inglés: *sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase*). Se localiza en el retículo y bombea dos iones de Ca^{2+} por cada molécula de ATP utilizada. Se regula por fosforilación y por el propio Ca^{2+} que regula las quinasas. Es una ATPasa de tipo P que también se encuentra presente en el cis-Golgi y que es sensible a tapsigargina (Tg) y a 2,5-di(t-butil)-1,4-benzohidroquinona (TBH). Existen diferentes tipos de SERCA que responden de forma distinta a inhibidores, tienen pesos moleculares distintos y son regulados de forma diferente por el citoesqueleto de actina. **SERCA3 es sensible a TBH**, mientras que SERCA2b no lo es. Además **SERCA3 es menos sensible a tapsigargina** que la isoforma 2b (Rosado *et al.*, 2004). Por otro lado, las ATPasas de tipo P son capaces de bombear H^+ junto con el ion calcio. Esto es especialmente importante en organelas acídicas, ya que SERCA necesitaría bombear H^+ para tener energía suficiente, lo que haría, si no hay compensación, que el lumen tornara hacia el neutro (Morgan, Davis and Galione, 2015).
- SPCA (de las siglas en inglés: *secretory pathway $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ ATPases*) Bomba de Ca^{2+} de tipo P de la vía secretora, que se encuentra principalmente en el trans-golgi. Es insensible a Tg y se inhibe por vanadato (Morgan, Davis and Galione, 2015).

- PMCA (de las siglas en inglés: *plasma membrane Ca²⁺ ATPase*) Bomba de Ca²⁺ de tipo P que se encuentra en la MP. Es insensible a Tg aunque esto parece depender del tipo celular o del tipo de almacenamiento.

Sistema de baja afinidad y alta capacidad

- Intercambiadores: CAX (de las siglas en inglés: *H⁺/Ca²⁺ antiporter*) son antiportadores de Ca²⁺ y de aniones que necesitan el gradiente de protones para añadir el ion calcio al lumen de las vacuolas (Hirschi *et al.*, 1996). Según los datos proporcionados por Yang y colaboradores, la visión de que el gradiente H⁺ lisosomal es esencial para el mantenimiento y la captación de Ca²⁺ en lisosomas, podría deberse a la mala interpretación de datos que no son lo suficientemente cuidadosos con el pH. Con esta propuesta se refieren a estudios en los que la inhibición de la V-ATPasa lleva a la liberación de Ca²⁺ mientras que la restauración del pH se acompaña del restablecimiento del Ca²⁺. Se propuso que CAX podría conducir la captación de Ca²⁺ dependiente de pH, pero esto no puede ocurrir en mamíferos placentarios, ya que, según los autores, no cuentan con los genes de CAX. Por otro lado, también se refieren el intercambiador Na⁺/H⁺ de los que comentan que sólo se encuentran en endosomas, no en lisosomas (Yang *et al.*, 2019a). Según el reciente estudio realizado por Matthew Zajac (Zajac *et al.*, 2024), el responsable de la entrada del Ca²⁺ al lumen de las organelas ácidas no es exactamente un CAX, ya que el transporte de H⁺ es escaso, en este artículo se le denomina LCI a un “CAX roto” (del inglés: “*Broken CAX*”) que transporta Ca²⁺ pero no protones, a pesar de que LCI se activa con estos últimos (**Figura 15**). Por lo tanto, según este estudio se debería hablar de un importador de Ca²⁺ lisosomal activado por pH en humanos (cuyo gen se denomina TMEM165 en humanos, pero ha sido denominado LCI por los autores). El gen de CAX en humanos se había relacionado con Golgi pero se ha descrito que en lisosomas también importa Ca²⁺. Es decir, que actualmente existe controversia con respecto a la existencia de este intercambiador, sobre su función y estructura, y serán necesarios más estudios sobre el tema para terminar de aclararlo.

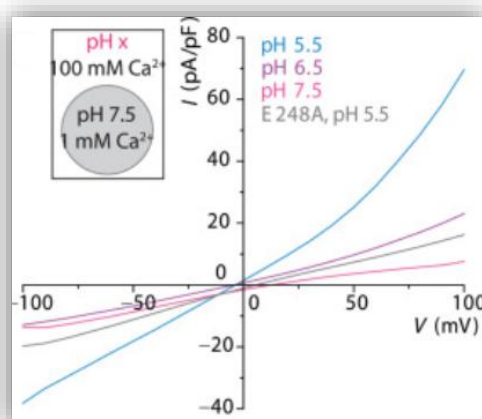


Figura 15. LCI es dependiente del pH. Existe una conducción unidireccional del Ca^{2+} 100 mM en células HeLa que aumenta a pH extracelular ácido. Imagen seleccionada de (Zajac *et al.*, 2024).

Tabla 2. Transporte hacia el lumen de orgánulos ácidos

Intercambiador o bomba	Características generales
SERCA- Ca^{2+}-ATPasa tipo P	<i>Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca^{2+}-ATPase</i> - Intercambia 2 Ca^{2+} por 4 H^{+} - Sensible a Tg* y TBH*; diferentes tipos de SERCA que responden de forma distinta a inhibidores
SPCA- Ca^{2+}-ATPasa tipo P	<i>Secretory Pathway Ca^{2+}-ATPase</i> - Localización principal trans-golgi - Sensible a vanadato e Insensible a Tg
PMCA- Ca^{2+}-ATPasa tipo P	<i>Plasma Membrane Ca^{2+} ATPase</i> - Localización principal en membrana plasmática - Insensible a Tg (según tipo celular o almacenamiento)
Intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ (CAX) o uniportador LCI	<i>$\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger</i> - Controversia hacia si son antiportadores o uniportadores de Ca^{2+} - Principal localización en Golgi. Posibilidad en lisosomas
Intercambiador $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ (NCX)	<i>$\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger</i> - Posible localización en lisosomas

* Tg, tapsigargina; TBH, 2,5-di(t-butil)-1,4-benzohidroquinona

Otra opción de relleno de los endolisosomas podría deberse al requerimiento de Ca^{2+} desde el RE a través de los receptores de IP₃. La inhibición de SERCA y/o IP₃R inhiben el relleno de estas organelas independientemente del pH. Basándose en estos datos, los autores proponen un modelo de tres pasos de relleno de Ca^{2+} del endolisosomas dependiente de RE (Yang *et al.*, 2019a) (**Figura 16**):

1. Disparo: por el incremento o disminución del Ca^{2+} perilisosomal.
2. Acoplamiento: los MCSs se producen con una cercanía de menos de 30nm, lo que puede generar el paso del Ca^{2+} en la zona de interacción sin que se produzca elevación en el citosol. Las proteínas que mantienen este acercamiento son: ORP1L, STARD3, ORP5, NPC1. Se han encontrado varias proteínas de tipo sinaptotagmina que acercarían ambos orgánulos.
3. Abastecimiento: el Ca^{2+} sería transportado desde el RE al LE o lisosoma. El Ca^{2+} saldría por el IP_3R y entraría por un canal de Ca^{2+} : esto no se ha demostrado directamente, pero los autores argumentan que es plausible porque el IP_3R está activo constitutivamente, de manera que no hace falta mucha cantidad de Ca^{2+} para que éste se libere desde el interior del RE. La regulación del relleno de Ca^{2+} se debería al potencial de membrana del lisosoma a través de canales.

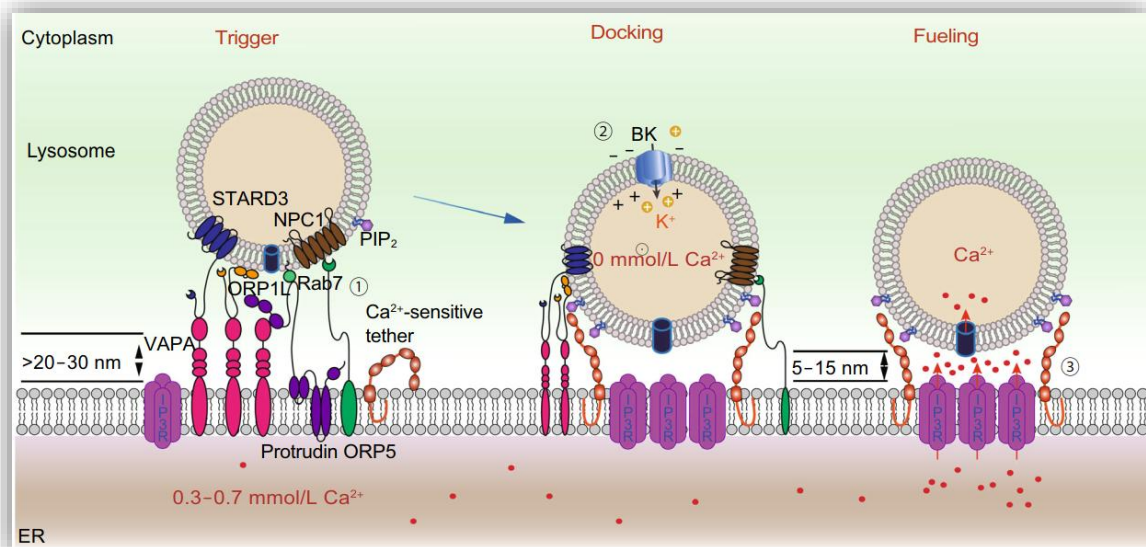


Figura 16. Modelo de tres pasos. Relleno de LE a través de IP_3R del RE. Esquema del modelos de tres pasos propuesta por los autores; de izquierda a derecha: disparo, acoplamiento y relleno o abastecimiento. Este proceso ocurriría en los MCSs comentados en apartados anteriores, en el segundo paso, se reclutarían los IP_3R y por últimos, el Ca^{2+} saldría del RE a través de los IP_3R hacia los lisosomas, entrando por canales de Ca^{2+} . Imagen seleccionada de (Yang et al., 2019a).

1.3.3. Salida de Ca^{2+} del endolisosoma. Canales de Ca^{2+}

En el caso de los endolisosomas hay características diferentes a las de RE o Golgi, ya que en condiciones fisiológicas las señales que activan los canales de Ca^{2+} presentes en los lisosomas sólo activan a un subconjunto de lisosomas, no a todos. Además, la liberación de Ca^{2+} puede no ser sincronizada, de forma que los resultados pueden no notarse en el citosol. Esto no le resta importancia a la funcionalidad de la liberación de Ca^{2+} local, que

puede ser suficiente para la fusión, fisión, etc. por otro lado, la liberación sincronizada, presente en algunos casos, podría ser debida a una amplificación por parte del RE (no se sabe si ocurre en condiciones fisiológicas) (Yang *et al.*, 2019a).

TRPMLs

Los TRPMLs (de las siglas en inglés: *Transient Receptor Potential Mucolipin Channels*), también conocidos como MCOLN1–3, es un receptor de la familia de las mucolipinas (ML). Los de tipo 1 se encuentran en todos los tipos celulares de células mamíferas; y los de tipo 2 y el 3 se encuentran en tipos celulares especiales. Los TRPMLs son bastante relevantes para las células ya que no sólo podría mediar la fusión, mediante liberación de Ca^{2+} , sino que también parecen estar implicados en la exocitosis. La localización de los TRPMLs según el tipo es (Patel and Docampo, 2010):

- TRPML1: localizado en endosomas tardíos y lisosomas.
- TRPML2: el endosomas reciclados, endosomas tardíos/lisosomas y en membrana plasmática.
- TRPML3: en retículo endoplasmático y membrana plasmática.

TRPML1 es el principal canal de Ca^{2+} de los lisosomas (Shen *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2017), y la liberación de Ca^{2+} podría estar involucrada en exocitosis, autofagia y reparación de membrana entre otras funciones (Yang *et al.*, 2019a). Es un canal catiónico permeable a Ca^{2+} (tanto de entrada como de salida del ion (Kilpatrick *et al.*, 2016)) no selectivo (también permea Fe^{2+} , Zn^{2+} , K^+ y Na^+ pero impermeable a H^+). Genera corrientes potenciadas por bajo pH luminal (Wang *et al.*, 2014a). Su estructura es de 6 cadenas transmembranales (**Figura 17**). De S1 a S4 forman un dominio sensible a voltaje, S5 y S6 forman el poro. La zona N-terminal une a clatrina (que lleva a la proteína desde TNG a endosomas) y la zona C-terminal une a AP2 (que lleva a la proteína desde la MP hacia los endolisosomas). La estructura de TRPML1 cambia según la de su ligando. Sus ligandos son ML-SA1 (Mucolipin Synthetic Agonist 1) y $\text{PI}(3,5)\text{P}_2$, su antagonista es ML-SI1 y 3 (sintéticos) y $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$. La mutación de TRPML1 genera MLIV lo que lo hace un objeto de estudio terapéutico atractivo y útil (Peng, Wong and Krainc, 2020; Kilpatrick *et al.*, 2016). Además, están potencialmente implicados en enfermedades como Alzheimer o Huntington (Xu and Ren, 2015). La principal localización se encuentra en endolisosomas aunque también se encuentra en menor concentración en EE y en MP, y colocaliza principalmente con LAMP1 aunque también lo hace con LAMP2 y 3 (Wang *et al.*, 2014a).

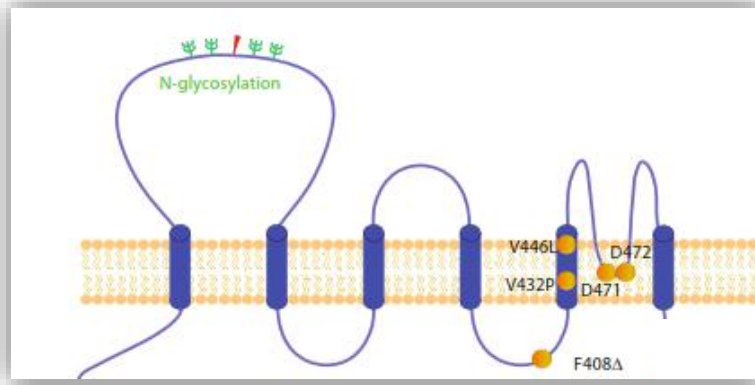


Figura 17. Estructura de TRPML1. Esquema de la estructura de TRPML1 con 6 cadenas transmembranales. Cadena amino terminal a la izquierda y carboxilo terminal a la derecha. De izquierda a derecha se observa de S1 a S6. Imagen modificada de (Wang et al., 2014a).

mTORC1 se regula por el Ca^{2+} liberado por el canal TRPML1 de los endosomas. Una vez liberado el ion seguramente se une a calmodulina (CaM) local (Luzio, Bright and Pryor, 2007), que estimulará a mTORC1 y su actividad kinasa. Por otro lado, la regulación por TRPML1 de mTORC1 y de la autofagia, parecen eventos independientes (Li *et al.*, 2016). La liberación de Ca^{2+} desde los TRPML1 regula el tamaño de los lisosomas por actividad de mTORC1, ya que la activación de TRPML1-CaM dispara la fisión mientras que P2x4-CaM inicia la fusión. Según los autores, la activación de una vía u otra depende del pH, que cambia según el reclutamiento de V-ATPasa para la fisión (activando TRPML1). Según estos autores habría subpoblaciones de lisosomas con diferente pH según las necesidades (Yang *et al.*, 2019b). Por otro lado, mTORC1 parece estar relacionado con la plasticidad sináptica (Sun *et al.*, 2022).

TRPML1 podría estar implicado en un CICR con RE ya que no hay respuesta de ML-SA1 al bloquear SERCA con Tg (100 μM) e IP3R con 2-APB. Usaron como estímulo 20 μM de ML-SA1 en células HeLa y midieron en citosol (Kilpatrick *et al.*, 2016).

La inanición induce liberación de Ca^{2+} desde endolisosomas a través de TRPML1 (otros autores demuestran la activación desde MP, RE y desde mitocondria vía detección de especies reactivas de oxígeno por TRPML1 (Zhang *et al.*, 2016)), lo que genera la translocación nuclear de TFEB por activación de calcineurina local, en HeLa y HEK293. La sobreexpresión de TRPML1 incrementa la activación de TFEB, mientras que la sobreexpresión de TFEB también incrementa el efecto de TRPML1 generándose un feedback. Finalmente la sobreexpresión de TRPML1 aumenta significativamente los niveles de marcadores de autofagosomas (LC3) (Medina and Ballabio, 2015).

TPCs

TPCs (de las siglas en inglés: Two Pore Channels), podría estar implicado en el potencial de membrana (según los autores que informan sobre su especificidad por el Na^+). El NAADP (fosfato de dinucleótido de adenina de ácido nicotínico) usado en laboratorio está considerado como un agonista, y no es permeable. Este agonista también produce respuesta en otros orgánulos, se conoce debido a medidas indirectas en modelos KO para este canal (Patel and Docampo, 2010). El NAADP fisiológico se genera por estímulos externos, la síntesis seguramente sea extracelular y luego deberá ingresar en la célula, ya sea por difusión o por transporte. La reacción podría ser: ácido nicotínico más NADP dan lugar por acción de ARC/CD38 a NAADP y nicotinamida, teóricamente podría haber muchas rutas de síntesis diferentes. La estructura de los TPCs es parecida a la de los canales de Na^+ y Ca^{2+} dependientes de voltaje. En plantas se localizan en vacuolas. Probablemente sirvan como sensores de voltaje. Poseen un par de manos EF. Se conoce poco sobre los TPCs de animales (Patel and Docampo, 2010). También se ha descrito que podría tener implicación en CICR entre RE y LE (Morgan *et al.*, 2011).

Existe diferentes tipos de TPCs. TPC1 está codificado por TPCN1 y TPC2. Expresados en membranas de endosomas y lisosomas. Algunos autores dicen que son selectivos de Na^+ pero en otros laboratorios se ha detectado que se promueve la liberación de Ca^{2+} desde los lisosomas. El NAADP se une a proteínas indefinidas en células KO para TPC. NAADP puede activar corrientes en lisosomas. La esfingosina (inhibidor de kinasa c) libera Ca^{2+} desde TPC1, aunque aún no se ha confirmado directamente (Yang *et al.*, 2019a).

IP3R y RyR

Receptores de IP3 (IP3R) y de rianodina (RyR) son estimulados por IP3 y por Ca^{2+} respectivamente. El Ca^{2+} inducido por IP3 se ha encontrado en células secretoras de varios tipos celulares; en lisosomas (Haller *et al.*, 1996) y en caveolas (Fujimoto *et al.*, 1992), RyR se ha encontrado en vesículas de células beta pancreáticas. Por tanto, pueden liberar Ca^{2+} desde almacenamientos acídicos (Patel and Docampo, 2010).

P2X4

Se encuentra en los lisosomas y endosomas y está implicado en la fusión mediante el Ca^{2+} , en concreto parece que la unión entre P2x4-CaM inicia la fusión (Yang *et al.*, 2019b). Además puede funcionar como receptor intracelular del ATP extracelular (Murrell-Lagnado and Frick, 2019) y podría actuar como canal de Ca^{2+} acoplado a RE (Kilpatrick *et al.*, 2016). También se encuentra localizado en vacuolas contráctiles y está relacionado con la osmorregulación (Patel and Docampo, 2010).

Otros canales de calcio

Podrían existir otros canales de calcio relacionados con LE o lisosomas, por ejemplo P2X7R alcaliniza los lisosomas en cultivos por contacto con ATP y además aumenta el calcio citosólico (Guha *et al.*, 2013).

1.4. Medidas de Ca^{2+} en los endosomas y compartimentos ácidos

1.4.1. Primeras medidas de Ca^{2+} en endosomas y lisosomas

El estudio del Ca^{2+} en endolisosomas aumentó gracias al descubrimiento de NAADP. Los huevos de erizo fueron el primer modelo en el que se descubrió la capacidad de IP_3 para provocar elevaciones de Ca^{2+} intracelular, y poco después, en 1984 Lee y colaboradores descubrieron, en homogeneizados de erizo de mar, que dos metabolitos de nucleótidos de piridina liberaban calcio: NAD^+ and NADP^+ . Investigaron su posible rol en el transporte de Ca^{2+} en organelas ácidas, descubriendo que la liberación no dependía ni de los receptores de IP_3 ni de los de RyR, pero sí de VGCCs (siglas del inglés: *voltage-gate Ca^{2+} channels*) (Clapper and Lee, 1985). Lo más interesante fue que liberaban NAADP de poblaciones diferentes a las sensibles a IP_3 y que la inhibición de SERCA inhibía la liberación de IP_3 pero no la de NAADP (Morgan *et al.*, 2011). En esta época no se conocía que NAAD activaba los canales TPCs. En un principio, se pensó que activaría los TRPML1 que fueron los primeros canales de Ca^{2+} descubiertos en lisosomas y además tenían capacidad para generar corrientes iónicas (Luzio, Pryor and Bright, 2007).

Otro momento importante en el estudio del Ca^{2+} en endolisosomas fue la primera evidencia de que la fusión de los endosomas y lisosomas, con otras membranas en la vía endocítica, dependía del Ca^{2+} , y que el aumento de éste era posterior a la formación del complejo SNARE. Con este descubrimiento Peter y Mayer publicaron en 1998 un artículo en Nature en el que se demostraba que la fusión se inhibía con BAPTA (*1,2-bis-(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetra-acetic acid*) y no con EGTA (*Ethylene Glycol Tetraacetic Acid*) (Peters and Mayer, 1998). Ambos son quelantes de Ca^{2+} pero se diferencian en su afinidad por el ion, lo que hace que BAPTA sea 100 veces más rápido que EGTA, pero la cantidad de Ca^{2+} que quelan es la misma. Esta diferencia permite distinguir la velocidad de captación del ion, y por tanto, la distancia entre el sitio en el que se libera el Ca^{2+} y el lugar de la fusión que puede ser de entre 20-100 nm (Luzio, Bright and Pryor, 2007).

Se han utilizado diferentes indicadores para medir el Ca^{2+} en los orgánulos ácidos a pesar de que, como se verá en el siguiente punto, las medidas pueden verse alteradas por el pH luminal (**Tabla 3**).

Tabla 3. Indicadores de Ca^{2+} utilizados clásicamente en los orgánulos ácidos

Orgánulo	Indicador	Modo	Afinidad (K_d)	pKa	Rango de pH
Endosoma	Fura-2 dextrano	Fluorescencia	$\sim 20 \mu\text{M}$		pH 5.5
	Oregon Green 488 BAPTA-5N (salt)	Fluorescencia	$20 \mu\text{M}$		>pH 6
	Oregon Green 488 BAPTA-5N	Fluorescencia	$37 \mu\text{M}$		pH 5.9
	Fura-2 dextrano	Fluorescencia	$\sim 200 \mu\text{M}$	55.3	pH 4.5
Lisosomas	Oregon Green BAPTA-1 dextrano	Fluorescencia	$\sim 500 \mu\text{M}$	μM	pH 4.5
	Rhod dextrano (baja afinidad)	Fluorescencia	$690 \mu\text{M}$		pH 4.5
	Calcium orange-5N	Fluorescencia	$20 \mu\text{M}$		
Gránulos secretores	Mag-fura-red	Fluorescencia	$17 \mu\text{M}$		
	Fluo-4	Fluorescencia			
	VAMP2-mut.aequorin	Luminiscencia	10^{-7} - 10^{-4}		pH 5.5-6

**Tabla modificada de (Morgan, Davis and Galione, 2015)

1.4.2. Problemas en la medida de la $[\text{Ca}^{2+}]$ lisosomal hasta el momento: GECIs fluorescentes

Las medidas de Ca^{2+} en compartimentos vacuolares ácidos de células vivas son complejas debido al pH ácido (Christensen, Myers and Swanson, 2002; KA, JT and JA, 2002; Morgan, Davis and Galione, 2015). La dificultad radica en la calibración de sondas fluorescentes para medir Ca^{2+} , especialmente las relacionadas con BAPTA, que requieren conocimiento, por un lado, sobre el pH del orgánulo, y por otro lado, sobre la dependencia a pH que tienen las sondas con respecto a su afinidad por el Ca^{2+} (es decir, sobre la k_d de la sonda). Debido a esto, las primeras medidas de Ca^{2+} luminal del lisosoma in vivo se realizaron en 2002 (Christensen, Myers and Swanson, 2002) y los resultados fueron consistentes con medidas indirectas anteriores (Haller *et al.*, 1996). Como hemos comentado anteriormente estas medidas directas fueron no dirigidas, se utilizó la endocitosis de un coctel de marcadores de pH y de Ca^{2+} . En este estudio se determinó la relación entre pH y k_d de la sonda a un pH entre 4 y 7, y el resultado fue que las dos sondas utilizadas para medir los cambios de Ca^{2+} en este estudio: tanto furaDX (las siglas de Fura-2-dextran)

como OGBDx (Oregon green BAPTA-1 dextran) fueron similares a las descritas para BAPTA, por lo que se utilizó BAPTA para calibrar sus medidas. Otro problema para las medidas en el lumen de los endosomas y lisosomas es la medida de la sonda, ya que son orgánulos pequeños, de forma que sondas de mayor tamaño como las FRET no pueden interiorizarse bien (Albrecht et al., 2015)

Hoy en día existen varias herramientas capaces de medir Ca^{2+} en los endolisosomas, endosomas y lisosomas de forma dirigida. En el primer caso la sonda se basa en una proteína SNARE denominada VAMP7 (o tiVAMP) que se encuentra en la vía endocítica. Esta herramienta es capaz de medir Ca^{2+} en el lumen de los orgánulos. Los autores aseguran que son capaces de medir principalmente en los LE pero también en los EE, ya que encuentran colocalización por microscopía electrónica entre VAMP7 con Rab7 y Rab5 respectivamente (Albrecht *et al.*, 2015). El problema de este sensor es que no puede medir cambios rápidos de Ca^{2+} . Utilizan GEM-GECO1 que les permite la emisión ratiométrica: azul y verde en un rango dinámico alto (de 11% in vitro). Es relativamente insensible al pH ya que mantiene el 50% del rango máximo a pH 6.1, y debido a esto, consideran que su herramienta es apta para medir Ca^{2+} en lisosoma en células vivas. Hacen medidas semicuantitativas combinando GEM-GECO con un biosensor de pH mKeima para calibrar y corregir el pH. Además en su estudio hacen una estimación de la concentración de Ca^{2+} basal. Los datos de la medida semicuatitativa de Ca^{2+} en el lumen del lisosoma es de unos 2 μM , que es un dato mucho menor al estimado en los estudios clásicos mencionados. Estos autores plantean que su sensor no pudo medir la concentración de Ca^{2+} durante la internalización del endosoma, seguramente por lo rápido q se produce o por la saturación del sensor, y añaden que la heterogeneidad de la concentración de Ca^{2+} podría deberse a la maduración y acidificación de la organela. El sensor permite la medida de Ca^{2+} en endosomas únicos.

Existe otra herramienta capaz de medir cambios de Ca^{2+} procedentes de endosomas y lisosomas, pero estos cambios tienen que proceder específicamente de la cara citosólica del canal TRPML1, no mide en el lumen (**Figura 18**) (Garrity *et al.*, 2016). Se generaron líneas estables HEK293T que contenían la sonda y comprobaron su localización demostrando colocalización con lisotraker y utilizando ML-SA1 como estímulo específico para endosomas y lisosomas. El gran problema de este sensor es que es un indicador de alta afinidad por Ca^{2+} así que no está claro cómo podría diferenciar entre el Ca^{2+} citosólico general y el local, el que sale o entra del orgánulo. Las conclusiones fisiológicas generadas con esta herramienta son: El lisosoma se rellena seguramente a través del IP3R del ER y no por gradiente de protones; el transportador de Ca^{2+} del lisosoma debería ser de baja afinidad y no de alta; la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{lisosomal}}$ debe encontrarse entre 100-500 μM ; la liberación de Ca^{2+} lisosomal aumenta poco el Ca^{2+} citosólico (20-40nM); los tampones de Ca^{2+} unen mejor a pH neutro por lo que no es posible una calibración precisa en el lisosoma; el uso de GPN (por las siglas del inglés: de Glycyl-L-phenylalanine 2-naphthylamide), BafA1 y NAADP deben utilizarse con precaución ya que bajan el pH del citosol pudiendo afectar la

afinidad por Ca^{2+} de la sonda; proponen BAPTA-AM como control y abogan por una posible relación en la salida del Ca^{2+} de IP3R con canales de Ca^{2+} , según los resultados con IP3R-KO.

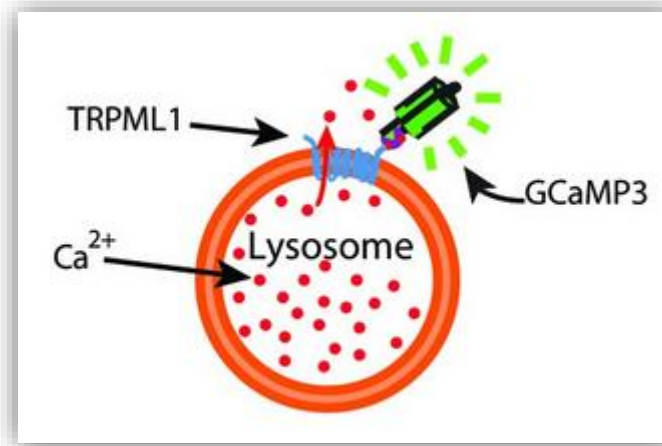


Figura 18. Sensor de Ca^{2+} GCaMP3. Esquema de la localización y sentido de la sonda de Ca^{2+} GCaMP3, localizada en el canal de TRPML1 con capacidad para medir en la zona citosólica cuando hay calcio en el citosol. Imagen seleccionada de (Garritty et al., 2016)

Se ha descubierto que las GFP también son dependientes a pH, lo que hace que pierdan su estabilidad a pH menores de 6.5, lo que no les permite medir en la vía endocítica, ya que sufre cambios estructurales a pH 5.5 comprobados por cristalografía (Saeed and Ashraf, 2009). Esto es un problema añadido para el sensor de fluorescencia. Sin embargo, los sensores de Ca^{2+} basados en bioluminiscencia son potencialmente ventajosos, ya que son menos sensibles a las variaciones de pH que las sondas de fluorescencia (Mitchell *et al.*, 2001).

En el caso de los sensores basados en bioluminiscencia, las aequorinas pueden dirigirse al orgánulo deseado y medir los cambios de Ca^{2+} de forma cuantitativa. Además, la afinidad por el Ca^{2+} puede variarse según la necesidad y las características del orgánulo objetivo. Por tanto, en el caso de demostrar su capacidad para medir a un pH similar a algún orgánulo ácido de la vía endocítica, podría ser mejor opción que las herramientas comentadas hasta el momento.

1.4.3. Posibilidades: GECIs bioluminiscentes y Aequorina como herramienta de medida

Los GECIs (de las siglas en inglés: *Genetically Encoded Calcium Indicators*) son proteínas con la capacidad de alterar sus propiedades lumínicas al contacto con el Ca^{2+} . Pueden dirigirse a diferentes localizaciones celulares y medir los cambios de Ca^{2+} incluso en el

lumen de los orgánulos. Los GECIs pueden dividirse en dos grandes grupos: los bioluminiscentes y los fluorescentes.

Nos centraremos en los GECIs bioluminiscentes. Algunos animales tienen la capacidad de generar proteínas bioluminiscentes de forma fisiológica, y la medusa *Aequorea Victoria* (**Figura 19 A**) es una de ellos. La Aequorina es una fotoproteína GECI procedente de los fotocitos del anillo periférico de la campana de la medusa *Aequorea*. Fue la primera proteína con la que se midió la concentración de Ca^{2+} citosólico en las fibras del percebe (Ridgway and Ashley, 1967) y en el axón gigante del calamar Baker (Baker, Hodgkin and Ridgway, 1971). El clonaje de su DNA ocurrió en 1985 permitiendo su síntesis y disminuyendo la pesca de las medusas para investigación (Inouye *et al.*, 1985; Prasher, McCann and Cormier, 1985). La Aequorina es una estructura terciaria globular (**Figura 19 B**) con 8 hélices α contenidas en 4 manos EF con un tamaño de 21.5 kDa (Head *et al.*, 2000). La primera y la tercera mano EF, son de alta afinidad por el Ca^{2+} , la segunda es no funcional, y la cuarta tiene 20 veces menos afinidad por el Ca^{2+} que las primera y tercera; además la Aequorina tiene un grupo prostético formado por celenteracina (**Figura 19 C**) (Toma *et al.*, 2005).

Durante la reacción cada mano EF se une a un ion calcio (todas excepto la segunda mano) en presencia de O_2 y celenteracina, entonces la Aequorina sufre un cambio conformacional y oxida celenteracina en celenteramida, generando luz a 470nm (que es la que se mide) y CO_2 (**Figura 19 D**) (Morise *et al.*, 1974; Shimomura and Johnson, 1978). Se han sintetizado diferentes celenteracinas para alterar la afinidad por el Ca^{2+} y la emisión de bioluminiscencia, la más utilizada es la celenteracina de tipo n que tiene 50 veces menos afinidad por el Ca^{2+} que la silvestre (Shimomura, Musicki and Kishi, 1989).

La Aequorina reconstituida con celenteracina de tipo silvestre tiene una alta afinidad por Ca^{2+} , con una K_d de unos 500 nM, adecuada para medir Ca^{2+} en citosol o núcleo, que tienen una $[\text{Ca}^{2+}]$ basal en torno a 100 nM. La Aequorina con la mutación D119A en la tercera mano EF (unas de las de mayor afinidad) junto con la celenteracina n reduce la afinidad por el Ca^{2+} unas 1000 veces, por lo que es adecuada para medir, por ejemplo en RE, con una concentración de 500 μM . Una vez conseguida la afinidad deseada las Aequorinas pueden dirigirse a unos orgánulos u otros utilizando péptidos de direccionalidad mediante ingeniería genética. Por ejemplo se usaría KDEL en el extremo C-terminal de la aequorina para el RE. Fisiológicamente, cualquier partícula soluble que contenga la secuencia KDEL en una vesícula de transporte retrógrado (recubierta por COPI) será captada por su receptor de KDEL y reclutada al lumen del RE. Este receptor tiene más afinidad en el Golgi que en el RE para que pueda añadirse al lumen del RE a pesar de su alta concentración. En este sentido, durante la tesis se ha utilizado el péptido VAMP7, al igual que los autores Albrecht y colaboradores, pero con nuestra sonda podemos mejorar los siguientes puntos:

- Los endosomas únicos son estructuras pequeñas que tienen baja señal-ruido para medidas únicas. En nuestro caso este problema no existiría ya que no

medimos en célula única sino en pocillos con 80-100 mil células sin tener que fijarnos en cada una por separado.

- Nuestro sistema es capaz de medir cambios rápidos de Ca^{2+} y en el rango de medida de los endolisosomas, sólo necesitamos comprobar su resistencia a pHs ácidos para cerciorarnos de su capacidad de medida en los orgánulos ácidos.

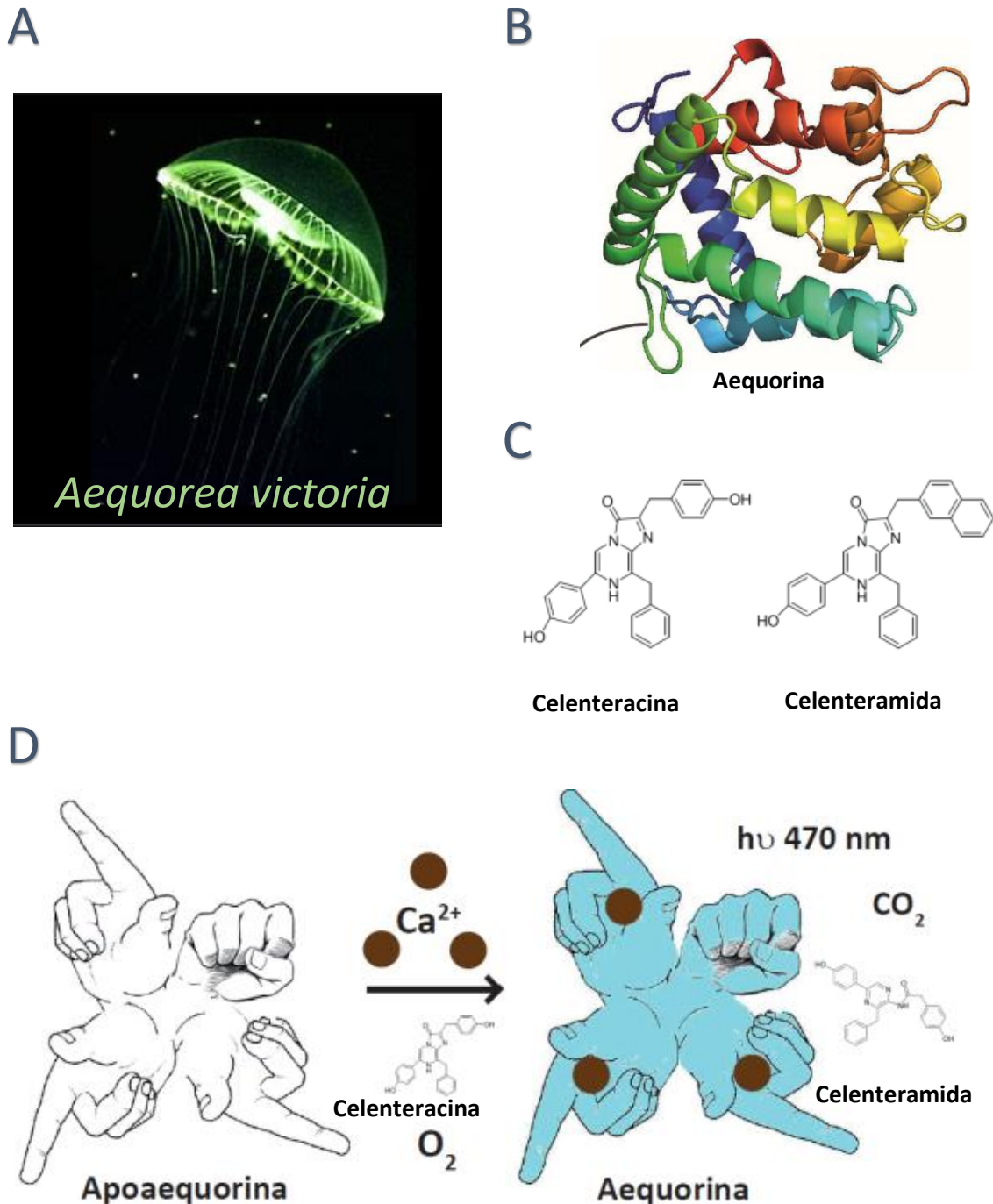


Figura 19. Aequorina: estructura y reacción química. (A) Imagen de Aequorea Victoria, medusa de la que procede la Aequorina (imagen obtenida de <https://fotosuba.blogspot.com/2011/05/la-medusa-y-su-proteina-verde.html>) (B) Estructura de la Aequorina. Imagen seleccionada de (Head et al., 2000). (C)

Fórmula estructural del cofactor de la Aequorina: celenteracina, que tras la reacción química se oxida a Celenteramida. **(D)** Esquema de la reacción química que sufre la Apoequorina en presencia de Ca^{2+} , celenteracina y O_2 , dando lugar a Aequorina, Celenteramida, CO_2 y luz azul a 470 nm. Imágenes C y D seleccionadas de (Martín *et al.*, 2016).

Luminómetro

Las medidas de luz azul se cuantifican gracias al luminómetro. El luminómetro construido ad-hoc por Cairn Research Ltd. (Faversham, Reino Unido) (**Figura 20**) es una caja negra que contiene una cámara y un fotomultiplicador o fototubo, y además, el sistema está adaptado para permitir un flujo constante mediante un controlador de válvulas que permite cambiar la perfusión de una solución a otra. El fotomultiplicador multiplica los fotones, y un espejo situado sobre las muestras minimiza la pérdida de fotones, y después se transforman en electrones y por tanto en mV. Mediante un convertidor analógico digital la información pasa a analógica y se analiza mediante un programa informático. El paso de transformación de cuentas/s a Ca^{2+} /s se hace mediante la calibración, para lo que es necesario conocer la bioluminiscencia total o máxima que hay en las células del experimento. El dato de bioluminiscencia máximo o total de cuentas se consigue lisando las células con digitonina (Dig) y utilizando Ca^{2+} saturante. Una concentración alta de Dig, de unos 100 μM , permite el acceso del Ca^{2+} a todas las Aequorinas de la célula, y su consumo.

Ventajas de las Aequorinas:

- Especificidad subcelular
- Amplio rango dinámico (se puede medir desde 100nM hasta μM)
- Afinidad variable por Ca^{2+}
- Medidas de heterogeneidad de $[\text{Ca}^{2+}]$

Desventajas de las Aequorinas:

- Bajo nivel de luz (el quantum de fotones es bajo)
- Consumo de la Aequorina

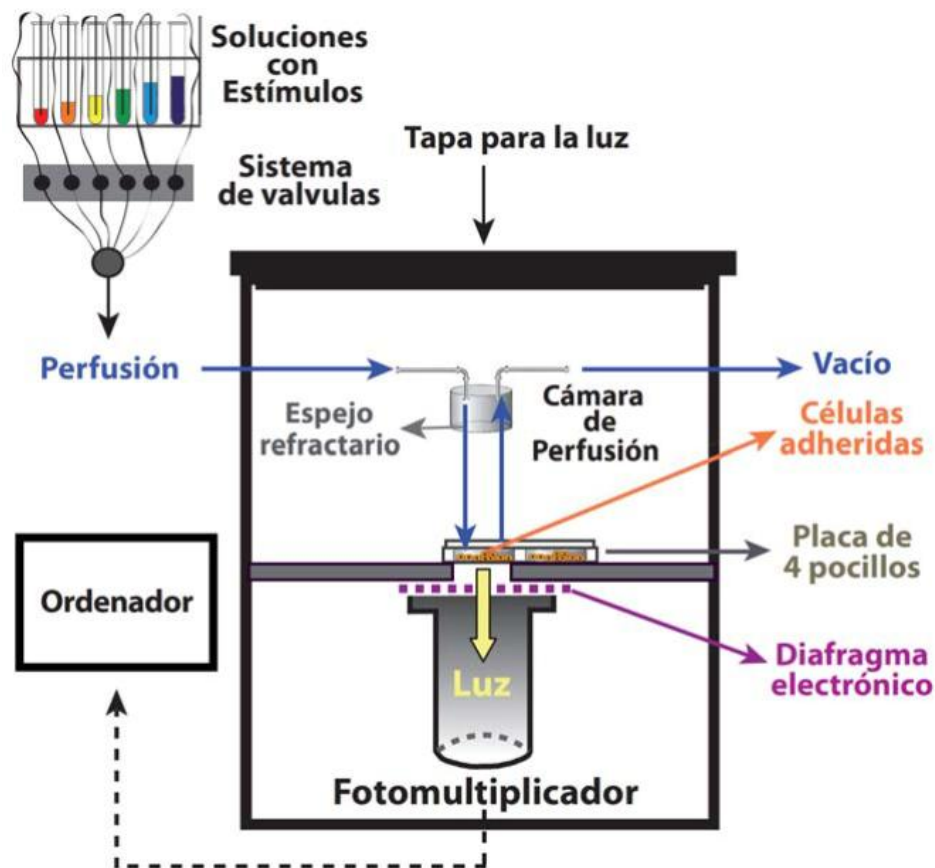


Figura 20. Luminómetro utilizado para medir bioluminiscencia en poblaciones celulares. Esquema de luminómetro. La solución pasa a través del colector de válvulas hacia el pocillo donde se encuentran adheridas las células, pasa por la cámara de perfusión (equipada con un espejo refractario, la perfusión por la que pasa la solución y el vacío por el que ésta sale). Entonces, la luz que emiten las Aequorinas se proyecta y compacta (gracias al espejo refractario y al diafragma) hacia la zona del fotomultiplicador, y finalmente, se envía la señal al ordenador. Imagen seleccionada de (Alonso et al., 2017).

Calibración

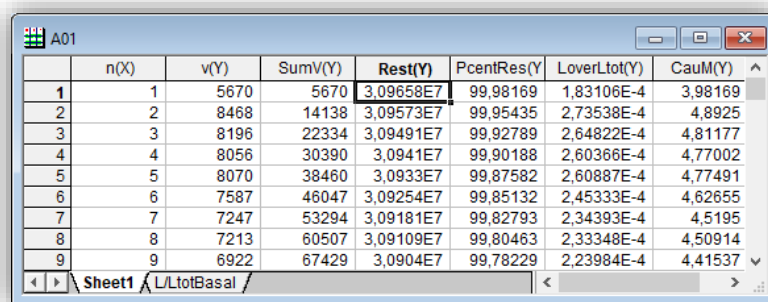
La calibración de las sondas permite transformar luminiscencia en $[Ca^{2+}]$ y comparar unos experimentos con otros. La curva de calibración es la representación de la variable independiente en el eje X (la variable que controlamos durante la calibración): $\log [Ca^{2+}]$, frente a la variable dependiente: L / L_{total} ; donde L es la luminiscencia por segundo y L_{total} es la integral de luminiscencia que va desde el momento en que se comienza a medir hasta el final del experimento. La aequorina se va consumiendo progresivamente, por lo que el valor de L_{total} decrece a lo largo del experimento. L / L_{total} es la fracción de luminiscencia total de la muestra registrada en un segundo. La cantidad de luminiscencia total (L_{total}) se consigue lisando la célula (Dig 100 μM , 1 min) y añadiendo una $[Ca^{2+}]$ saturante de 10 mM.

Los experimentos pueden compararse unos con otros ya que la calibración es independiente de la cantidad de aequorinas reconstituida en la muestra (Alvarez and Montero, 2002).

La calibración de luminiscencia es completamente diferente a la de fluorescencia, por ejemplo:

- Un nivel constante de L implica un aumento continuo de L/L_{total} (ya que L_{total} , como se ha comentado anteriormente, disminuye con el paso del tiempo) y por tanto implicaría un aumento continuo de $[Ca^{2+}]$.
- Si la $[Ca^{2+}]$ es constante requiere que L/L_{total} sea constante, es decir, que la L disminuya exponencialmente (al igual que L_{total}).

La medida de la luminiscencia en crudo (la columna $V(n)$ **Figura 21**) se almacena en carpetas del ordenador: los datos se muestrean cada 50 ms (por el programa *AcquisitionEngine* (*Modular Data Acquisition, versión 1.1.7, Cairn research*)), luego otro programa (el generado en nuestro laboratorio por García Sancho y que conocemos como el *QuickBasic*) los promedia de 20 en 20 dando lugar a una frecuencia de 1 S^{-1} , el mismo programa le resta el fondo (o *background*) a los datos y calcula L/L_{total} (también con el fondo restado). En cada momento del experimento la columna L/L_{total} se genera de la división $V(n)/\text{Rest}$ en cada momento del tiempo. Finalmente, los datos se vuelcan en el programa *OriginPro8* y se generan las gráficas.



	n(X)	v(Y)	SumV(Y)	Rest(Y)	PcentRes(Y)	LoverLtot(Y)	CauM(Y)
1	1	5670	5670	3,09658E7	99,98169	1,83106E-4	3,98169
2	2	8468	14138	3,09573E7	99,95435	2,73538E-4	4,8925
3	3	8196	22334	3,09491E7	99,92789	2,64822E-4	4,81177
4	4	8056	30390	3,0941E7	99,90188	2,60366E-4	4,77002
5	5	8070	38460	3,0933E7	99,87582	2,60887E-4	4,77491
6	6	7587	46047	3,09254E7	99,85132	2,45333E-4	4,62655
7	7	7247	53294	3,09181E7	99,82793	2,34393E-4	4,5195
8	8	7213	60507	3,09109E7	99,80463	2,33348E-4	4,50914
9	9	6922	67429	3,0904E7	99,78229	2,23984E-4	4,41537

Figura 21. Tabla generada con OriginPro8 al volcar los datos del programa programado por el Doctor García Sancho con QuickBasic.

En nuestro caso, la calibración de Ca^{2+} con ELGA1 no se generó de forma automática (como en la última columna de la **Figura 21**), se utilizaron cálculos (tiempo medio multiplicado por un coeficiente de 1.49), para aproximar cada gráfica L/L_{total} , y un medidor generado a partir de la curva de calibración para el Ca^{2+} .

1.5. Fisiopatología relacionada con los endosomas tardíos y lisosomas

Las enfermedades de almacenamiento lisosomal (LSD de las siglas en inglés: *Lysosomal Storage Diseases*) son causadas o bien por la mutación de hidrolasas y de proteínas de membrana lisosómicas, o bien por el impedimento del tráfico de lípidos. Estas enfermedades conducen hacia una eliminación defectuosa del cargo y a enfermedades como MLIV y Niemann-Pick (NCP) (Pascua-Maestro *et al.*, 2020; Samie and Xu, 2014; Vergarajauregui *et al.*, 2008). MLIV desemboca en problemas neuronales y oftalmológicas por mutación de TRPML1, los autores han detectado en células de pacientes la acumulación de autofagosoma de nueva formación al retrasarse su fusión con los lisosomas (Vergarajauregui *et al.*, 2008); y como sabemos, TRPML1 está relacionada con la salida del Ca^{2+} desde los endolisosomas. Con respecto a NCP de tipo C1 (que es una enfermedad neurodegenerativa) se conoce, por el estudio de Lloyd-Evans y colaboradores, que se produce el almacenamiento de esfingosina en el compartimento ácido. Esto provoca el agotamiento de Ca^{2+} en su lumen, que resulta en el almacenamiento de colesterol, esfingomielina y glicoesfingolípidos. Esta falta de Ca^{2+} podría hacer que no quedara suficiente cantidad para llevar a cabo la fusión y el tráfico de la vía endocítica (Lloyd-Evans *et al.*, 2008). El estudio de Samie y Xu sugiere provocar la exocitosis para acabar con el material almacenado, lo que podría conseguirse estimulando los canales TRPML1 con ML-SA1 (Samie and Xu, 2014). Aunque esta acción no sería posible en MLIV (porque estos canales están mutados), quizás sería interesante para la NCPC1.

Por otro lado, los endolisosomas también se relacionan con enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica en la que el Ca^{2+} (de RE, mitocondria y lisosomas) provoca pérdida neuronal (Tedeschi, Petrozziello and Secondo, 2019). En ambos casos, se relaciona la salida de Ca^{2+} desde lisosoma con problemas con la autofagia, y con la capacidad de TRPML1 para regular la translocación de TFEB al núcleo, lo que impediría la posterior transcripción de genes relacionados con autofagia (Tedeschi, Petrozziello and Secondo, 2019).

1.6. Hipótesis y objetivos

A partir de todos estos conocimientos, la hipótesis de la tesis que se planteó fue “*existen organelas acídicas de alta concentración de Ca^{2+} capaces de liberar el ion ante un estímulo específico*”. Como objetivo principal para validar la hipótesis de esta tesis nos planteamos caracterizar un nuevo sensor de Ca^{2+} capaz de medir cambios en la concentración del ion en compartimentos acídicos; y como objetivos secundarios:

- 1- Determinar en qué compartimentos acídicos es capaz de medir la sonda.
- 2- Describir el mecanismo de relleno de Ca^{2+} en dichas organelas.
- 3- Medir la $[\text{Ca}^{2+}]$ luminal en dichas organelas.
- 4- Estudiar y describir los mecanismos de liberación del ion ante estímulos específicos, y su posible contribución en la señalización intracelular.

02 | MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Construcción genética

El DNAc de VAMP7 de *H. sapiens* se amplificó mediante PCR utilizando cebadores específicos (#324; adelante: 5'-CCAagcttGCCACCATGGCGATTCTTTT-3'; #325; invertido: 5'-ATaagcttTTTCTTCACACAGCTTGGCCATG-3'; los sitios para la inserción de HindIII están en minúsculas). Este fragmento se digirió con HindIII y se insertó corriente arriba del fragmento HindIII que codifica los DNAc de GA o GA1, en el plásmido pHSV que conduce a los plásmidos pHSV-ELGA o pHSV-ELGA1 (**Figura 22**), respectivamente. El gen GA es una fusión de EGFP y aequorina (Manjarrés *et al.*, 2008) que contiene la mutación D119A (Kendall *et al.*, 1992). El gen GA1 es una fusión de GFP (C3) y aequorina que contiene las mutaciones D117A, D119A y D163A (Rodríguez-García *et al.*, 2014). Para la expresión en bacterias, se clonaron DNAc de GA o GA1 en *E. Coli* pET28a. Para las medidas de RE-Ca²⁺ se utilizó el pHSV-erGAP1 (Rodríguez-Prados *et al.*, 2015).

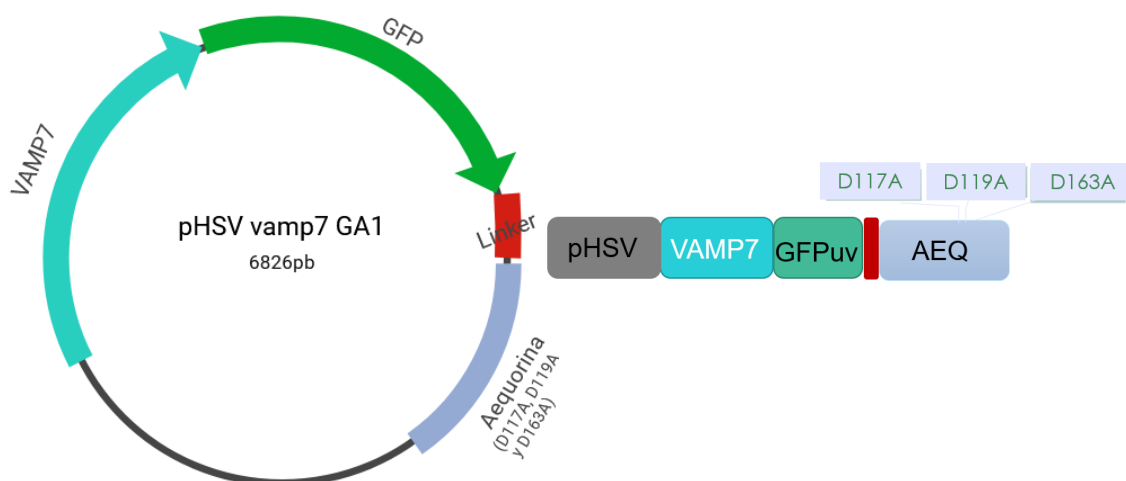


Figura 22. Constructo bioluminiscente de GA1 dirigido con vamp7. VAMP7 (de las siglas en inglés: “Vesicle associated membrane protein”), GFPuv (de las siglas en inglés: “UV-excited green fluorescent protein”), AEQ (Aequorina). Representación del plásmido pHSV de ELGA1 que contiene vamp7 con 660pb, GFP, un linker de unión (entre Aequorina y GFP) y la Aequorina con tres mutaciones. Las digestiones se realizaron con la enzima de restricción HindIII y se ligó el inserto VAMP7 en el vector pHSV-GA1. Se transformó en bacterias *E. coli* DH5α. Con ELGA1 se disminuye la sensibilidad al Ca²⁺ y se consigue aumentar el tiempo de experimentación.

2.2 Producción de virus

La generación de virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) se realizó según el protocolo previamente descrito (Alonso *et al.*, 1998; Lim *et al.*, 1996). Las células 2-2 (Saeki *et al.*, 2001) se sembraron en una placa de 60 mm a una densidad de 5x10⁵ células. A las 24 h se transfectaron los plásmidos pHSV-EL-GAP1 y pHSV-EL-GA utilizando OptiMEM y LipofectAMINE 2000 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La transfección se realizó gota a gota en 2,5 ml de medio DMEM sin suero ni antibióticos.

Tras 5 horas de incubación se sustituyó el medio de transfección por 5 ml de medio DMEM completo (suplementado con suero fetal bovino (FBS de las siglas en inglés: *fetal bovine serum*), penicilina 100 U/ml y estreptomina 100 µg/ml). Tras 24 h de transfección, se reemplazó el medio de cultivo por 3 ml de DMEM fresco con 2% (v/v) de FBS. Inmediatamente después se añadieron 100 µl del virus coadyuvante 5dl1.2, a una concentración aproximada de 6×10^5 pfu (unidades formadoras de placas). Este virus es defectivo en replicación, contiene una delección parcial en el gen IE2 que se complementa en las células 2-2 (McCarthy, McMahan and Schaffer, 1989). Tras 24 h desde la infección, las células adquirieron una morfología redondeada, sin llegar a desprenderse de la placa. En ese momento, las células se lisaron sometiendo a 3 ciclos de congelación-descongelación seguidos de 2 minutos de sonicación a intervalos de 30 segundos. Tras una centrifugación a 1800 g y 4 °C durante 5 min, se recogieron 4 ml del sobrenadante. Se aumentó la cantidad de virus realizando tres ciclos de amplificación, en los que cada 24 h se añadieron los 4 ml a una placa de 100 mm con 2×10^6 células 2-2 sembradas el día anterior, y se repitió el mismo procedimiento descrito de recogida, lisado, sonificado y centrifugado. El sobrenadante obtenido, compuesto por una mezcla de dos tipos de partículas víricas, (el amplicón portador del gen de interés y del virus coadyuvante o auxiliar (del inglés: *helper*)), se alicuotó y se almacenó a -80°C.

2.3 Expresión bacteriana de proteínas GA y GA1

Las sondas GA y GA1 fueron inducidas y extraídas desde bacterias competentes *E.coli* BL21 de Stratagene (se utilizó 100 µl/plásmido), se transformaron con plásmido control pet28a_GAP1 0.93 µg/µL y plásmidos para calibrar: pet28a_GAP1 1.2 µg/µL y pet28a_GAmut 1.8 µg/µL. Se sembraron en placas de agar LB con Kanamicina (40 µg/µL) a una dilución 1:1000.

El minicultivo se realizó con 3 mL de LB líquido y kanamicina (40 µg/µL) a una dilución 1:1000 y se cultivó a 250 rpm y 37°C durante la noche.

El maxicultivo con 49 mL de LB líquido con kanamicina (40 µg/µL; a una dilución 1:1000) se inoculó con 1 mL de minicultivo, se cultivó a 250 rpm y 37° C hasta conseguir una OD de entre 0.6 y 1A a 600 nm (unas 2 horas). Posteriormente, se indujeron con isopropil β-D-tiogalactósido (IPTG) a 0.01 mM y se agitó a 250 rpm y 30° C durante la noche.

La extracción de proteínas se realizó con la centrífuga *Avanti j/20 XP* de *Beckman Coulter* a 600 g y 4° C 30min. La muestra sedimentada se resuspendió en tampón de lisis (**Tabla 4**) con inhibidores de proteasa con EDTA de Roche en una proporción de 1:20. Los inhibidores de proteasas se utilizaron en una proporción de 1:10 con el tampón (pastilla de inhibidores con EDTA en 1mL de H₂O mQ). Las muestras se lisaron mediante sonicación al 30% de potencia durante 10 ciclos de 15 segundos y reposos de 59 segundos, siempre en hielo. El lisado bacteriano se centrifugó a 30.000 g y 4°C durante

10 min, se recogió el sobrenadante, se comprobó la fluorescencia con los ultravioletas y se congelaron rápidamente con nitrógeno líquido en alícuotas de 150 μ L.

Tabla 4 Composición tampón de lisis	
Solución	Concentración final
Tris pH 8.8	20mM
NaCl	150mM
DTT	0.5M
Enrasar con H ₂ O MQ	

Antes de los experimentos y siempre en frío se realizó la determinación de proteínas totales, en espectrofotómetro de cubeta uv-visible *Genesys 50 de Thermo* mediante *Bradford* o en el nanodrop *spectrophotometer ND-1000*, y se obtuvieron unas concentraciones de entre 35 y 86 mg/mL.

Posteriormente, se concentraron las proteínas con el objetivo de utilizar el menor volumen posible en los experimentos de lector de placas, ya que el volumen final fue de 100 μ L (en placas de 96 pocillos). Se utilizaron unidades de filtrado centrífugo (traducción de *centrifugal filter units*, 10K=10⁴ MWCO con referencia 4321 y lote ROJA52921 de Millipore). Se realizaron dos centrifugaciones en serie según instrucciones: una primera con un volumen de 5 mL a 3000 g y 4° C durante 15 min, y la segunda con la muestra ya filtrada durante 10 min. Finalmente, se realizó una purificación de proteínas con el objetivo de maximizar los resultados y el volumen utilizando una resina HisPur Ni-NTA (ThermoFisher, 88222).

2.4 Actividad y calibración de Ca²⁺ a varios pHs de las sondas bioluminiscentes GA y GA1

Las medidas con GA y GA1 se realizaron en el lector de placas de 96 pocillos Tecan Genios Pro con el objetivo de obtener curvas de calibración para los diferentes pHs frente a [Ca²⁺]. Las muestras de los experimentos a pH 6 y 7.2 se reconstituyeron al mismo pH al que se realizaron los experimentos; mientras que las muestras de los experimentos a pH 4.5 se reconstituyeron a pH neutro 7.2. La reconstitución de todas las muestras se realizó en 80 μ L de medio según pH (**Tabla 5**), 1 μ L de EGTA 1 M y 20 μ L de sonda (GA a unos 5 μ g/ μ L y GA1 a 10 μ g/ μ L) por pocillo, durante 15min, en frío y oscuridad. Los experimentos se realizaron a un volumen final de 100 μ L y a diferentes [Ca²⁺] desde 0 (utilizando EGTA 1M), 30, 50, 100 y 300 μ M y 1mM. Las [Ca²⁺] finales se consiguieron al

inyectar un medio Ca^{2+} 1 mM (para cada pH) a diferentes volúmenes, según las concentraciones finales.

Se realizaron experimentos dos días, cada día se utilizaron preparaciones de proteínas diferentes y se realizaron 3 réplicas (de cada pH: 7.2, 6 y 4.5). Los datos se analizaron con programas diseñados según las necesidades del experimento (número de inyectores, pHs y concentraciones) y los resultados se procesaron con Excel.

Tabla 5. Medios para la calibración de calcio a diferentes pHs *

Solución HEPES, MOPS o ACETATO / C_f / MW	Cantidad (g) 100mL de solución
NaCl / 5mM / 58.44	0.03
KCl / 145mM / 74.56	1.08
HEPES pH 7 / 30mM / 238.31	0.71
MOPS pH 6 / 30mM / 209.26	0.63
Acetato pH 4.5 / 20mM /	
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ / 1mM / 203.31	0.02

*Los medios se utilizan con las mismas cantidades de NaCl, KCl y MgCl_2 . El uso de HEPES, MOPS y acetato se utilizó para generar medios a pHs 7,2; 6 o 4,5 respectivamente.

2.5 Cultivo celular y expresión genética

Se utilizó VAMP7 para direccionar las sondas tanto con plásmidos como con virus. VAMP7 es una proteína SNARE de tipo V (es decir, que se encuentra en la vesícula a transportar) que se encuentra principalmente en la vía endocítica, en concreto en LE (Kent *et al.*, 2012), se ha descrito que media el tráfico hacia lisosomas (aunque no en el tráfico de enzimas) (Advani *et al.*, 1999). Además, también se encuentran en el TGN, seguramente en la zona tubular que forma parte de la vía endolisosomal. También está implicado en la fusión de lisosomas con la membrana plasmática (Xu and Ren, 2015), aunque algunos autores describieron con anterioridad el acúmulo en lisosoma de VAMP7 para ser eliminado y no para actuar en la fusión (Advani *et al.*, 1999).

Se realizaron cultivos primarios de astrocitos corticales de ratón. Los astrocitos se aislaron mediante el protocolo descrito anteriormente (Rodríguez-Prados *et al.*, 2020) con la aprobación del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Valladolid (número de referencia de aprobación ética: 10207729). Se utilizaron 5-6 encéfalos de ratones p2 *C57BL/6J Crl* (Charles Rivers). Se separaron las meninges y se fragmentaron y digirieron mecánica y enzimática con papaína. La digestión enzimática se realizó, durante 15 min en baño a 37°C, con *solución salina equilibrada de Hanks* (HBSS de las siglas en inglés: *Hanks' Balanced Salt Solution*) estéril y libre de Ca^{2+} y Mg, a la que se añadió 0,5 mg/mL de papaína, 20 mg/mL de DNasa,

glucosa 10 mM y 0,1 % albúmina sérica bovina (BSA de las siglas en inglés: *bovine serum albumin*). Posteriormente, se realizaron 3 lavados con medio estéril HBSS (sin Ca^{2+} ni Mg^{2+}) a 4°C. Se retiró el medio y se añadió 1 mL de *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado con glutamax 2 mM, glucosa 27 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml y suero de caballo al 10% (v/v) y DNAsa 20 mg/ml. Se realizó una digestión mecánica con 3 pipetas Pasteur estériles de punta esmerilada a diferentes grosores. Finalmente, las células se sembraron en frascos de 75 cm² sin filtro y sin poli-L-lisina 0.01 mg/mL (Sigma, P-1274) usando una dilución de 1:12 en DMEM. El cambio de medio se realizó tras dos horas en incubador a 37°C y con CO₂ al 5%, con DMEM de la marca GIBCO suplementado con un 10% de FBS y penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml. A las 48-72h (al 80% de densidad celular) se levantaron las neuronas y microglía y se eliminaron las burbujas con PBS de la marca GIBCO a 4°C. El medio de cultivo se renovó cada 2-3 días. Los experimentos se llevaron a cabo en las siguiente 3-5 semanas tras dos pases, y en pocillos confluentes con poli-L-lisina 0.01 mg/mL (Sigma, P-1274).

Tabla 6. Líneas celulares

Tipo celular	Procedencia	Características-origen	Mantenimiento	Siembra
HEK293-T	ATCC: CRL-1573	Células embrionarias de riñón humano. Morfología epitelial y crecimiento en cultivo adherente	Medio Esencial Mínimo (MEM) (GIBCO) suplementado con FBS al 10%, estreptomycin 100µg/ml y penicilina 100U/ml	2x10 ⁵ células por pocillo con poli-L-lisina
IP3R nulas HEK293 (HEK-3KO)	Cedidas por el laboratorio de Colin Taylor	Células embrionarias de riñón humano. Su morfología es epitelial y el crecimiento en cultivo es adherente	DMEM/F-12 con GlutaMAX (GIBCO) suplementado con FBS, 10% (Sigma)	2x10 ⁵ células por pocillo con poli-L-lisina
MDCK	ATCC: CCL-34	Riñón de perro. Morfología epitelial	DMEM (Invitrogen) suplementado con FBS al 10%, L-glutamina 2mM, estreptomycin 100µg/ml y penicilina 100U/ml	8x10 ⁴ células por pocillo
HeLa	ATCC: CCL-2	Células de cuello uterino humano (adenocarcinoma). Su morfología es epitelial y el crecimiento en cultivo es adherente	DMEM con GlutaMAX (GIBCO) suplementado con FBS, 10% (Sigma)	8x10 ⁴ células por pocillo
Clon-Hela (tomato)	Generadas en el laboratorio	Fluorescencia de ER en tomato	DMEM con GlutaMAX (GIBCO) suplementado con FBS, 10% (Sigma)	3x10 ⁴ células por pocillo

Las siembras de las líneas celulares (**Tabla 6**) se realizaron 48 h antes del experimento en placas de 4 pocillos con cristal con poli-L-lisina 0.01 mg/mL (Sigma, P-1274) para las células HEK293T y sin poli-L-lisina para las HeLa. Se incubaron 24 h a 37°C y CO₂ al 5% en medio de cultivo. Las infecciones y transfecciones transitorias se realizaron con los plásmido (promotores de baja expresión pHSV-ELGA o pHSV-ELGA1 (**Tabla 7 y Figura 22**)) o el virus de VAMP7. En el caso del virus se utilizaron inóculos de 5 o 10 µL. En las transfecciones se usaron 0.2-0.5 µg. Las cotransfecciones (**Tabla 7**) de ELGA1 y ELGA, se realizaron principalmente con el plásmido de TRPML1. Se utilizó 0.2 µg de VAMP7 (para MDCK 1 µg) y 0.02 µg de TRPML1 en cada pocillo. En el caso de los TPCS fue 0.05 µg. El resto de plásmidos se utilizaron en las cantidades estandarizadas previamente en el laboratorio. En todos los casos se utilizó OptiMEM y LipofectAMINE 2000 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En el caso de los virus se añadió el inóculo sobre los 200 µL del mismo medio de cultivos en el que estuvieron incubadas las células; tras 2 horas de incubación se cambió el medio. Tras 24 h se realizaron los experimentos con las células transfectadas o infectadas.

Tabla 7. Plásmidos utilizados

Localización	DNA	Procedencia	Característica
Endo-lisomas	phsv-vamp7-GA1 (Figura 22)	Generado en el laboratorio por ingeniería genética	Localizador vamp7. Tres mutaciones (D117A, D119A y D163A) para disminuir la sensibilidad al Ca ²⁺ . Sonda principal de la tesis
	phsv-vamp7-GA	Generado en el laboratorio por ingeniería genética	Localizador vamp7. Una mutación (D119A) para disminuir la sensibilidad al Ca ²⁺ . Uso en experimentos de colocalización y experimentos preliminares.
	pEGFPC1-TRPML1	Cedido por Patel (UCL, Londres, UK)	Sobreexpresión del canal TRPML1. Uso en experimentos de bioluminiscencia de Ca ²⁺
	pEGFP-C1-TRPML1-D471K	Cedido por Patel (UCL, Londres, UK)	Canal mutado de TRPML con poro de Ca ²⁺ no conductor. Uso en experimentos de bioluminiscencia de Ca ²⁺
	pCS2-TPC1	Cedido por Patel (UCL, Londres, UK)	Sobreexpresión del canal TPC1 . Uso en experimentos de bioluminiscencia de Ca ²⁺
	pCS2-TPC2	Cedido por Patel (UCL, Londres, UK)	Sobreexpresión del canal TPC2. Uso en experimentos de bioluminiscencia de Ca ²⁺
	pCS2-Δ/TPC2	Cedido por Patel (UCL, Londres, UK)	Canal mutado de TPC2 con poro de Ca ²⁺ no conductor. Uso en experimentos de bioluminiscencia de Ca ²⁺

	pcdna3-GFP-IP3R1	Cedido por el laboratorio de Colin Taylor	Uso en experimentos de bioluminiscencia de Ca^{2+}
	Virus Herpes-vamp7-GA1	Generado en el laboratorio por ingeniería genética	Uso en experimentos de bioluminiscencia de Ca^{2+}
	CMV-TRPML1-mCherry	Addgene	Uso en experimentos de colocalización, fijadas con MetOH
	PCS2-TPC1mRFP	Cedido por Patel (UCL, Londres, UK)	Uso en experimentos de colocalización, fijadas con MetOH
RE	pDCNA3-Inmunoglobulina (Ig)-GA1	Generado en el laboratorio por ingeniería genética	Uso en experimentos de bioluminiscencia de Ca^{2+}
Mitocondria	PCDNA3-mito R-GECO1(B1)	Cedido por un laboratorio colaborador	Uso en experimentos de colocalización, fijadas con PFA al 4%

2.6 Medidas de $[\text{Ca}^{2+}]$ por bioluminiscencia

Las células se vaciaron de Ca^{2+} durante 10 min a 22° C incubadas en medio extracelular libre de calcio (**Tabla 8 B**) y 2,5-di-terc-butilhidroquinona (TBH; 10 μM **Tabla 10**) o ATPasa Ca^{2+} del retículo sarcoendoplasmático (SERCA; diferentes concentraciones) según el tipo de experimento. A continuación las células transfectadas con ELGA1 (**Tablas 6 y 7**) se reconstituyeron con celenteracina n (mutante que disminuye la afinidad por el Ca^{2+}) en el mismo medio entre 1 y 3 horas sin que hubiera muerte celular aparente. Luego se colocaron las placas en el luminómetro (Cairn Research, Reino Unido). Los experimentos se realizaron con células intactas y permeabilizadas. Durante el desarrollo de los experimentos se mantuvo una perfusión continua de medio a un flujo de 5 mL/min. El primer minuto se perfundió medio externo libre de Ca^{2+} y a continuación, en células intactas, se usó medio externo con Ca^{2+} 1 mM (**Tabla 8 B**) al que se añadieron los estímulos. En el caso de experimentos con células permeabilizadas se perfundieron durante 1 min con Dig 50 μM en medio interno sin Ca^{2+} (tras un minuto con medio externo libre de calcio) y, a continuación, se utilizó medio interno con una concentración de Ca^{2+} de 200 nM (**Tabla 8 A**) al que se añadieron los estímulos. En todos los experimentos de bioluminiscencia de aequorinas se perfundieron los estímulos durante 30 segundos cada uno. La adquisición de luz se registró como cps.

**Tabla 8 A. Composición medio interno
200nM de Ca^{2+} ***

Solución	Concentración final
KCl	140mM
Buffer fosfato	1mM
MgCl_2	1mM
HEPES-Na	20mM
Na^2 -Succinato	2mM
Na-Piruvato	1mM
Na^2 -ATP/ MgCl_2 *	1mM
EGTA libre (solución valorada)	0.89mM
Ca^{2+} EGTA (solución valorada)	1mM
Enrasar con H_2O MQ	

Tabla 8 B. Composición medio externo

Solución	Concentración final
KCl	50mM
NaCl	1450mM
MgCl_2	10mM
HEPES-Na	100mM
glucosa	10mM
EGTA (sólo para medios sin Ca^{2+})	
EGTA (sólo para medios sin Ca^{2+})	0.5mM
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (sólo para medios con Ca^{2+})	1mM
Enrasar con H_2O MQ	

* Las diferentes concentraciones de Ca^{2+} y Mg^{2+} se calculan con el programa MaxChelator (Bers y cols., 1994). La $[\text{Ca}^{2+}]$ final se consiguió mezclando los tampones valorados con EGTA 0,2 M y EGTA- Ca^{2+} con 0,2 M, a pH = 7,0. Al medio interno libre de Ca^{2+} , se añaden EGTA no valorado a una concentración de 0.5mM.

Como se comentó anteriormente, La calibración de las sondas permite transformar luminiscencia en $[\text{Ca}^{2+}]$ y comparar la concentración de unos experimentos con otros. La curva de calibración representa el $\log [\text{Ca}^{2+}]$ frente a $L/L_{\max}$; donde L es la luminiscencia por segundo y $L_{\max}$ es la integral de luminiscencia (que va desde el momento en que se comienza a medir hasta el final del experimento). $L/L_{\max}$ es la fracción de luminiscencia total de la muestra registrada en cada segundo (La Aequorina se va consumiendo progresivamente). El cálculo de la $[\text{Ca}^{2+}]$ requiere conocer la cantidad de luminiscencia total que puede emitir la muestra. Se consigue lisando la célula y añadiendo una $[\text{Ca}^{2+}]$ saturante: 10 mM de CaCl_2 , de esta forma, se libera todo el resto de luminiscencia que pueden emitir las aequorinas.

Conocer el quemado de cuentas totales de las muestras transfectadas con ELGA1 requiere de una hora de exposición a Ca^{2+} saturante para que todas las Aequorinas se iluminen (ya que es una sonda de baja afinidad al Ca^{2+}). Los experimentos con ELGA1 se analizaron tras una aproximación de $L_{\max}$ reduciendo así el tiempo de experimentación (**Figura 23**) (Rodríguez-Prados *et al.*, 2015). Se determinó la $[\text{Ca}^{2+}]$ para GA1 realizando una regla de conversión de $[\text{Ca}^{2+}]$ para cada $L/L_{\max}$ a partir de la curva de calibración de Ca^{2+} que se utilizó para cada experimento analizado.

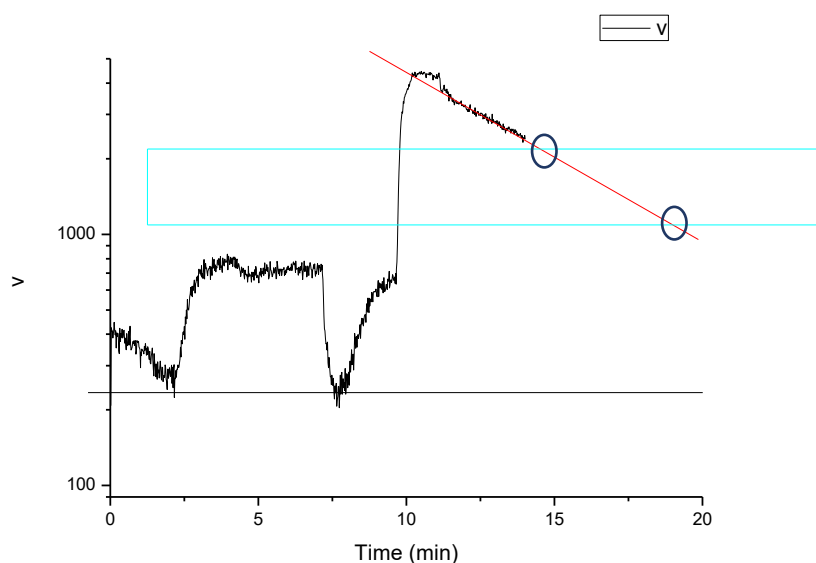


Figura 23. Esquema del análisis de GA1. Cuentas en crudo en el eje Y (counts (V)) en escala logarítmica frente al tiempo en el eje X. La recta del quemado de cuentas se alarga artificialmente con una línea (en rojo) y se añade un rectángulo del doble de una medida (por ejemplo de 100 a 200 cuentas, representado en turquesa). Los datos del tiempo que coinciden en los puntos entre el rectángulo y la recta (rodeado en gris) se utilizaron para calcular el tiempo medio (se resta el tiempo mayor menos el menor), el resultado se multiplica por el último resultado de luminiscencia y por el coeficiente de corrección 1.49. El nuevo documento se utiliza para analizar el experimento en el programa *OriginPro 8*.

2.7 Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia se realizó con las características y tipos celulares especificados en la **Tabla 9**. Se utilizaron cubreobjetos de 12 mm de diámetro tratados con poli-L-lisina 0.01 mg/mL (Sigma, P-1274). Se utilizó PBS para los lavados, se fijaron con Metanol al 100% 10min a -20°C o parformaldehído (PFA) al 4%, 15-20 min a 4°C; la permeabilización y bloqueo se realizó con PBS1X, 0.2% de saponina y 10% de suero de cabra (GS, de las siglas en inglés: *Goat serum*) o PBS1X, Tween 20 0.1% y 10% de GS 20 min a temperatura ambiente; los primarios se incubaron en PBS + GS 1% durante la noche, en agitación y oscuridad a 4°C; se utilizaron Alexa Fluo 647 o 568 para los secundarios anti-ratón (α -mouse) o anti-oveja (α -sheep). Los núcleos se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Las células se montaron con VectashieldR (Vector).

2.8 Microscopia confocal

Las imágenes se realizaron en microscopio confocal Leica TCS SP5X (del servicio de microscopía del Instituto de Biología y Genética Molecular), con el objetivo de inmersión en aceite Plan-Apocromático 63X (NA 1.4), y láser blanco. Se tomaron imágenes para determinar la colocación de nuestra sonda y así determinar su localización. Se

utilizaron células fijadas y vivas para las cotransfecciones (**Tabla 7**) y de células fijadas para la inmunofluorescencia (**Tablas 9 y 6**). Se seleccionaron sondas y anticuerpos bien caracterizados y accesibles para nuestro laboratorio.

Tabla 9A. Células fijadas

Tipo celular y proteína a visualizar	Fijación celular	Permeabilización y bloqueo	Primario	Secundario Alexa fluo
Fibroblastos- EEA1	MetOH	PBS1X, Tween 20 0.1% y 10% de GS	Virus GAmut α -EEA1 1:1000	α -mouse AF568 1:1000
HeLa Clon erTA- ER	MetOH		GAmut	
HEK293T - Tgo	MetOH	PBS1X, saponina 0.2% y 10% de GS	GAmut α -Tgn46 1:100	α -sheet AF568 1:1000
HEK293T - SERCA2	PFA 4%		GAmut α -SERCA 1:200	α -mouse AF647 1:1000
HEK293T - TPC1	MetOH	Transfección de TPC1 0.05 μ g		
HEK293T - TPC2	MetOH	Transfección de TPC2 0.05 μ g		
HEK293T - TRPML1	MetOH	Transfección de TRPML1 0.02 μ g		

Tabla 9B. Células vivas (no fijadas)

Tipo celular y proteína a visualizar	Transfección
HEK293T - TPC2	TPC2 0.07 μ g
HEK293T - TRPML1	TRPML1 0.02 μ g

Colocalización Fiji-ImageJ

Se utilizó Fiji (Schindelin *et al.*, 2012): distribución del software libre ImageJ para determinar y cuantificar la posible colocalización entre dos pixels. Se usó el *plugins* JACoP (de las siglas en inglés: *Just Another Co-localization Plugin*) (Bolte and Cordelières, 2006) que facilita la comparación, el análisis y la lectura de los resultados. Los índices elegidos fueron Pearson y Manders. Pearson abarca valores entre -1 (correlación negativa máxima) y +1 (correlación positiva máxima). Manders (M1 y M2), ajustando el threshold, abarca valores entre 0 (sin correlación) y +1 (correlación del 100%), se basa en el coeficiente de correlación de Pearson, pero es más preciso en colocalización, se utilizó el threshold que permite el mismo *plugins* para corregir el ruido.

2.9 Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM, como se indica. Los datos se analizaron con el software GraphPad InStat3. La significación estadística entre dos grupos se analizó

mediante la prueba t de Student no apareada, mientras que se compararon más de dos grupos mediante un análisis de varianza unidireccional o bidireccional (ANOVA). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando los valores de probabilidad (p) fueron menores o iguales a 0,05 (*), 0,01 (**), 0,001 (***) o 0,0001(****). Los tamaños de muestra (n) se refieren a pocillos de células independientes ($\sim 2 \times 10^5$ células/pocillo) de, al menos, 2 días diferentes.

2.10 Lista de compuestos

Tabla 10. Lista de compuestos utilizados

Compuesto	[Almacenamiento]	[Uso]	Referencia
TBH	10 mM	10 μ M	SIGMA, 112976
Tapsigargina	1 mM	0.2 μ M	Calbiochem, 586005
Celenteracina n	200 μ M	2 μ M	BIOTIUM, 10115-2
Digitonina	100 mM	50 y 100 μ M	SIGMA, N5655
ML-SA1	30 mM	20 μ M	SIGMA, SL0627
MK6-83		20 μ M	SIGMA, SML1509
ML-SI1 (GW405833)	10mM	10 μ M	SIGMA, G1421
ML-SI3	10mM	10 μ M	
IP ₃	5 mM	2 μ M	Alfa Aesar, J67063
TPC-A1-N	30 mM	30 μ M	MedChemExpress, HY-131614
TPC-A1-P	10mM	30 μ M	MedChemExpress,
NAADP	10 mM	0.1 μ M	SIGMA, N5655
ATP	100 mM	100 μ M	
Bafilomicina A1		1 μ M	Chem Cruz, sc-201550A
GPN	200 mM	200 μ M	Chem Cruz,
Ionomicina	10 mM	1 μ M	
Nigericina	5 mM	10 μ M	Sigma, N5509
CCCP	1 mM	1 μ M	Sigma, C2759
Monensina	20 mM	10 μ M	Calbiochem, 475895

03 | RESULTADOS

3.1 Caracterización del nuevo sensor de Ca^{2+} para organelas ácidas

3.1.1 Generación de un nuevo indicador de Ca^{2+} endolisosomal

En esta tesis se han utilizado indicadores de Ca^{2+} codificados genéticamente basados en aequorina fusionada a GFP. Anteriormente publicados y denominados como GA y GAP (Rodríguez-García et al., 2014; Rodríguez-Prados et al., 2015) (**Figura 24 A**). En este caso, se ha fusionado el extremo N-terminal de la GFP-aequorina con el extremo luminal C-terminal de la proteína VAMP7, de esta forma, se asegura la medida en el interior de los orgánulos ácidos (**Figura 24 B**). VAMP7 [de las siglas en inglés: *Vesicle associated membrane protein*] (Advani et al., 1998) es una proteína v-SNARE (SNARE de las siglas en inglés: *Soluble NSF Attachment Protein Receptor* y “v” por la localización en vesículas) que puede formar complejos SNARE al interactuar con proteínas localizadas en membranas intracelulares: t-SNARE. VAMP7 también se denomina TI-VAMP por ser insensible a la neurotoxina del tétanos y a algunos tipos de botulismo (B, D, F y G) (Chaineau, Danglot and Galli, 2009; Galli et al., 1998).

VAMP7 deriva de SYBL-1 (sinaptobrevina-1) (D'Esposito et al., 1996), un gen del cromosoma X muy conservado y de 2576 pb, que da lugar a una proteína de 220 aminoácidos y 25 KDa. Esta proteína pertenece a la familia “*longin*”, caracterizada por tener una cola de unos 120-140 aminoácidos en la parte N-terminal, denominada **LD** (de las siglas en inglés de dominio largo: *long domain*). El dominio LD es importante para esta tesis, ya que permite la correcta localización en los **endosomas tardíos** en células no neurales (Chaineau, Danglot and Galli, 2009). La localización en endosomas tardíos se debe a la interacción de LD con la subunidad δ del adaptador AP-3 (Figura 25), esta unión podría inhibir la formación del complejo SNARE (Chaineau, Danglot and Galli, 2009) o, según un trabajo posterior de un laboratorio diferente (Kent et al., 2012), podría transportar VAMP7 a su localización sólo cuando éste está formando un complejo cis-SNARE (en el que todo el complejo SNARE forma parte de la misma proteína).

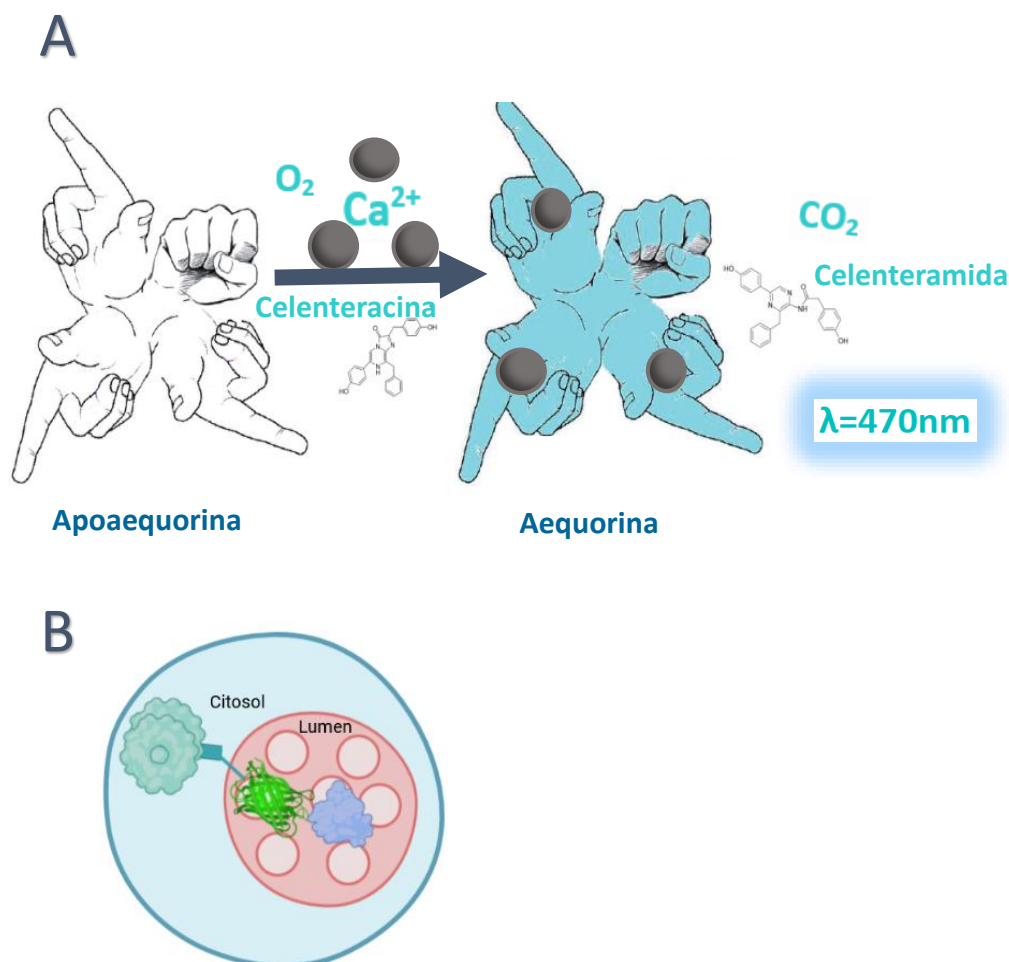


Figura 24. Localización de la sonda. (A) Esquema de la reacción generada por aequorina: las manos con los índices y pulgares extendidos representan las manos EF activas, mientras que el puño representa la mano EF no funcional. Cada mano activa capta un ion Ca^{2+} en presencia de O_2 y del cofactor celenteracina; generando la oxidación de celenteracina en Celenteramida, CO_2 , y luz azul a 470nm. La cantidad de luz se mide en el luminómetro y es proporcional a la $[\text{Ca}^{2+}]$. **(B)** Esquema de la orientación del indicador de Ca^{2+} , en el lumen. En verde se representa la GFP de la sonda bioluminiscente (utilizada sólo para determinar la localización de la sonda) y en malva las manos EF que unen a los iones calcio; en la cara citosólica se encuentra la proteína VAMP7 característica de la vía endocítica.

Además del LD, VAMP7 contiene un dominio SNARE (involucrado en la formación del complejo SNARE) y un dominio transmembrana de anclaje a membrana (Chaineau, Danglot and Galli, 2009) (**Figura 25**). En estado fisiológico la localización de VAMP7 más periférica, más nuclear (relacionada con TNG), o en membrana plasmática, parece depender del tipo celular. La localización en endosomas y lisosomas están enriquecidos en un 55% y en aparato de Golgi en un 40% en la mayoría de tipos celulares. Todos estos datos hacen de VAMP7 un marcador muy apto para localizar endosomas tardíos y lisosomas secretores ((Albrecht *et al.*, 2015; Vats and Galli, 2022; Pryor *et al.*, 2004).

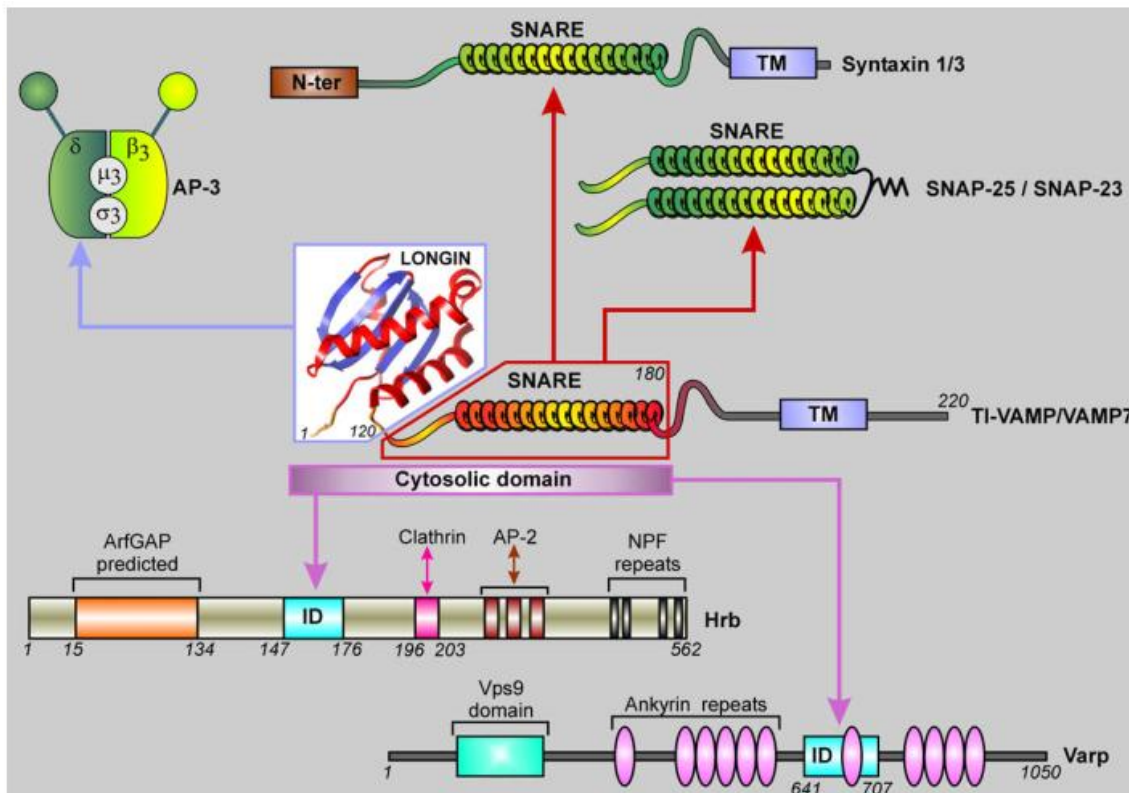


Figura 25. Estructura de VAMP7. VAMP7 contiene tres dominios, uno transmembrana que le permite el anclaje en la membrana de la vesícula. Un dominio largo que le permite la unión a AP-3, y por tanto, el posterior anclaje en endosomas tardíos (además de la inhibición de la formación del complejo SNARE); y un dominio SNARE con el que puede tanto formar complejos SNARE (con t-SNARE anclados a la membrana plasmática), como unir a Hrb (*Human immunodeficiency virus Rev Binding protein*) y a Varp (Vps9 domain and Ankyrin repeats containing protein, una GFP para Rab21 que colocaliza en el TNG). (Imagen seleccionada de (Chaîneau, Danglot and Galli, 2009))

Debido a la alta $[Ca^{2+}]$ esperada en el lumen endolisosomal, se introdujo la mutación D119A en la aequorina para reducir la afinidad por el Ca^{2+} . Esta sonda se denominó ELGA (de las siglas en inglés: *Endo-Lysosomal GFP-Aequorin*) (**Figura 26 A**). Se generó una segunda variante (ELGA1) con sustituciones adicionales (D117A y D163A) (**Figura 26 A**) para reducir aún más la afinidad y disminuir la tasa de consumo de la sonda. Al disminuir la tasa de consumo de la aequorina se permiten registros más prolongados (hasta ~ 1 h). GA1 es la misma variante publicada previamente como GAP1 (Rodríguez-García et al., 2014; Rodríguez-Prados et al., 2015) pero renombrada para la publicación generada a partir de esta tesis (por tanto, continuo con el nombre GA1 para mantener coherencia con la publicación asociada). Ambas sondas: GA y GA1 pueden medir Ca^{2+} en el rango de 100-1000 μM (**Figura 26 B**). Los sensores de Ca^{2+} se expresaron (de manera transitoria o estable) en células de mamíferos, utilizando el promotor relativamente débil del virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1), para limitar la cantidad de proteína expresada y minimizar así la direccionalidad errónea.

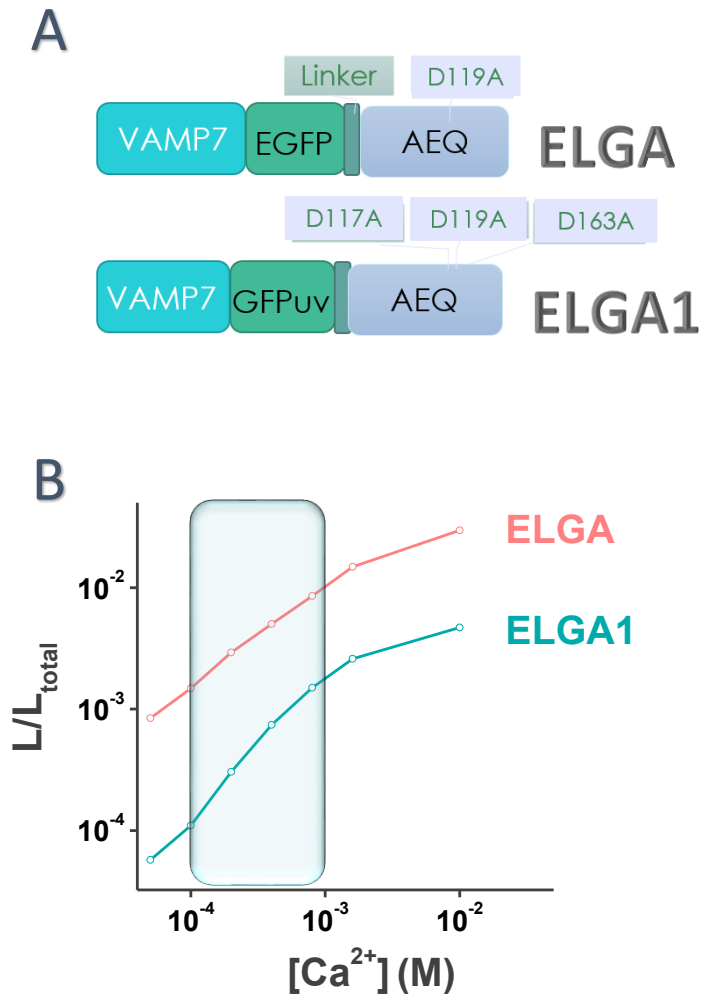
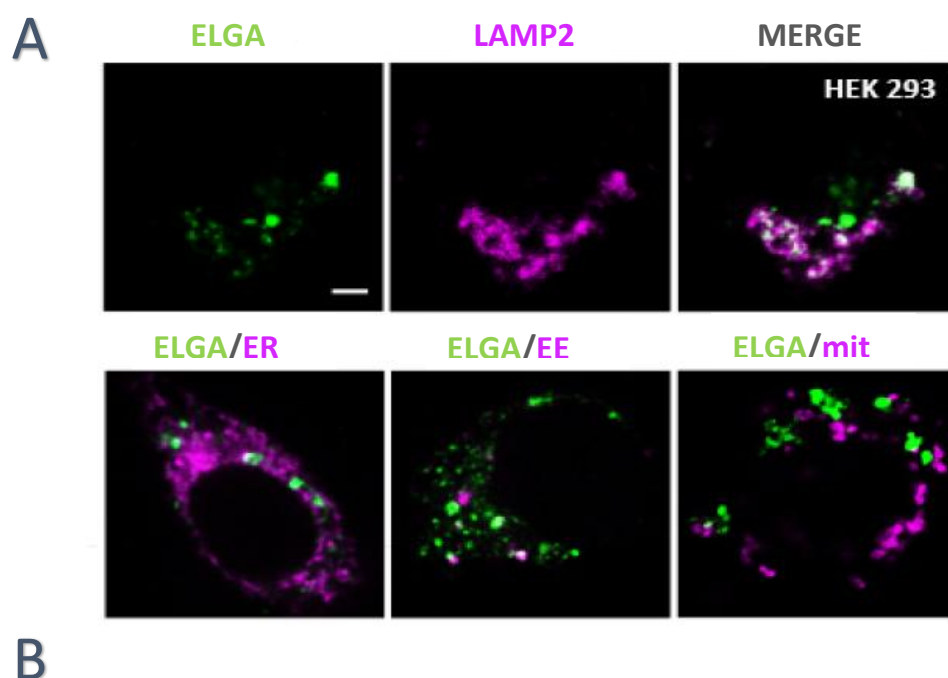


Figura 26. Estructura de la sonda y variantes. (A) Esquema de la estructura de ELGA y ELGA1. VAMP7 (de las siglas en inglés: *Vesicle associated membrane protein*), EGFP (de las siglas en inglés: *enhanced green fluorescent protein*), GFPuv (de las siglas en inglés: *UV-excited green fluorescent protein*), AEQ (Aequorina), ELGA y ELGA1 son indicadores de Ca²⁺ codificados genéticamente basados en aequorina fusionados a GFP dirigidas a endolisosomas. Ambas sondas tienen la misma localización y son capaces de medir en el rango esperado de [Ca²⁺] de los endolisosomas. Las principales diferencias radican en que ELGA tiene mayor fluorescencia en la GFP (por lo que la usamos para medidas en confocal) y permite experimentos y análisis más rápidos (por lo que la utilizamos para pruebas iniciales). **(B)** Representación de la calibración de las sondas de Ca²⁺ GA y GA1. La cantidad de luz azul equivale a una concentración de Ca²⁺ proporcional. En sombreado se observa que ambas sondas pueden medir en el rango de 100 a 1000 μM, que es la [Ca²⁺] esperada en endolisosomas. Puede observarse también que ELGA1 es menos sensible a Ca²⁺ debido a la mayor cantidad de mutaciones.

3.1.2 Localización del indicador endolisosomal ELGA mediante el uso de confocal

Con el objetivo de caracterizar la distribución subcelular de ELGA, se realizó un análisis de colocalización con varios marcadores endógenos de diferentes orgánulos: para retículo endoplasmático (ER) se utilizó nuestra misma sonda pero dirigida a ER; y se optó por anticuerpos específicos para endosomas tempranos (EE), lisosomas y endosomas tardíos y mitocondrias (mit). Hubo colocalización de ELGA con LAMP2 (marcador de lisosoma y endosomas tardíos), mientras que no fue significativa con marcadores de otros orgánulos como el RE, EE o mit (**Figura 27**). Estos resultados indican que la mayor parte del indicador ELGA se localiza en un subconjunto de endolisosomas. Los estudios estipulan que VAMP7 podría localizarse en el aparato de Golgi en un 40% en la mayoría de los tipos celulares. Por lo que también realizamos colocalización entre ELGA y el trans Golgi (datos no mostrados). Se utilizó el anticuerpo TNG46 en células HEK293T y se obtuvo un coeficiente de Pearson de 0.39 ± 0.04 , que era el resultado esperado.



Marcador	Coeficiente de Pearson (r) (media $\pm$ error)	Coeficiente de Mander M1 (ELGA/marcador) (media $\pm$ error)	Coeficiente de Mander M2 (marcador/ ELGA/) (media $\pm$ error)	N
LAMP-2	$0,60 \pm 0,03$	$0,55 \pm 0,06$	$0,45 \pm 0,04$	10
ER	$0,42 \pm 0,02$	$0,39 \pm 0,05$	$0,12 \pm 0,02$	10
EE	$0,27 \pm 0,03$	$0,13 \pm 0,01$	$0,24 \pm 0,03$	10
Mitocondria	0.20 ± 0.10	0.14 ± 0.05	0.29 ± 0.15	10

Figura 27. Imágenes de colocalización con ELGA realizadas en confocal. (A) Imágenes representativas de células HEK293T realizadas en confocal. Transfectadas con ELGA (en verde) y fijadas tras 24 h. Fila

superior: las células se inmunotñieron con anti- LAMP-2 (proteína de membrana asociada a lisosomas endógena 2) se analizó mediante inmunodetección con un anticuerpo específico (centro, magenta). Las imágenes verde y magenta están fusionadas (derecha, blanquecino). Fila inferior: Colocalización con los siguientes marcadores organulares (magenta): ER, er-Ruby-GCaMP210 (ER); endosoma temprano, inmunotñe con el antígeno anti-endosoma temprano 1 (EE1); mitocondrias, inmunotñe con anticuerpo anti-TOM20 (mt). Barra de escala para todas las imágenes, 5 μm . **(B)** Tabla resumen de los resultados de colocalización obtenidos para ELGA con los diferentes coeficientes, error estándar y el número de imágenes medida (N) para cada marcador: Lamp-2 (células HEK293T); erTA (Clon en células HeLa que también utiliza GA pero localizado en ER); EEA1 (en fibroblastos 302); (TOM20 Mitocondrias en células HEK293T). Puede apreciarse una colocalización positiva sólo para LAMP2.

3.1.3 Calibración de la sonda en función del pH

El pH es la característica más representativa de la vía endocítica, es importantísimo para el buen funcionamiento de ésta, ya que entre otras funciones activa las enzimas lisosomales encargadas de eliminar los desechos. Más relacionado con la posible localización de ELGA1, se conoce una relación estrecha entre el pH y Rab7, proteína de membrana característica de endosomas tardíos y de lisosomas. Rab7 recluta RILP que a su vez regula la V-ATPasa (Johnson et al., 2016). Por tanto, una mayor concentración de Rab7 en la membrana implica una mayor acidificación. Por otro lado, más Rab7 está relacionado con una localización más nuclear. Es decir, que cuanto más Rab7 más cerca nos encontraremos de endosomas tardíos y lisosomas y mayor acidificación habrá en el lumen, y por tanto, más apta debe ser una sonda para medir calcio a bajo pH. También existe una correlación entre el pH y las concentraciones de Ca^{2+} , son más bajas al principio de la vía endocítica y luego van aumentando (Huotari and Helenius, 2011).

En la vía endocítica el pH se encuentra en un rango desde 7.2 hasta 4.5, desde las vesículas endocíticas a los lisosomas, respectivamente. Por lo tanto, es primordial conocer las capacidad de medida de Ca^{2+} , a diferentes pHs, que tiene una sonda localizada en la vía endocítica. Durante esta tesis se comparó la señal de luminiscencia máxima desencadenada por Ca^{2+} en el rango de pH desde 4,5 a 7,2 (**Figura 28 A y B**). La ELGA1 recombinante reconstituida con celenteracina n emitió luminiscencia máxima a un pH de 7,2 y disminuyó proporcionalmente a pHs más bajos (6,5 y 6,0 pH) hasta un umbral de pH de 5,5, por debajo del cual, el sensor de Ca^{2+} no era funcional (**Figura 28 B**). Se obtuvieron resultados similares hasta pH6 entre la ELGA1 y la aequorina nativa (Wt-AEQ) cuando se reconstituyeron con celenteracina nativa o con su análoga n que genera menor afinidad (**Figura 28 A y B**), lo que indica que el efecto del pH ácido sobre la función luminiscente es independiente de la afinidad de la aequorina por Ca^{2+} . Sin embargo, a pH 5.5 sí se observan cambios en la respuesta al Ca^{2+} , mejorando en la versión de la aequorina de menor afinidad.

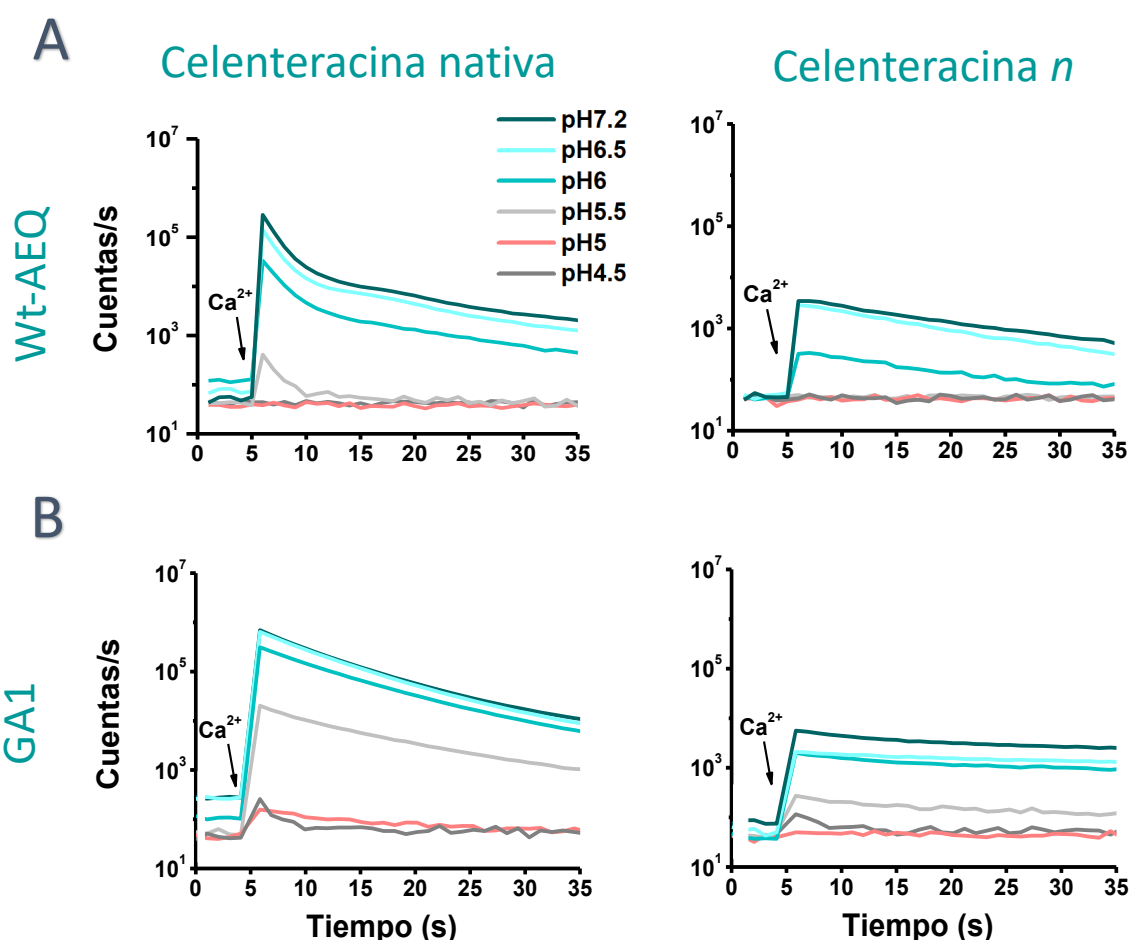


Figura 28. Emisión de luminiscencia de ELGA1 a diferentes pH. La apoproteína Wt (A) o GA1 (B) producidas en *E. Coli* se reconstituyeron con celenteracina nativa (izquierda) o n (derecha) durante 20 min. A continuación se sometieron al ensayo, con 10 mM de CaCl_2 (flecha) a diferentes pHs desde 4.5 hasta 7.2, representados con diferentes colores (ver leyenda). Los tampones utilizados fueron: acetato para un rango de pH de 4,5 a 5,5; Na-MOPS para pH de 6 y 6,5; y Na-Hepes para pH de 7,2. Cada traza es el valor normalizado con respecto a su emisión de fondo, antes de la adición de Ca^{2+} . Cada trazo es el promedio de 3 a 4 experimentos independientes.

Además, en el ensayo de luminiscencia se pudo recuperar parcialmente la actividad del sensor de Ca^{2+} a pH 4,5, siempre que ELGA se reconstituyó primero a pH neutro (7,2) y se midió después a pH 4,5 (**Figura 29**). La falta de emisión de luz sugiere que la unión del cofactor a la apoaequorina podría estar comprometida en orgánulos con pH ácido.

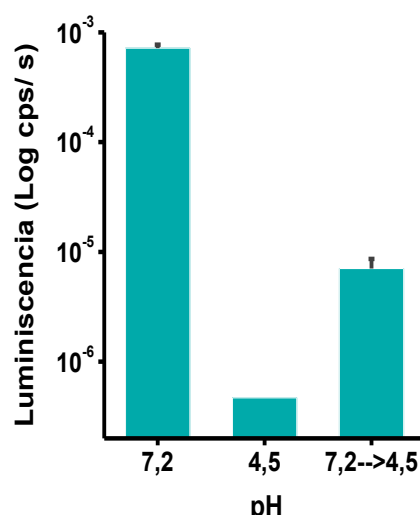


Figura 29. Recuperación de luminiscencia a pH 4.5. La apoproteína GA amplificada en *E. Coli* se reconstituyó con celenteracina nativa durante 20 min según el pH del ensayo; a continuación, se sometió a un estímulo de 30 μ M de CaCl_2 (media $\pm$ error estándar de la media; $n = 3$) a pHs 7.2 (caja de la izquierda) y pH 4.5 (caja central). La respuesta de luminiscencia se perdió completamente a pH 4.5 (caja central) y se consiguió recuperar parte de la respuesta del experimento (caja de la derecha). La recuperación ocurrió al reconstituir con celenteracina a pH 7.2. Los tampones utilizados fueron los mismos que en la Figura 28: acetato para un rango de pH de 4,5 y Na-Hepes para pH de 7,2. Cada caja es el valor normalizado con respecto a su emisión de fondo antes de la adición de Ca^{2+} . Cada caja proviene del promedio de 3 a 4 experimentos independientes.

Los hallazgos comentados hasta el momento indican que no es posible la medida de Ca^{2+} a un pH altamente ácido como el de los lisosomas. Debido a que el pH de los orgánulos de la vía endocítica es diverso (**Figura 30 A**), razonamos que los ELGA podrían utilizarse para medir Ca^{2+} en compartimentos menos ácidos dentro de la vía. Se aprovechó la sensibilidad al pH de la fracción GFP en ELGA para determinar si los ELGA residen en dichos compartimentos. La fluorescencia de GFP se extingue a pH ácido ($\text{pK}_a \sim 6$) (Miesenböck, De Angelis and Rothman, 1998). Por lo tanto, cualquier fluorescencia de GFP detectable en células vivas, debería reflejar la localización de ELGA1 hacia un compartimento con un pH >5 , rango en el que ELGA1 es funcional. Como se muestra en la **Figura 30 B**, la fluorescencia punteada de GFP, con un patrón granulado a lo largo del citosol, fue fácilmente detectable en células HEK293T vivas que expresan ELGA.

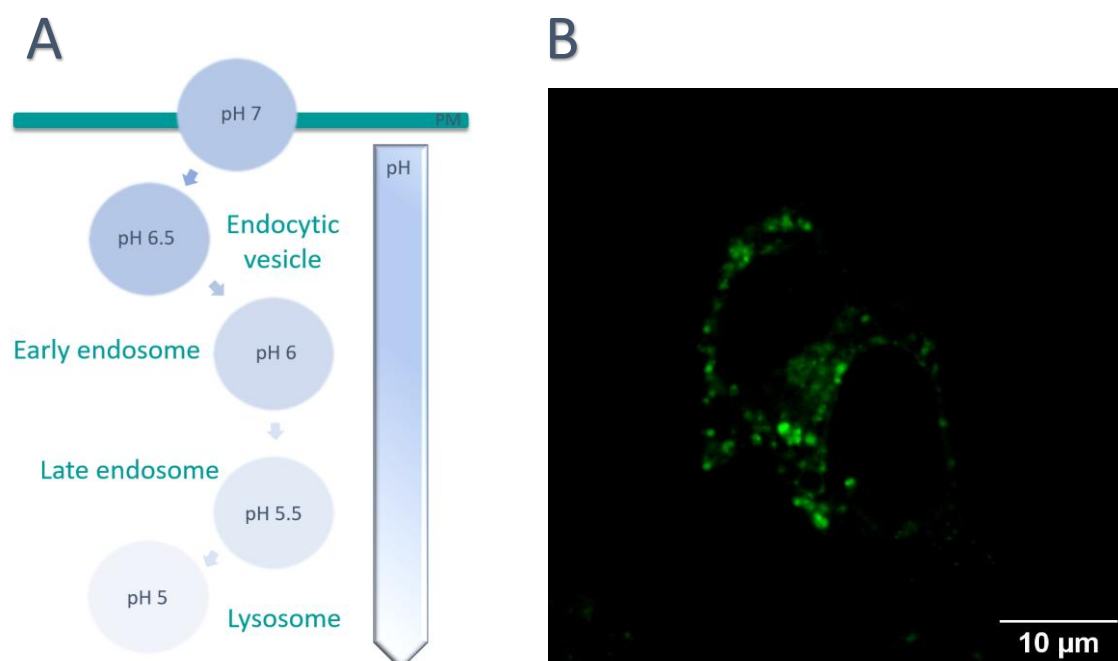


Figura 30. Posible localización de la sonda: vía endocítica. (A) esquema de los cambios de pH en los orgánulos de la vía endocítica desde la entrada a través de las vesículas endocíticas a pH 7.2, hasta los lisosomas a pH de 4.5-5. (B) Imagen representativas de células HEK293T vivas realizadas en confocal 24h después de la transfección con ELGA (en verde).

A continuación, para evaluar las propiedades de las sondas a un pH 6, realizamos una calibración de ELGA1 en un rango de Ca^{2+} de 10^{-6} y 10^{-2} M, y realizamos un control a pH 7.2 (**Figura 31**). Se obtuvieron valores esencialmente similares entre pHs y el control, lo que indica que no hay un efecto importante en ELGA1 a pH 6. La K_d de GA1 por Ca^{2+} fue de $396 \pm 30 \mu\text{M}$ ($n=36$) a pH 7,2 en células HEK293T permeabilizadas (**Figura 36**).

En conjunto, estos resultados identifican a los ELGA como reporteros de Ca^{2+} dentro de compartimentos ligeramente ácidos.

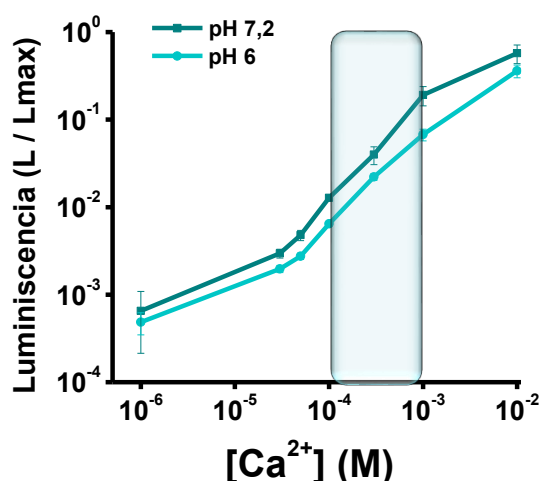


Figura 31. Propiedades de la sonda según pH. Curvas de calibración de Ca^{2+} de GA1 a pH 6,0 y 7,2 normalizados con respecto al máximo valor. Se realizaron medidas de Ca^{2+} a diferentes concentraciones: 0 (con EGTA a concentraciones saturantes), 30 μM , 50 μM , 100 μM , 300 μM , 1 mM y 10 mM. Cada valor es la media $\pm$ error estándar de 6 medidas a partir de dos preparaciones de proteínas independientes.

3.1.4 Monitorización de la $[\text{Ca}^{2+}]$ en células reportada por ELGA1

La curva de calibración permite conocer qué $[\text{Ca}^{2+}]$ se relaciona con la cantidad de luz emitida en cada momento del tiempo (L / L_{tot}). Por tanto, como la medida de luminiscencia es proporcional a la $[\text{Ca}^{2+}]$ a través de curvas de calibración hablaremos de una y otra medida indistintamente.

Experimentos en intactas en diferentes tipos celulares

Se evaluaron los niveles luminales de Ca^{2+} en células intactas para caracterizar la dinámica de Ca^{2+} endolisosomal de la forma más fisiológica posible. Se utilizó ELGA1 y la adición de 1 mM de CaCl_2 para determinar la cantidad del ion calcio en el orgánulo diana (**Figura 32**), y finalmente se obtuvo un estado estacionario (es decir, un contenido máximo de Ca^{2+} luminal) a $249 \pm 65 \mu\text{M}$ ($n = 6$). Antes de llegar al dato de $[\text{Ca}^{2+}]$ en el estado estacionario, se realizaron pruebas de rellenado de Ca^{2+} con diferentes estrategias de vaciado y cofactores de la Aequorina, que se irán desglosando a lo largo de la tesis.

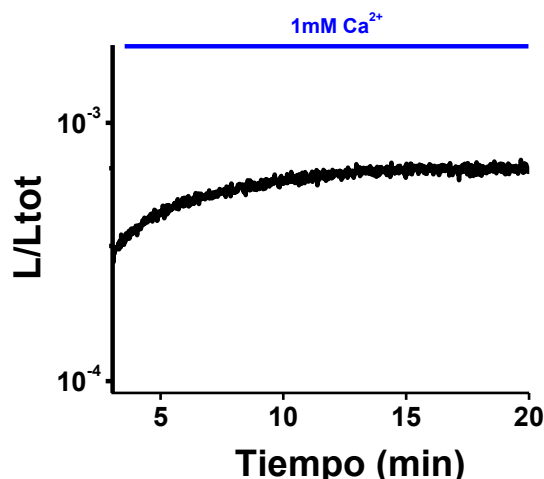


Figura 32. Estado estacionario en células intactas. Figuras representativas de células HEK293T con expresión de la sonda ELGA1 en estado estable en célula HEK293T. Se utilizó ELGA1 para medir los cambios de Ca^{2+} y medio externo con Ca^{2+} 1mM (Tabla 8 B). A lo largo del tiempo se detecta la luz azul emitida hasta que se obtiene una medida estable a partir de la cual pueden añadirse los diferentes estímulos.

Se ha propuesto que EL es un depósito con un alto contenido de Ca^{2+} , por lo que se esperaría que sea necesario depletar el Ca^{2+} antes de que la aequorina se reconstituya con su cofactor, de esta forma, se evita el consumo prematuro de la sonda (es decir, antes de que se pueda experimentar en el luminómetro). Los mecanismos de rellenado del depósito no están claros, por lo que fue necesario realizar varias pruebas. Entre las primeras pruebas se realizaron experimentos con diferentes cofactores de la aequorina (celenteracinas silvestre y n). Los cofactores se reconstituyeron en ausencia de Ca^{2+} , se añadió en el medio externo EGTA (0,5mM) (Tabla 4xB) y se utilizó terc-butilhidroquinona (tBHQ o TBH) para vaciar el compartimento diana de ELGA1. El uso de TBH puede resultar inesperado, ya que trabajamos en endolisosomas, no obstante, este fármaco es utilizado ampliamente en nuestro laboratorio para depletar ER y conseguir resultados con luminiscencia en este orgánulo. Por tanto, un producto utilizado por inercia abrió las puertas a experimentos reproducibles. Sorprendentemente, los experimentos realizados con celenteracina n (Figura 32) permitieron la reproducibilidad de rellenado y de liberación de Ca^{2+} , mientras que al utilizar celenteracina nativa no se apreciaron el rellenado o la respuesta a estímulos de forma reproducible (Figura x33).

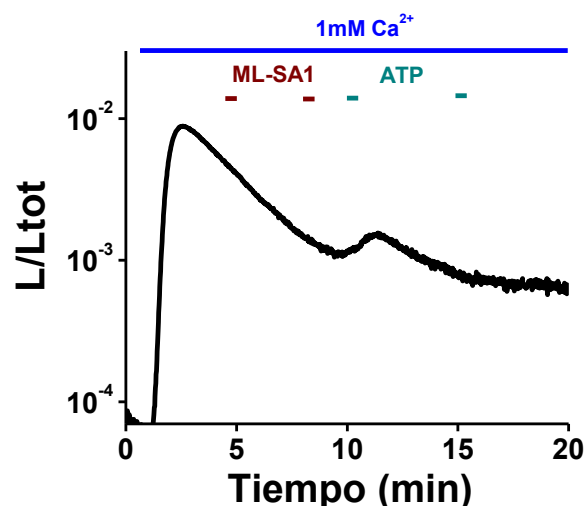


Figura 33. Celenteracina nativa. Experimento con células HeLa intacta, con sobreexpresión de ELGA1 y uso de medio externo para el rellenado (**Tabla 8 B**). Representación de la respuesta tras la aplicación de dos pulsos de ML-SA1 (20 μ M, 30 s) y dos pulsos de ATP (100 μ M, 30 s) utilizando como cofactor de aequorina celenteracina nativa.

Con el objetivo de determinar la liberación de Ca^{2+} de estos orgánulos se realizaron experimentos en diferentes tipos celulares con distintos agonistas. No fue necesario sobreexpresar los canales de IP3 en los diferentes tipos celulares para medir respuesta con ELGA1. Se estimularon células vivas con ATP que activa los receptores P2Y endógenos, o carbacol que activa los receptores muscarínicos. El ATP y el carbacol provocaron respuestas de Ca^{2+} de EL rápidas y reversibles de $35,81 \pm 2 \%$ ($n = 7$) y $19,88 \pm 2 \%$ ($n = 5$) (datos de carbacol no mostrados), respectivamente en células HEK293T (**Figura 34**). Por otro lado, se sobreexpresaron canales de TRPML1, que son específicos de endolisosomas tardíos y lisosomas, y se estimuló las células con su agonista ML-SA1. Se obtuvieron resultados a ML-SA1 en 2 experimentos de 6 con una respuesta de $6,53 \pm 3 \%$ ($n = 6$) y fue ineficaz en células sin sobreexpresión de TRPML1. Con los experimentos de TRPML1 se pretendía corroborar la localización de ELGA1 en endosomas tardíos. Los resultados apuntaban a que existía una respuesta real con sobreexpresión de TRPML1, por lo que posteriormente, se realizaron pruebas en células permeabilizadas.

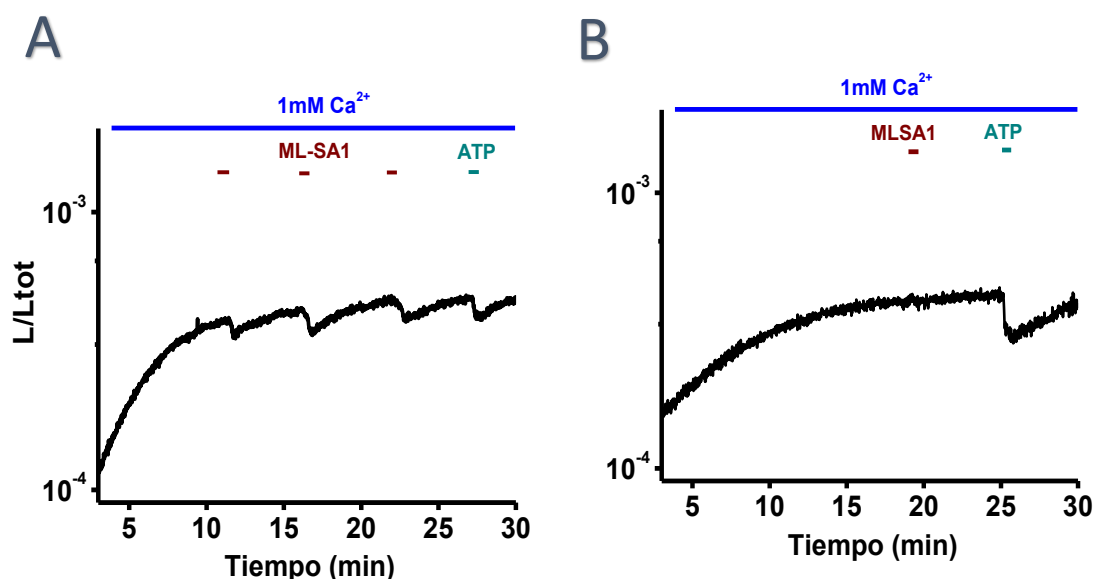


Figura 34. Respuesta a diferentes estímulos en células intactas. Figuras representativas de células HEK293T con expresión de ELGA1, fueron reconstituidas con celenteracina n y se utilizó medio externo para el rellenado (**Tabla 8 B**). Diferencia en la respuesta a ML-SA1 en células intactas con sobreexpresión de TRPML1 con respuesta (izquierda) y sin respuesta (derecha). En ambos casos se utilizó el mismo tratamiento. Representación de la respuesta tras la aplicación de pulsos de ML-SA1 (20 μM , 30 s) y de ATP (100 μM , 30 s).

Se realizaron experimentos similares en células MDCK polarizadas (**Figura 35 A**). Este tipo de célula mostró una descarga casi completa tras la estimulación con ATP, se obtuvo un porcentaje de liberación de $73,72 \pm 17 \%$ ($n=4$) con respecto al estado estacionario.

Finalmente, se examinó la respuesta con ELGA1 en un tipo de célula primaria, en astrocitos corticales de ratón (**Figura 35 B**). La aplicación de ML-SA1 provocó un efecto insignificante en astrocitos, mientras que un pulso de ATP descargó casi por completo el depósito de Ca^{2+} $87,68 \pm 6 \%$ ($n=6$).

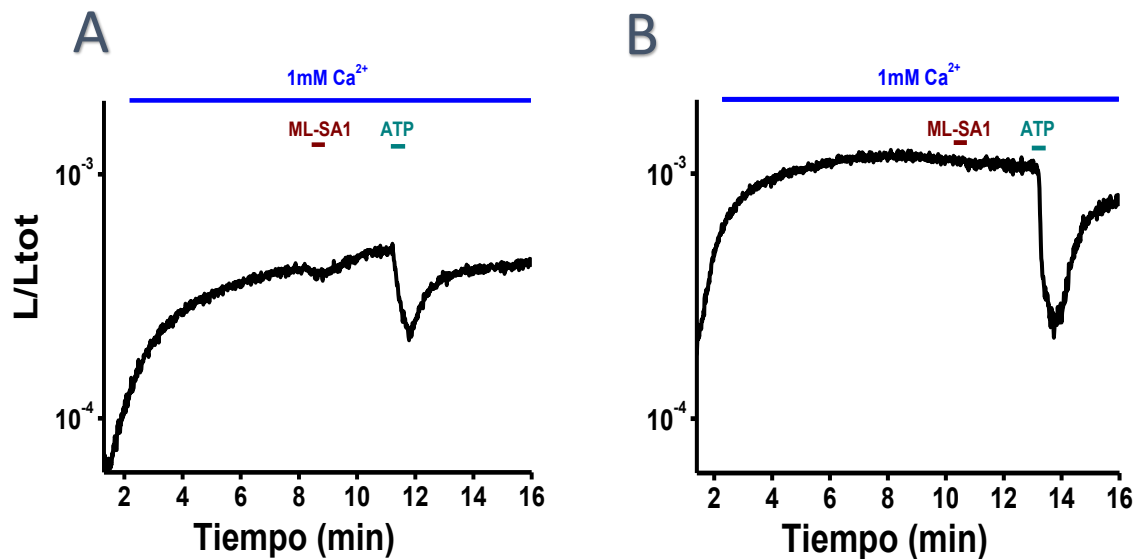


Figura 35. Respuestas a ML-SA1 y ATP. Figuras representativas de células MDCK **(A)** y astrocitos primarios de ratón **(B)** con expresión de ELGA1, fueron reconstituidas con celenteracina n y se utilizó medio externo para el rellenado (**Tabla 8 B**). Representación de la respuesta tras la aplicación de un pulso de ML-SA1 (20 μ M, 30 s) y de ATP (100 μ M, 30 s) utilizando como cofactor de aequerina celenteracina mutada tipo n.

En resumen, todos los experimentos de esta tesis se realizaron con celenteracina n como cofactor y en todos se vació el compartimento con TBH (**punto 3.2.1**). Además, los datos identifican un depósito de Ca^{2+} sensible a IP3, fisiológicamente relevante y generalizado. Al medir con ELGA1, que contiene VAMP7 en su membrana, consideramos a estos compartimentos endolisosoma (EL) a pesar de responder a IP3 y vaciarse con TBH.

Todo esto hizo que fuera esencial buscar un canal de Ca^{2+} típico de EL que apoyara la hipótesis. Como se verá en el siguiente apartado: al permeabilizar las células con digitonina, se siguieron manteniendo las características del vaciado del compartimento y la respuesta a IP3, y además, se consiguieron experimentos reproducibles con TRPML1.

Experimentos en células permeabilizadas

Debido a los resultados obtenidos en intactas con la sobreexpresión de TRPML1, se realizaron experimentos en células permeabilizadas mediante digitonina. Este modelo permite acceder directamente al citosol, manteniendo la $[\text{Ca}^{2+}]$ fija a 200 nM. Es muy

útil para permitir, por ejemplo, la estimulación de los EL con agonistas incapaces de superar la membrana citosólica.

Al comparar células permeabilizadas e intactas no se obtuvo diferencia significativa en el rellenado con ELGA1 (**Figura 36 A**), aunque sí hubo diferencia significativa en la velocidad de rellenado de las células (**Figura 36 B**). Los experimentos en células permeabilizadas permitieron mejores ensayos con sobreexpresión de TRPML1 (se midió respuesta en todos los experimentos), que en células intactas (se midió respuesta en 2 de 6 experimentos). Seguramente el aumento de la reproducibilidad se debió a la capacidad de medir acciones más rápidas en permeabilizadas (quizás, por una mayor accesibilidad a ELGA1 o por diferencias fisiológicas al permeabilizar con digitonina). Los experimentos en permeabilizadas permitieron realizar ensayos de rellenado y vaciado de Ca^{2+} y de comunicación con RE que se expondrán en los siguientes puntos. Entre los diferentes tipos celulares que se comprobaron elegimos las células HEK293T para realizar todos estos experimentos de forma coherente, ya que eran células fáciles de sembrar, los experimentos fueron reproducibles y permitían la coexpresión de TRPML1 y de ELGA1 (lo que disminuye posibles errores).

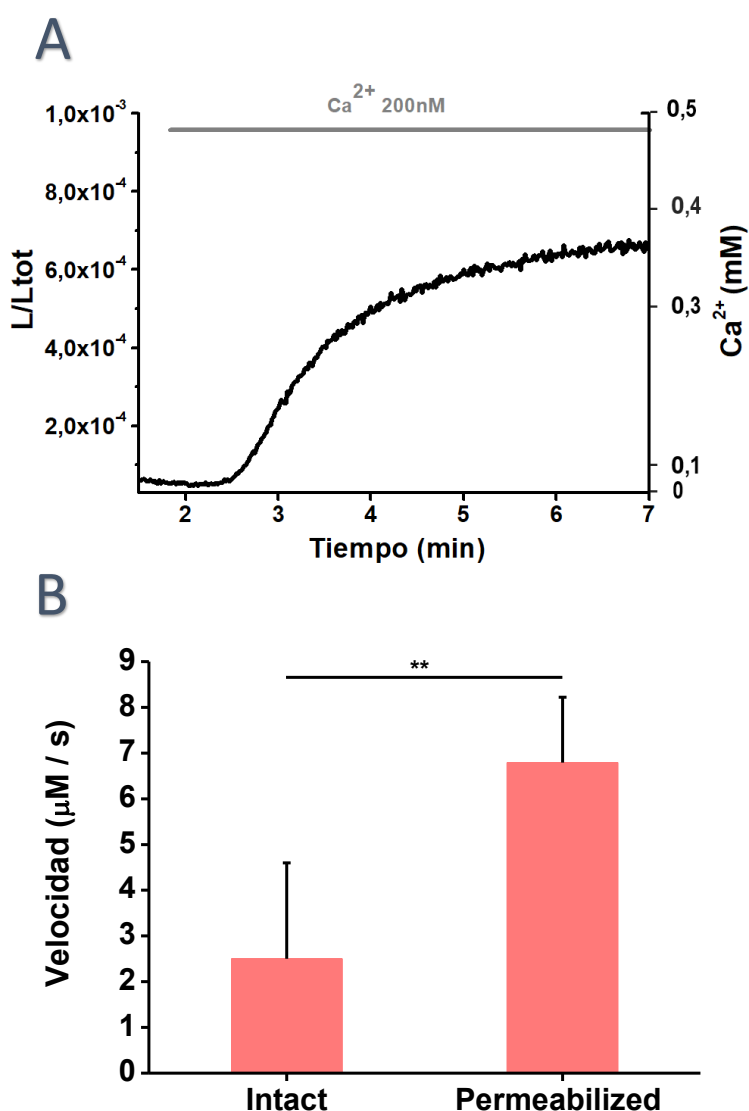


Figura 36. Medidas de luminiscencia. (A) Experimento representativo del rellenado de Ca²⁺ en células permeabilizadas con Dig 50 μM. Una medida de luminiscencia estándar para esta tesis. Realizados en células HEK293T permeabilizadas, rellenadas con medio intracelular (**Tabla 8 A**) a 200 nM de CaCl₂ (tras 1 min en medio intracelular y EGTA a 0.5 mM y 1 min de Dig 50 μM) hasta alcanzar un rellenado máximo del compartimento. Se muestra la relación entre luminiscencia y concentración de Ca²⁺. **(B)** Representación estadística de la velocidad de entrada del ion calcio en células HEK293T permeabilizadas (7 ± 1 μM/s) con respecto a las células intactas (3 ± 2 μM/s) con un p valor de 0,0221.

Por tanto, para controlar directamente la captación y salida de Ca²⁺ dentro del compartimento EL, se han utilizado principalmente células HEK293T que expresaban ELGA1, permeabilizadas posteriormente con Dig (50 μM) en una solución similar al citosol con Ca²⁺ 200 nM (**Tabla 8 A**, **Figura 36**).

3.2 Almacenamiento y liberación del Ca^{2+} medido con ELGA1

Existe la necesidad de una herramienta capaz de medir los cambios de Ca^{2+} en los lisosomas (tan importantes para enfermedades como las neurodegenerativas), pero también existe la necesidad de conocer características fisiológicas como los canales, bombas o transportadores encargados del vaciado y del rellenado de Ca^{2+} .

3.2.1 Rellenado de Ca^{2+} del depósito diana

ELGA1 es una Aequorina, por lo que (como ya se ha comentado en la sección de materiales y métodos) el vaciado del depósito es esencial para poder realizar los ensayos. Es importante conocer los transportadores o canales encargados del proceso de entrada del ion, pero en el caso de los endolisosomas estos son aún desconocidos. Lo que hace que este punto sea excitante, ya que tras varios intentos se ha podido aportar una idea diferente sobre la bomba encargada del vaciado de los endolisosomas.

Experimentos clásicos de lisosoma: GPN, bafilomicina A1, ionóforos

Se realizaron comprobaciones con diferentes candidatos propuestos por la comunidad científica para vaciar los lisosomas (Morgan *et al.*, 2011; Huotari and Helenius, 2011), como inhibidores de la V-ATPasa (bafilomicina A), protonóforos alcalinizadores del lumen (nigericina y monensinas) y GPN (por las siglas del inglés: *Glycyl-L-phenylalanine 2-naphthylamide*).

La bafilomicina A1 (BAfA1, 1 μM) se ha utilizado ampliamente para interrumpir la actividad de los intercambiadores putativos de Ca^{2+} - H^+ . En nuestro caso no se consiguió respuesta luminiscente. También se utilizó la bafilomicina A1 (1 μM) de forma aguda o tras incubación de 1 h, se obtuvo poco efecto sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EL}}$, lo que explicaría la imposibilidad de reconstituir la sonda al utilizarla para el vaciado del orgánulo.

Se usó un cóctel de ionomicina (50 μM), monensina (10 μM), nigericina (10 μM) y CCCP (siglas del inglés: carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) (1 μM) con y sin terc-butilhidroquinona (tBHQ o TBH) (10 μM) (**Figura 37**). Utilizar sólo TBH, sin más compuestos (**Figura 37 A**), produjo mejor consumo de la aequorina (el consumo fue más lento) y mejor recuperación tras los estímulos que con el cóctel (independientemente de si el cóctel contenía o no TBH). El cóctel de compuestos en algunos experimentos no permitió medidas de luminiscencia (**Figura 37 B**), mientras que utilizar sólo TBH fue realmente reproducible, tanto en células intactas como en permeabilizadas, y en todos los tipos celulares.

También se probó GPN (100 μM) que es un agente lisosomotrópico (aumenta el pH del lumen), se utiliza para la liberación de Ca^{2+} desde los lisosomas. La liberación la provoca la lisis de los lisosomas ya que GPN es el sustrato de la catepsina C. En los experimentos de luminiscencia tampoco se obtuvieron resultados, es decir, que no se consiguió vaciar el lumen con este compuesto. Este dato apoya que ELGA1 no se localiza en lisosomas clásicos (Berg *et al.*, 1994).

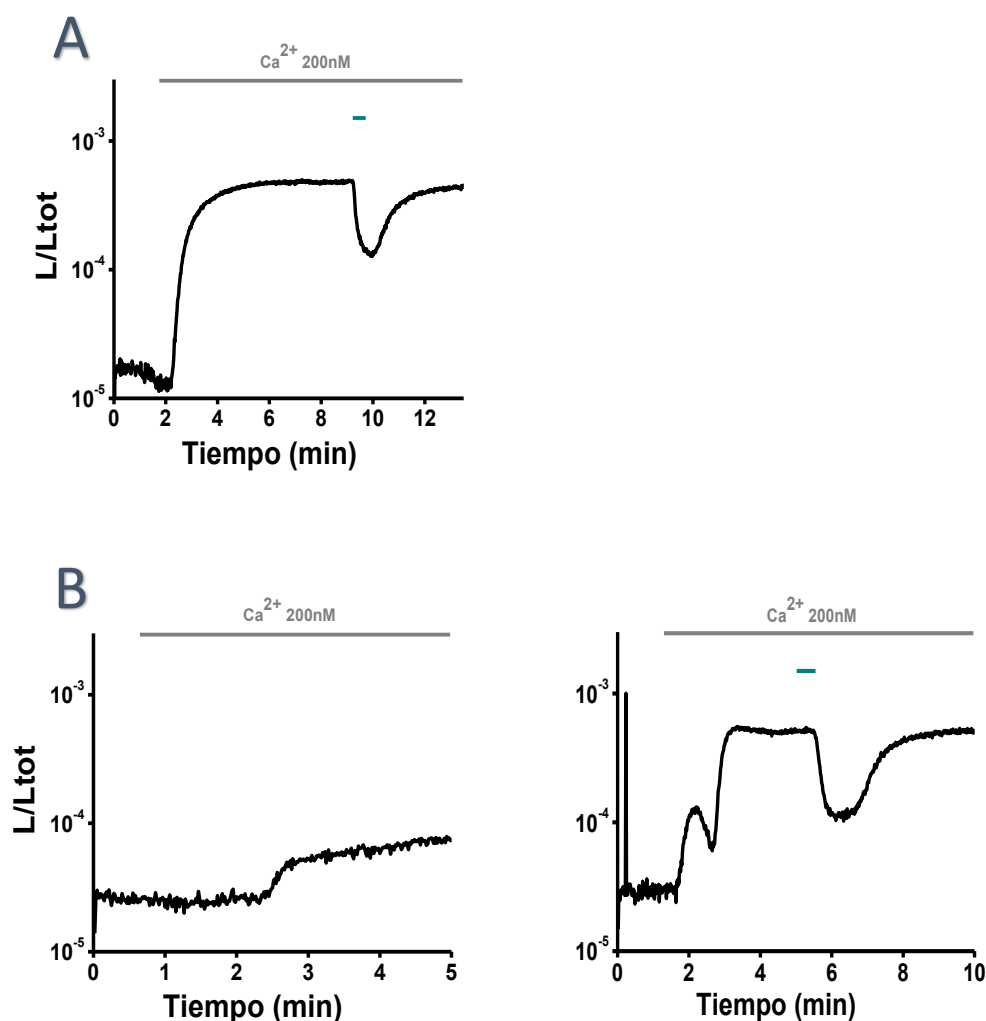


Figura 37. Estrategias de vaciado de Ca^{2+} . El vaciado de Ca^{2+} del compartimento evita el consumo de ELGA1 al reconstituir la aequorina con la celenteracina (su cofactor). Experimentos en células HEK293T, con sobreexpresión de ELGA1 y uso de celenteracina n; durante el experimento se utilizó medio interno 200 nM para el rellenado de Ca^{2+} (Tabla 8 A). (A) Representación de experimentos de rellenado y de respuesta a estímulo (IP3 (2 μM , 30 s) (en verde), estos estímulos se conocerán en detalle más adelante) con ELGA1 al utilizar sólo TBH 10 μM durante 10 min (en medio externo con EGTA 0.5 mM) para el vaciado antes de la reconstitución de la aequorina. (B) Representaciones del rellenado del lumen y de la respuesta. Se utilizó un cóctel de compuestos (de ionomicina 50 μM , monensina 10 μM , nigericina 10 μM y CCCP 1 μM con y sin TBH 10 μM) para el vaciado de Ca^{2+} del compartimento. Sin rellenado (izquierda) y con rellenado anormal (derecha), también se observa una recuperación más lenta de la respuesta a estímulo marcado en verde (y se obtuvo un consumo rápido de la aequorina, dato no mostrado).

La falta de señal luminiscente indica que la aequorina de ELGA1 se consume, probablemente porque el depósito diana no se había vaciado de Ca^{2+} . Estos datos son congruentes con la localización de ELGA1 en un compartimento no muy ácido y que contienen una bomba de Ca^{2+} sensible a TBH.

Entrada de Ca^{2+} debido a SERCA

La incubación con el inhibidor reversible de SERCA: TBH, al contrario que con los inhibidores de la V-ATPasa y con los ionóforos, produjo una respuesta de luminiscencia reproducible y con un buen consumo de la aequorina de ELGA1 (**Figura 38 A**). Bajo estas condiciones, la perfusión con un medio similar al citosol ($[\text{Ca}^{2+}]$ libre = 200 nM), permitió la captación de Ca^{2+} a una velocidad de $6,9 \pm 1,4 \mu\text{M/s}$, alcanzando un valor de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EL}}$ en el estado estacionario de $396 \pm 30 \mu\text{M}$ ($n = 42$) en $3 \pm 0,6$ min ($n = 7$) (**Figura 36 y 38 A**).

La captación de Ca^{2+} depende del ATP, ya que en ausencia de éste se inhibe el rellenado de Ca^{2+} en un $90 \pm 4 \%$, $n = 7$ (**Figura 38 B y E**), además, al reponer el ATP se volvió a rellenar el compartimento, indicando un carácter reversible. Por otro lado, los inhibidores específicos de SERCA, irreversible: tapsigargina (200 nM) o reversible: TBH (10 μM), incubados durante 5 minutos, provocaron una inhibición completa de la captación de Ca^{2+} de los EL del $98 \pm 1 \%$, $n = 7$ (**Figura 38 C**) y $97 \pm 2 \%$, $n = 8$ (**Figura 38 D**) respectivamente, con respecto al control (**Figura 38 A y E**). Tras el lavado de TBH se restableció rápidamente la captación de Ca^{2+} , hasta la tasa similar a los controles (**Figura 38 D**). Estos resultados fueron los esperados, ya que los experimentos se consiguen gracias al vaciado del orgánulo utilizando TBH 10 μM durante 10 min. Se puede comprobar el resumen de los porcentajes en la **figura 38 E**.

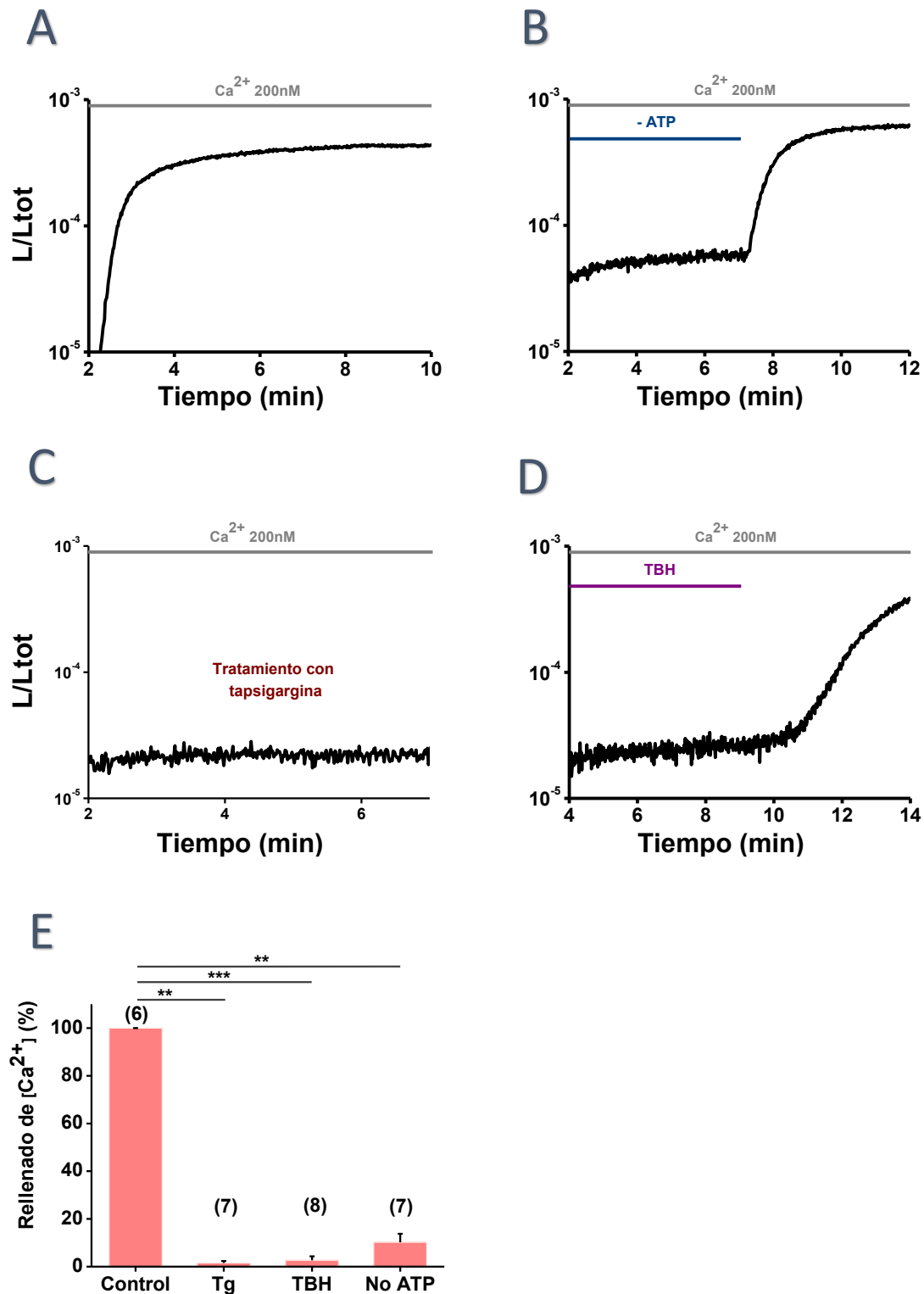


Figura 38. Rellenado de Ca^{2+} . Experimentos en células HEK293T con sobreexpresión de ELGA1 y uso de celenteracina n. Rellenadas con medio intracelular (Tabla 8 A) a 200 nM de $CaCl_2$. (A) Representación del relleno de Ca^{2+} a modo de control. Se utilizó TBH 10 μ M durante 10 min y medio externo con EGTA 0.5 mM para el vaciado de Ca^{2+} del compartimento (así se evita el consumo de ELGA1) y posterior reconstitución de la aequorina. (B) Representación de la incapacidad de relleno en las mismas condiciones que los controles pero utilizando, durante el vaciado, 10min Taspigargina 200 nM y medio

externo con EGTA 0.5 mM y durante la reconstitución medio interno EGTA 0.5 mM. **(C)** Representación de la incapacidad de rellenado en presencia de TBH (mismas condiciones de vaciado y reconstitución de la aequorina que el control). **(D)** Representación de la incapacidad de rellenado en presencia de medio sin ATP (mismo medio de rellenado pero sin ATP y mismas condiciones de vaciado y reconstitución que el control) **(E)** Representación estadística de la diferencia en porcentaje entre el control y las diferentes estrategias para el rellenado del compartimento. Existe diferencia significativa entre los valores máximos de luminiscencia de los controles y de los experimentos con Tapsigargina (Tg; con p valor= 0.0022), con TBH (p valor= 0.0007) y con el medio sin ATP (p valor= 0.0012). A su vez, no hay diferencia significativa entre Tg y TBH (p valor de 0.9504) mientras que sí existe entre aquellos con medio sin ATP y los realizados con Tg (p valor= 0.0216) y con TBH (p valor= 0.0289). Se ha utilizado el test de Mann Whitney de los máximos de luminiscencia (que correlaciona con los máximos de $[Ca^{2+}]$) durante el experimento.

La siguiente comprobación fue la de vaciar el orgánulo una vez que éste se rellenó de Ca^{2+} . Una vez que el lumen del EL se rellenó de Ca^{2+} y se llegó a un nivel estable se volvió a vaciar utilizando diferentes estrategias. El uso de 0,1 mM de EGTA provocó una disminución progresiva y completa de la $[Ca^{2+}]_{EL}$ a una velocidad de $\sim 2.4 \mu M/s$ (datos no mostrados). De la misma manera, la eliminación de ATP o la aplicación de tBHQ, ya fuera en presencia o ausencia de Ca^{2+} , también vaciaron el depósito de Ca^{2+} de los EL. Las cuantificaciones estadísticas de la velocidad de salida de Ca^{2+} de los EL se muestran en la **Figura 39**.

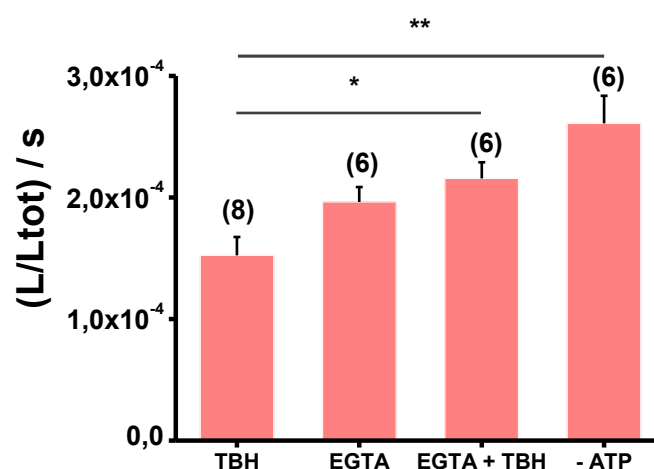


Figura 39. Posible participación de SERCA en el Vaciado de Ca^{2+} . Representación estadística de experimentos en células HEK293T, con sobreexpresión de ELGA1 y uso de celenteracina n. Medio interno para el rellenado (**Tabla 8 A**) a 200 nM de $CaCl_2$ y posterior uso de TBH, EGTA, EGTA y TBH o medio sin ATP (de izquierda a derecha) para vaciar el compartimento. Encontramos una diferencia no significativa entre los experimentos con TBH y aquellos con EGTA (con un p valor de 0,087), mientras que sí es significativa entre los experimentos sólo con TBH y aquellos con TBH y EGTA 0.5 mM (con un p valor de 0,012). Existe una diferencia muy significativa entre los experimentos de vaciado realizados con TBH y los de experimentos con medio sin ATP (con un p valor de 0,0041). Se ha utilizado el test two-tailed con corrección de Welch comparando las velocidades de disminución de $[Ca^{2+}]$.

En conjunto, estos resultados indican que el EL puede acumular grandes cantidades de Ca^{2+} seguramente a través de un mecanismo SERCA.

3.2.2 Liberación de Ca^{2+} del depósito diana

Se ha podido medir la liberación de Ca^{2+} generada a través de los canales de Ca^{2+} , que hoy en día se consideran característicos de endolisosomas, como los TRPML1 o los TPCs gracias a ELGA1. Además, se ha determinado que hay respuesta de los receptores de IP3, tanto desde el exterior de las células (utilizando ATP) como desde el citosol de las células, gracias a la permeabilización de éstas (con Dig 50uM), utilizando directamente IP3.

Canal TRPML1

TRPML1 (de las siglas en inglés: *Transient receptor potential mucolipin 1*) es un canal localizado en endosomas tardíos y lisosomas. Al ser la localización más probable de ELGA1, decidimos explorar esta vía y utilizar este canal como control de localización en EL. Se realizaron experimentos de colocalización de TRPML1 y ELGA1 en confocal.

Se utilizó ELGA1 y TRPML1 tanto en células fijadas como en células vivas. La colocalización disminuyó cualitativamente en células vivas (**Figura 40**), lo que implicaría que una proporción de ELGA se encuentra en vesículas ácidas, ya que al ser fijadas la fluorescencia de GFP no se ve comprometida. Estos resultados serían consistentes con ELGA como un reportero de Ca^{2+} en una fracción del sistema endolisosomal. Según nuestros datos de coeficiente de Manders en células fijadas, hay una colocalización de ELGA con TRPML1 de 0.68 ± 0.03 y una colocalización de TRPML1 con ELGA de 0.58 ± 0.04 , es decir, que TRPML1 se encuentra en zonas en las que no se encuentra ELGA en mayor proporción que al contrario. En resultado para el coeficiente de Pearson fue de 0.70 ± 0.02 (n= 18) para células fijadas y de 0.60 ± 0.03 (n=17) para células vivas.

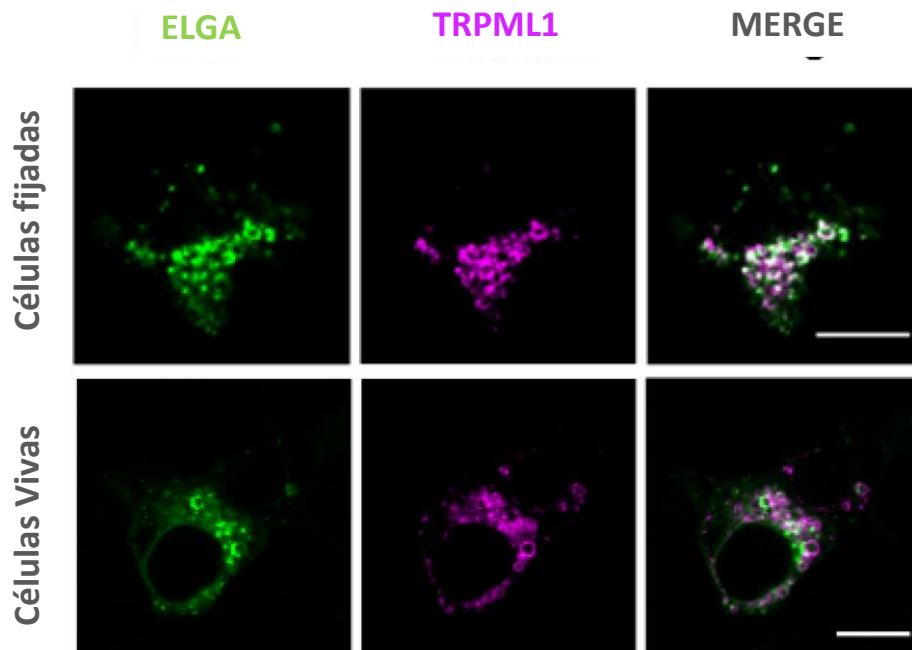


Figura 40. Imágenes de colocalización entre TRPML1 y ELGA realizadas en confocal. **(A)** Imágenes representativas de células HEK293T realizadas en confocal. Transfectadas con ELGA (en verde) y TRPML1 (en magenta). Fila superior: células fijadas tras 24 h desde la transfección con Metanol al 100% 10min a -20°C . Fila inferior células sin fijar y medidas en confocal con medio externo para el rellenado (**Tabla 8 B**) con 1mM de CaCl_2 . Barra de escala para todas las imágenes, 10 μm .

También se realizaron experimentos de bioluminiscencia. En los experimentos de luminiscencia se activó el canal con el agonista sintético específico y permeable a membrana: ML-SA1. En células HEK293T controles, con TRPML1 fisiológico (sin sobreexpresión de TRPML1), no hubo respuesta (**Figura 41 A**). Por otro lado, se transfectó el canal TRPML1 de forma transitoria y ML-SA1 (20 μM , 30 s) produjo una liberación robusta de Ca^{2+} en EL del $40 \pm 3 \%$ ($n = 6$) con respecto al estado estacionario (**Figura 41 B**). Tras la aplicación, ML-SA1 mostró un tiempo de retardo de ~ 20 s y continuó liberando Ca^{2+} una vez retirado el agonista (**Figura 41 B**). Las aplicaciones consecutivas de ML-SA1 provocaron respuestas de amplitud similar, lo que indica que no hubo desensibilización del canal. El tiempo para rellenar el depósito después del lavado fue de ~ 5 min (**Figura 41 C**).

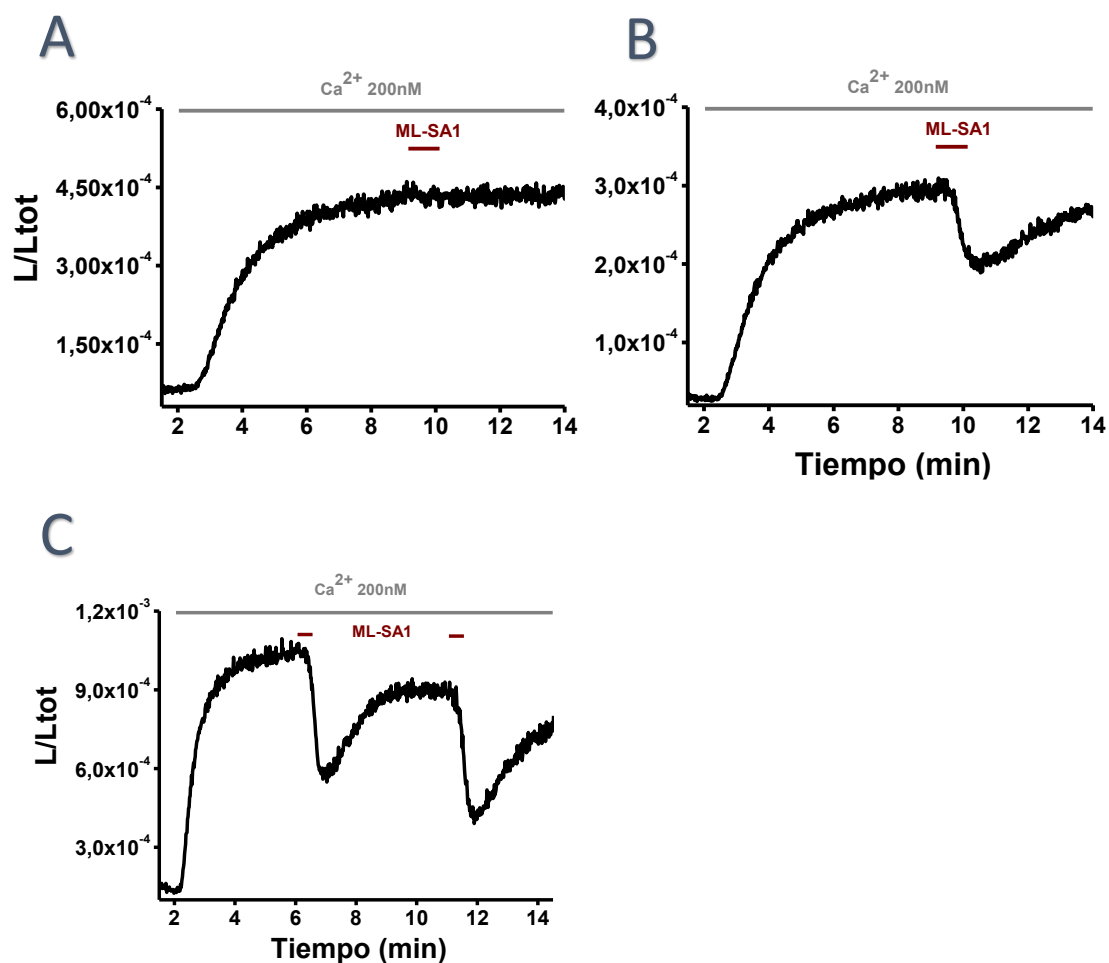


Figura 41. Respuesta a ML-SA1. Células HEK293T transfectadas con ELGA1. Se usó celenteracina n y se rellenaron con medio interno (Tabla 8 A) 200 nM de $CaCl_2$. Uso del agonista ML-SA1 (20 μ M, 30 s) (de las siglas en inglés: *Mucolipin Synthetic Agonist 1*). Figuras representativas de experimentos sin sobreexpresión de TRPML1 (A), con sobreexpresión de TRPML1 (B) y tras varias aplicaciones de ML-SA1 (20 μ M, 30 s) en células con sobreexpresión de TRPML1 (C).

∴ Dosis-Respuesta ML-SA1

La relación dosis-respuesta completa de la liberación de Ca^{2+} mostró un valor de EC50 de $6,77 \pm 0,9 \mu$ M (Figura 42).

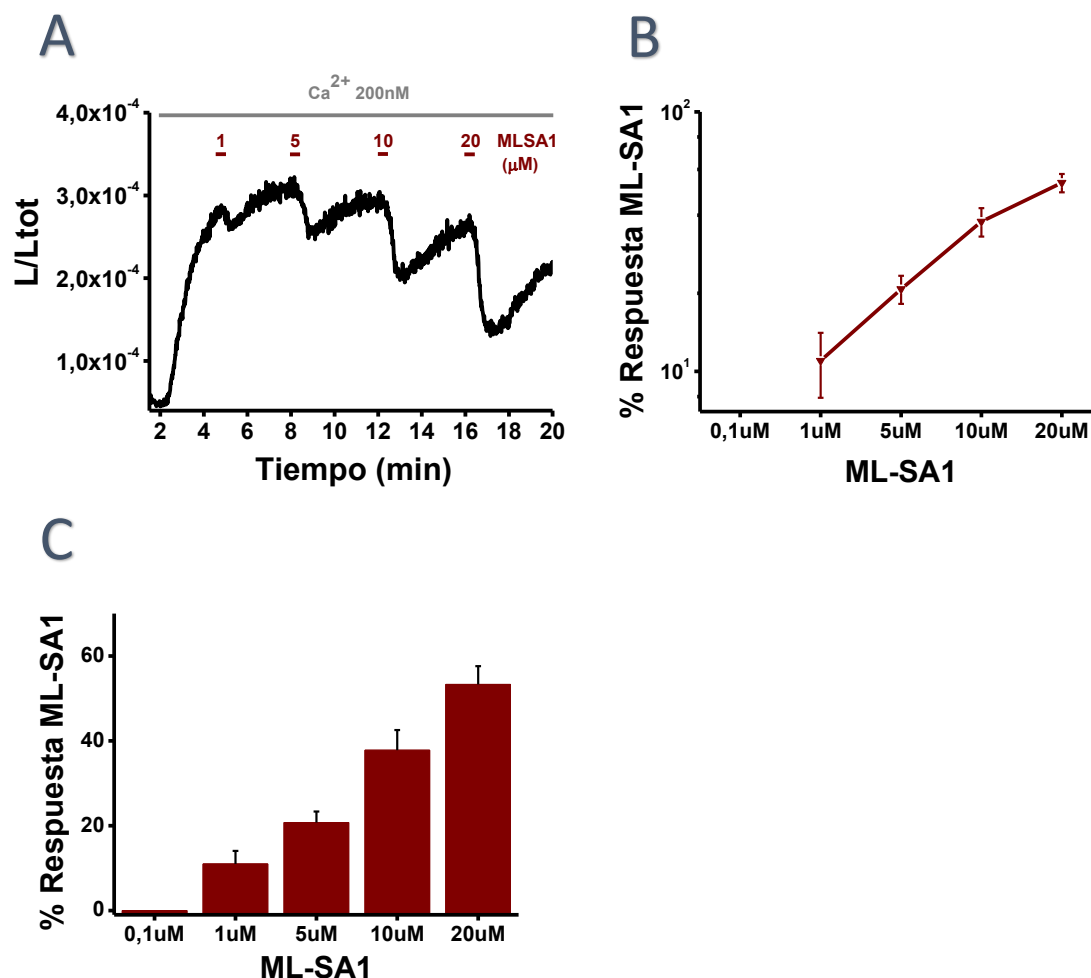


Figura 42. Experimento de dosis respuesta de ML-SA1. Experimentos en células HEK293T con coexpresión de ELGA1 y TRPML1 y uso de medio interno para el rellenado (**Tabla 8 A**). **(A)** Figura representativa de la respuesta a concentraciones crecientes de ML-SA1: 1, 5, 10 y 20 μM. **(B)** Representación de la gráfica de dosis-Respuesta con EC 50 para ML-SA1 de $6,77 \pm 0,9$ μM de Ca²⁺. **(C)** Representación estadística del porcentaje de respuesta a las diferentes concentraciones de ML-SA1. Diferencia significativa entre 0,1 y 1 μM (p valor de 0,029). No hay diferencia significativa entre 1 y 5 μM (p valor de 0,11) ni entre 5 y 10 μM (p valor de 0,057). Sí que se encuentra diferencia significativa entre 10 y 20 μM (p valor de 0,028). En todos los casos se aplicó el test de Mann Whitney.

∴ Inhibidores de TRPML1

A pesar de no existir respuesta de ML-SA1 en controles, se procedió a la transfección de D3471K (incapacita la función del poro TRPML1) (**Figura 43 A**). En células permeabilizadas existe una diferencia significativa entre controles y transfectadas, pero la respuesta no es visible en ningún experimento con y sin transfección. La respuesta a ML-SA1 fue bloqueada completamente por el antagonista específico de TRPML: ML-SI1 (20 μM, 2.5min) (**Figura 43 B**). Los datos de sobreexpresión e inhibición del canal de Ca²⁺ TRPML1 se resumen en la **Figura 43 C**. Estos experimentos se utilizaron para

corroborar a nivel funcional y farmacológico, que ELGA1 tiene la capacidad de medir el Ca^{2+} a través de TRPML1 (el cual se localiza en EL).

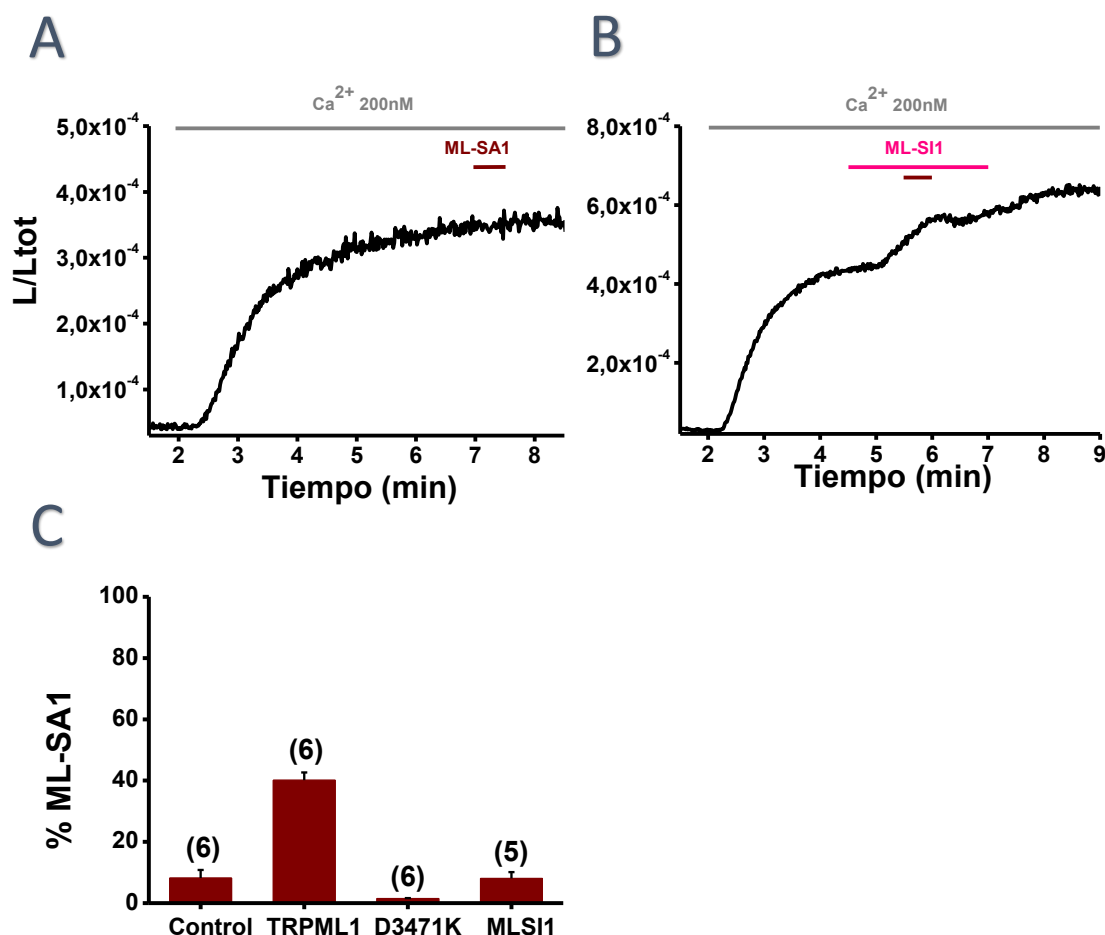


Figura 43. Inhibición y sobreexpresión de TRPML1. Experimentos realizados con células HEK293T con sobreexpresión de TRPML1 y expresión de ELGA1. Se utilizó medio interno para el rellenado de Ca^{2+} de las células (Tabla 8 A). **(A)** Incapacitación del poro TRPML1 como control negativo a nivel bioquímico mediante el uso de plásmido D3471K. La diferencia en la respuesta a ML-SA1 (20 μM , 30 s) con respecto al control fue significativa (p valor= 0.0152 con Mann Whitney). **(B)** Inhibición de TRPML1 aplicado en flujo continuo con y sin ML-SA1 en células con sobreexpresión de TRPML1. **(C)** Representación estadística de las diferencias en la respuesta a ML-SA1 (20 μM , 30 s) calculadas en porcentaje. Existe diferencia significativa entre los controles y las células con sobre expresión de TRPML1 (p valor= 0.0022) y entre los controles y células perfundidas con el inhibidor del poro ML-SA1 (p valor= 0.0043); además, existe diferencia significativa entre las células tratadas con ML-SI1 y las tratadas con el plásmido D3471 (anula el canal TRPML1, conocido como muerte del poro) (p valor= 0.0022). Se consiguió menos respuesta con D3471K que con ML-SI1. El número entre paréntesis representa el número de experimentos.

La sobreexpresión de TRPML1 produjo respuesta en HeLa y HEK293T. Las respuestas de HEK293T se pueden ver representadas a lo largo de la tesis, y las de HeLa, principalmente en intactas. No sobreexpresamos TRPML1 en células primarias por la dificultad en la expresión de plásmidos.

Canales TPCs

Al explorar las vías de liberación endógena de Ca^{2+} , también se examinó el efecto del NAADP, que activa los canales TPC (de las siglas en inglés: *Two-pore channels*) en EL. El NAADP provocó una respuesta reversible rápida que liberó el 25 % del contenido de Ca^{2+} de la EL, tanto en células HEK293T como en células HeLa. Pero las respuestas sólo fueron observables en alrededor del ~50 % de los ensayos.

Se realizaron algunas pruebas con diferentes plásmidos que sobreexpresaban TPC1 o TPC2, solos o formando parte de constructos con LSM o JPT. Estos constructos mejoran la respuesta a NAADP y a otros agonistas generados en el laboratorio del doctor Sandip Patel (Department of Cell and Developmental Biology, University College London, UK). Los resultados de las pruebas no fueron concluyentes. En muchos casos el rellenado de Ca^{2+} tras sobreexpresar los diferentes plásmidos fue aparentemente diferente al de los controles (**Figura 44 A**).

Además de los diferentes constructos también se realizaron pruebas con diferentes agonistas generados en el laboratorio del doctor Sandip Patel. Tampoco se consiguieron resultados concluyentes. Si se necesitara seguir indagando, las mejores opciones de plásmidos y agonistas medidos con ELGA1 parecen ser: la respuesta de IP3 con sobreexpresión de TPC2 (**Figura 44 B, color rosa**), y la respuesta de TPC-A1-N + TPC-A1-P en células con sobreexpresión de TPC1 (**Figura 44 B, color azul**). En cualquier caso, no parece que ELGA1 consiga las mejores respuesta a agonistas de TPCs.

Además de los ensayos en bioluminiscancia realizamos colocalización en confocal con células transfectadas con TPC2 y tras 24h fijadas con metanol (datos no mostrados). Los resultados fueron de 0.57 ± 0.026 para el coeficiente de Pearson y de 0.36 ± 0.04 para el coeficiente de Maders de ELGA con respecto a TPC2 y de 0.74 para el coeficiente de Maders de TPC2 con respecto a ELGA. Se trata de células fijadas así que sería posible que la colocalización de TPC con respecto a ELGA se encuentre en orgánulos ácidos en los que ELGA no puede medir los cambios del Ca^{2+} .

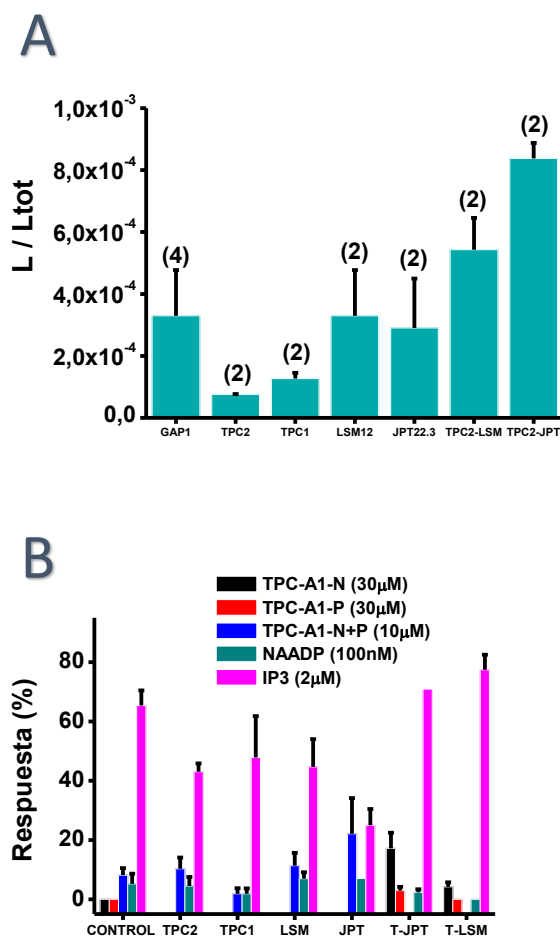


Figura 44. TPC1 y 2. Células HEK293T cotransfectadas con ELGA1 y los diferentes constructos de TPCs proporcionados por el laboratorio del doctor Sandip Patel (Department of Cell and Developmental Biology, University College London, UK). Se utilizó medio interno para el rellenado de Ca^{2+} de las células (Tabla 8 A). **(A)** Representación de la luminiscencia alcanzada en el lumen del orgánulo según los diferentes constructos que mejoran la respuesta de TPC 1 y 2. El número total de experimentos fue entre 2 y 4. **(B)** Respuesta en % de los diferentes agonistas para TPCs de los diferentes constructos que mejoran la respuesta de TPC 1 y 2. Se muestran en diferentes colores la respuesta de distintos agonistas para cada constructo.

Canal IP3 (IP3R)

Se exploraron las vías de liberación endógena de Ca^{2+} . Se estudió el efecto de la adición de IP3 (2 μM , 30 s) que, sorprendentemente, produjo una gran liberación de Ca^{2+} del depósito EL, lo que redujo la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EL}}$ luminal de células HEK293T en un $73.9 \pm 3.9 \%$ (n = 6) (**Figura 45**). Las aplicaciones consecutivas de IP3 provocaron respuestas de amplitud similar, lo que indica que no hubo desensibilización del canal.

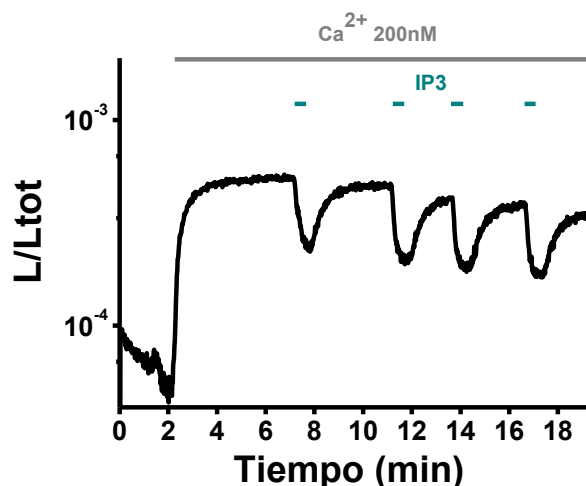


Figura 45. Respuesta fisiológica a IP3. Experimentos realizados con células HEK293T con expresión de ELGA1 y uso de celenteracina n como cofactor. Se utilizó medio interno para el rellenado de Ca^{2+} de las células (**Tabla 8 A**). Figura representativa de la respuesta a IP3 (2 μM , 30 s) aplicado de forma consecutiva.

∴ Dosis-Respuesta IP3

El efecto de IP3 fue dependiente de la concentración. Desde 0,01 μM se produjo un efecto pequeño pero detectable y 10 μM se estimó como el efecto máximo, comparable al efecto de 30 μM , la concentración más alta de IP₃ utilizada (**Figura 46 A y B**).

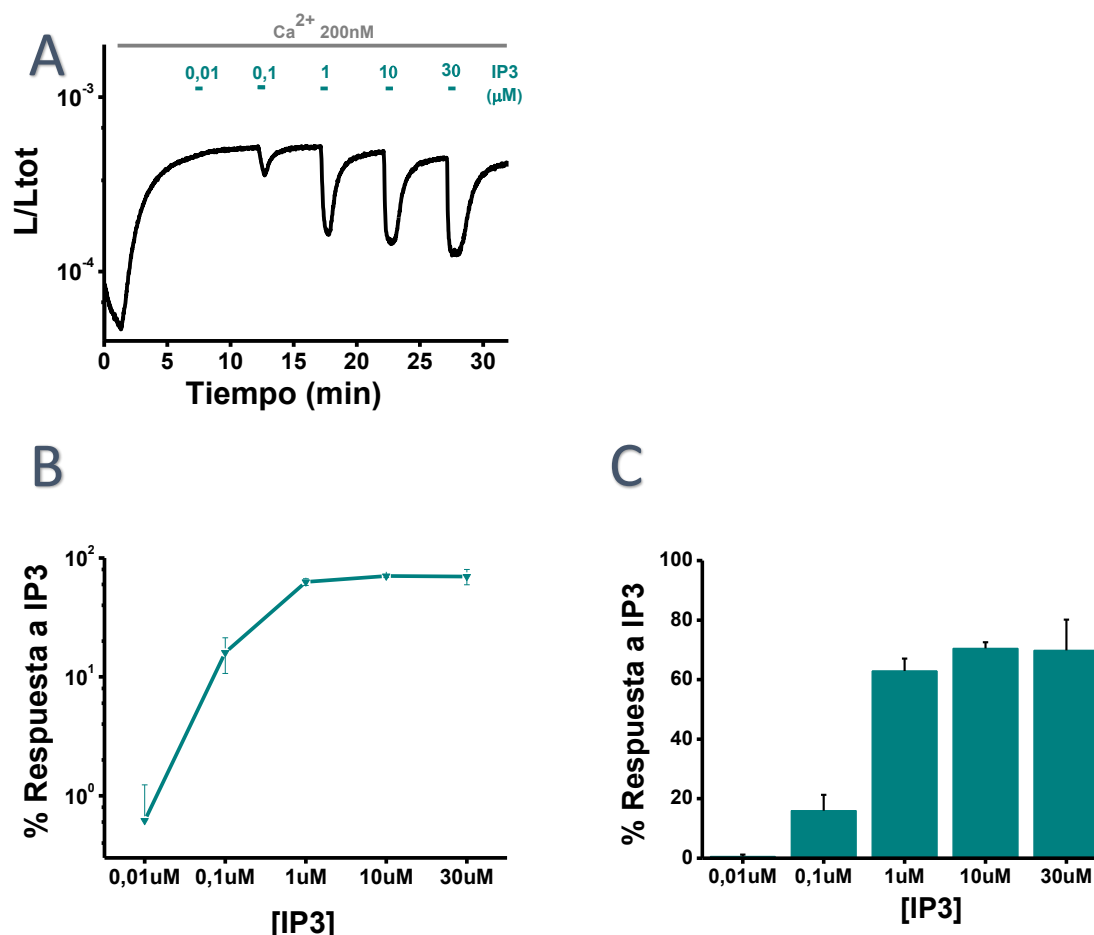


Figura 46. Experimento de dosis respuesta de IP3. Experimentos en células HEK293T con expresión de ELGA1 y uso de medio interno para el rellenado (**Tabla 8 A**). **(A)** Figura representativa de la respuesta a concentraciones crecientes de IP3: 0,01; 0,1; 1; 10 y 30 μM . **(B)** EC 50 para IP3 de $0,19 \pm 0,06 \mu M$ de Ca^{2+} . **(C)** Representación estadística del porcentaje de respuesta entre las diferentes concentraciones de IP3. Diferencia significativa entre 0.01 y 0.1 (p valor de 0,026) y entre 0,1 y 1 (p valor de 0.0002) aplicando un t test no pareado con corrección de Welch. Diferencia no significativa entre 1 μM y 10 μM (p valor de 0.24) aplicando un test de Mann Whitney.

∴ Línea celular mutante HEK293T: IP3R-3KO

Se evaluó la especificidad de la respuesta de IP3 (**Figura 47 A**). Se utilizó la línea mutante HEK293 nula para las tres isoformas de IP3R (IP3-3KO) generada mediante tecnología CRISPR/Cas9 (Alzayady *et al.*, 2016). La liberación de Ca^{2+} inducida por IP3 fue anulada ($1,7 \pm 1,4 \%$; $n = 8$), como se muestra en la **Figura 47 B**. En estas células, no hay diferencia significativa entre los controles y la velocidad del rellenado de Ca^{2+} de EL de $7,6 \pm 1,3 \mu M/s$ (**Figura 47 C**) ni en la $[Ca^{2+}]_{EL}$ alcanzada en el estado estacionario de $399 \pm 57 \mu M$, $n = 8$ (**Figura 47 D**). También examinamos el efecto de IP3 en células IP3-3KO tras la reexpresión de IP3R1. Como se muestra en la **Figura 47 E**, la respuesta de IP3 se rescató parcialmente ($54,44 \pm 1,20 \%$; $n = 7$).

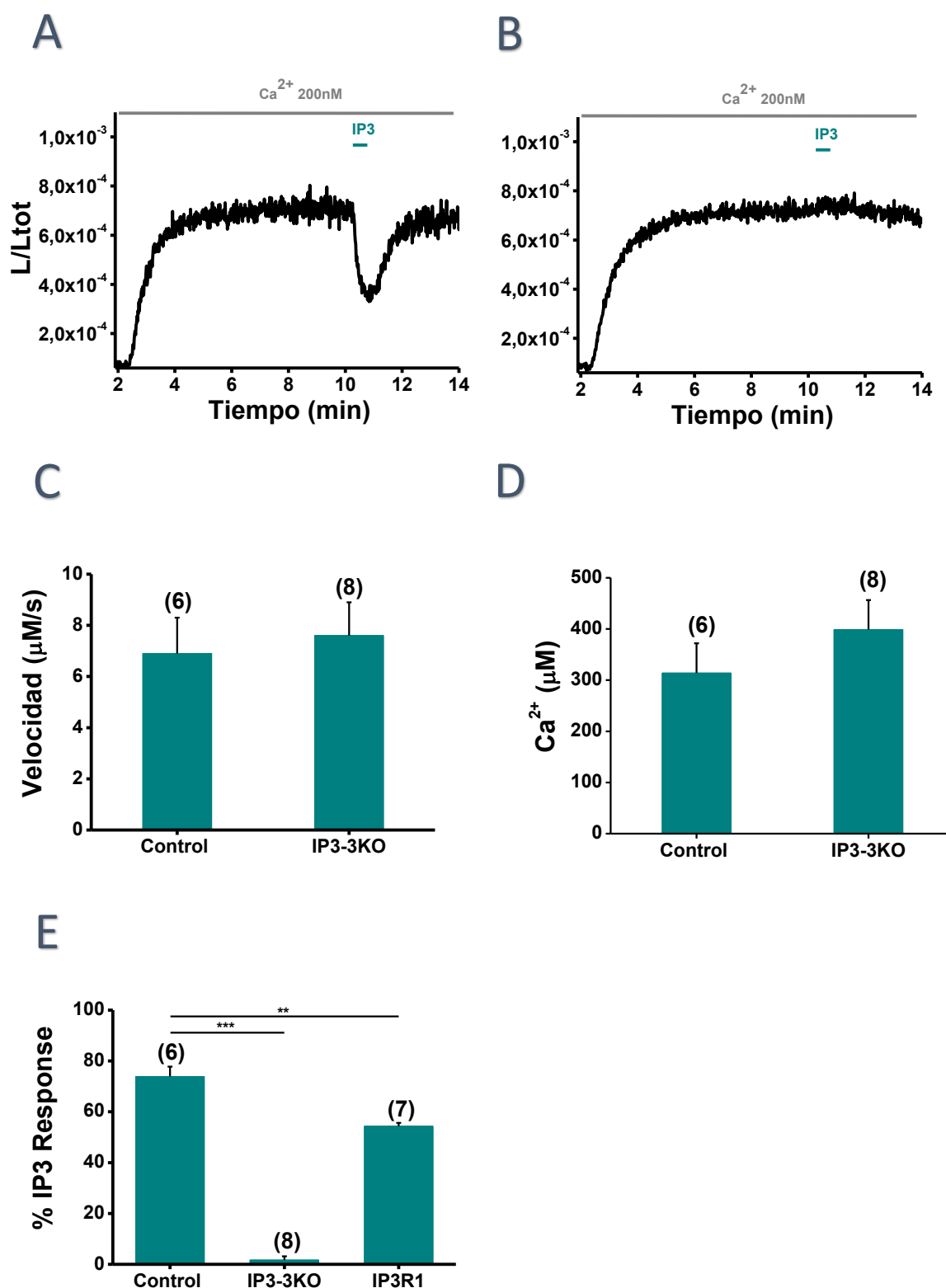


Figura 47. Respuesta del receptor de IP3 en ausencia de las isoformas 1, 2 y 3 y posterior recuperación de IP3R1. Se utilizó la línea celular HEK293T sin IP3R (IP3-3KO) generada mediante tecnología CRISPR/Cas9 (Alzayady *et al.*, 2016), y medio interno para el rellenado (**Tabla 8 A**). **(A)** Experimento control representativo de la respuesta de IP3 (2 μM, 30 s) a modo de control utilizando HEK293T. **(B)** Experimento representativo de la falta de respuesta de IP3 (2 μM, 30 s) utilizando IP3-3KO. Representación estadística de la falta de diferencia significativa entre los controles y los clones IP3-3KO tanto en velocidad (con un p

Valor de 0.8) **(C)**, como en el rellenado de Ca^{2+} (con un p valor de 0.1) **(D)**. **(E)** Representación estadística de la diferencia de respuesta entre los controles con HEK293 (izquierda) y los clones IP3-3KO (centro), con la recuperación parcial en la respuesta a IP3 posterior, al reexpresar el receptor IP3R1. Número total de experimentos representados entre paréntesis para cada grupo.

∴ Experimentos en diferentes tipos celulares

La liberación de IP3 fue muy reproducible en todos los tipos de células evaluados con ELGA como en células HeLa (**Figura 48 A**), fibroblastos humanos (**Figura 48 B**) y astrocitos corticales murinos (**Figura 48 C**). En estos experimentos preliminares ELGA se expresó con plásmidos en el caso de HeLa, y con virus en el caso de astrocitos y de fibroblastos.

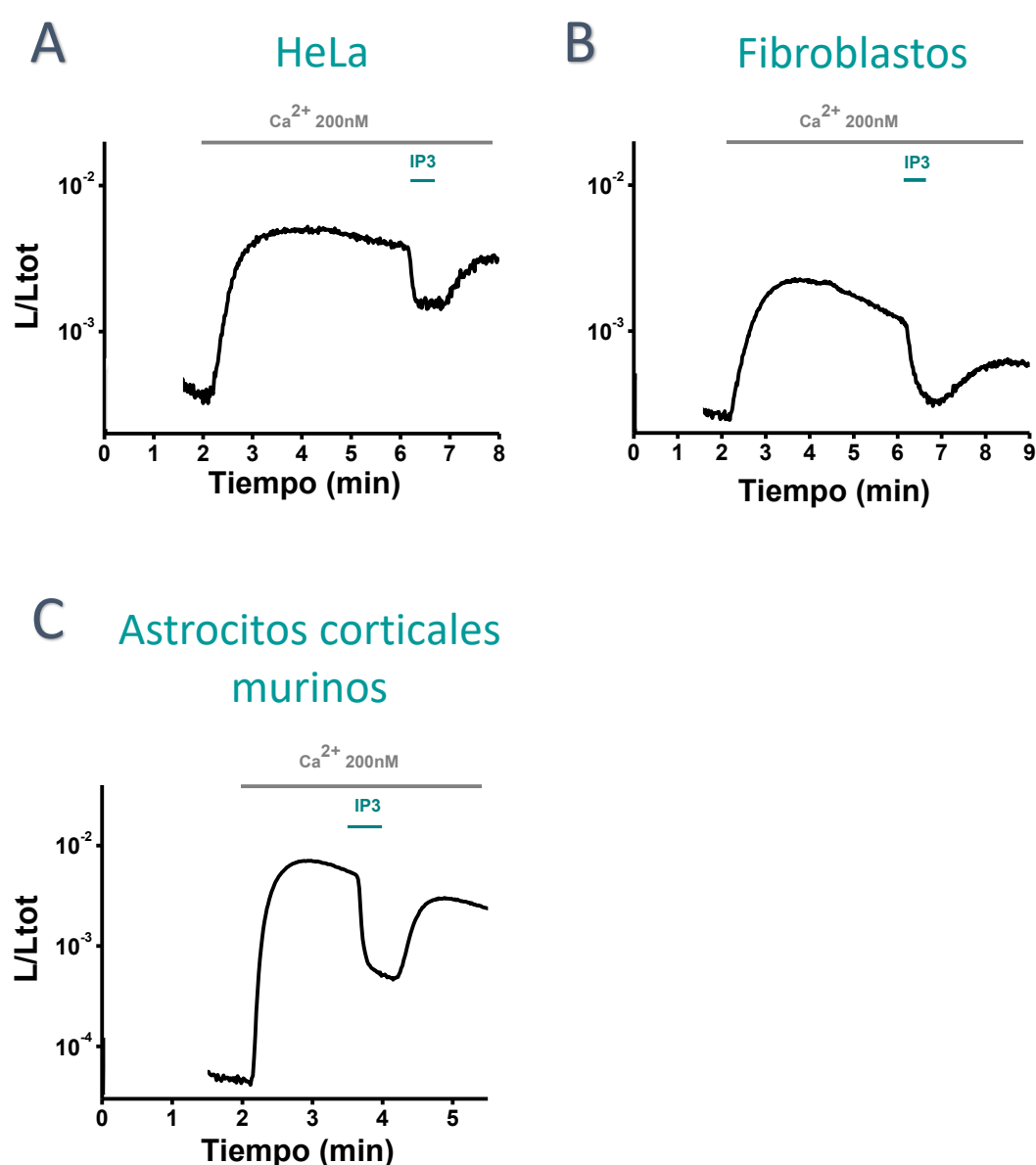


Figura 48. Figuras representativas de la respuesta de IP3 en diferentes tipos celulares utilizando ELGA. **(A)** HeLa a 80 mil c/p con ELGA. **(B)** Fibroblasto 302 15mil c/p con 10 μ L de ELGA. **(C)** Astrocitos primarios

en confluencia, con un solo pase y sembrados en cristal con poli-I 0.002 mg / mL. Infección con VAZ 10 μ L con ELGA1.

En conjunto, los enfoques genéticos y farmacológicos revelan la presencia de IP3R funcionales dentro del depósito de Ca^{2+} de EL respaldada por las robustas respuestas de Ca^{2+} lumbinales.

3.3 Relación entre EL y RE. Experimentos de TRPML1 en RE

Consideramos la posibilidad de que una fracción de la sonda pudiera estar dirigida incorrectamente al RE, debido a la similitud en la captación y liberación de Ca^{2+} entre este orgánulo y el EL. Se intentó diferenciar entre los dos orgánulos expresando TRPML1, que como se ha comentado anteriormente es uno de los canales principales de Ca^{2+} de EL. Por esta razón, en trabajos posteriores sería interesante realizar colocalización en confocal entre ER y TRPML1.

En los experimentos de luminiscencia en células **permeabilizadas**, a diferencia de lo que esperábamos, tras transfectar TRPML1, ML-SA1 generó respuesta también en RE, y además, no se detectó diferencia significativa con respecto a la respuesta en EL (con un p valor de 0.89 del test *two taile*). Por otro lado, y de forma esperanzadora, la expresión de TRPML1 redujo drásticamente los depósitos de Ca^{2+} informados por ELGA1 (**Figura 49**), mientras que los niveles de Ca^{2+} en el RE no cambiaron tras la expresión de TRPML1 (se utilizó la misma aequorina que para EL pero dirigida al RE) (**Figura 49**). Este resultado indica que el canal es específicamente permeable en el depósito de EL. Estos datos funcionales distinguen los depósitos de Ca^{2+} de EL y de RE.

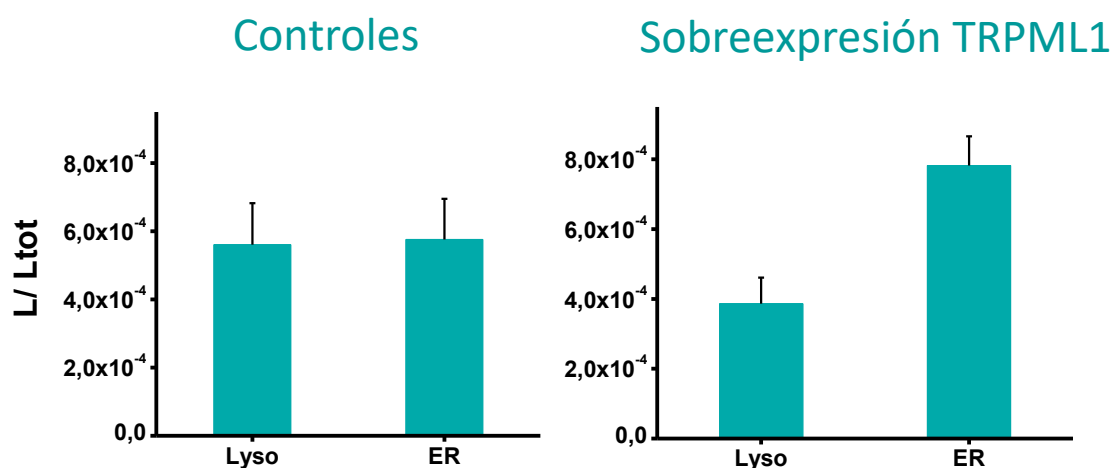


Figura 49. Diferencia en el almacenamiento de Ca^{2+} tras sobreexpresar TRPML1 en células permeabilizadas. No existe diferencia significativa entre los controles (p valor de 0.96 con two-taile) ni en retículo con y sin sobreexpresión de TRPML1 (p valor de 0.34 con two-taile). Existe diferencia muy significativa entre RE y EL con sobreexpresión de TRPML1 (p valor de 0.0057 con two-taile).

En células **intactas**, dentro del lumen del RE, las respuestas a ML-SA1 en controles y células transfectadas con TRPML1 no muestran diferencia significativa. Mientras que en el lumen de EL, sí existe diferencia significativa en la respuesta a ML-SA1 entre controles y transfectadas (**Figura 50 A y B**). Por otro lado, no hay diferencia significativa en la respuesta a ML-SA1 entre EL y ER ni en controles ni en sobreexpresadas con TRPML1 (**Figura 50 A y B**).

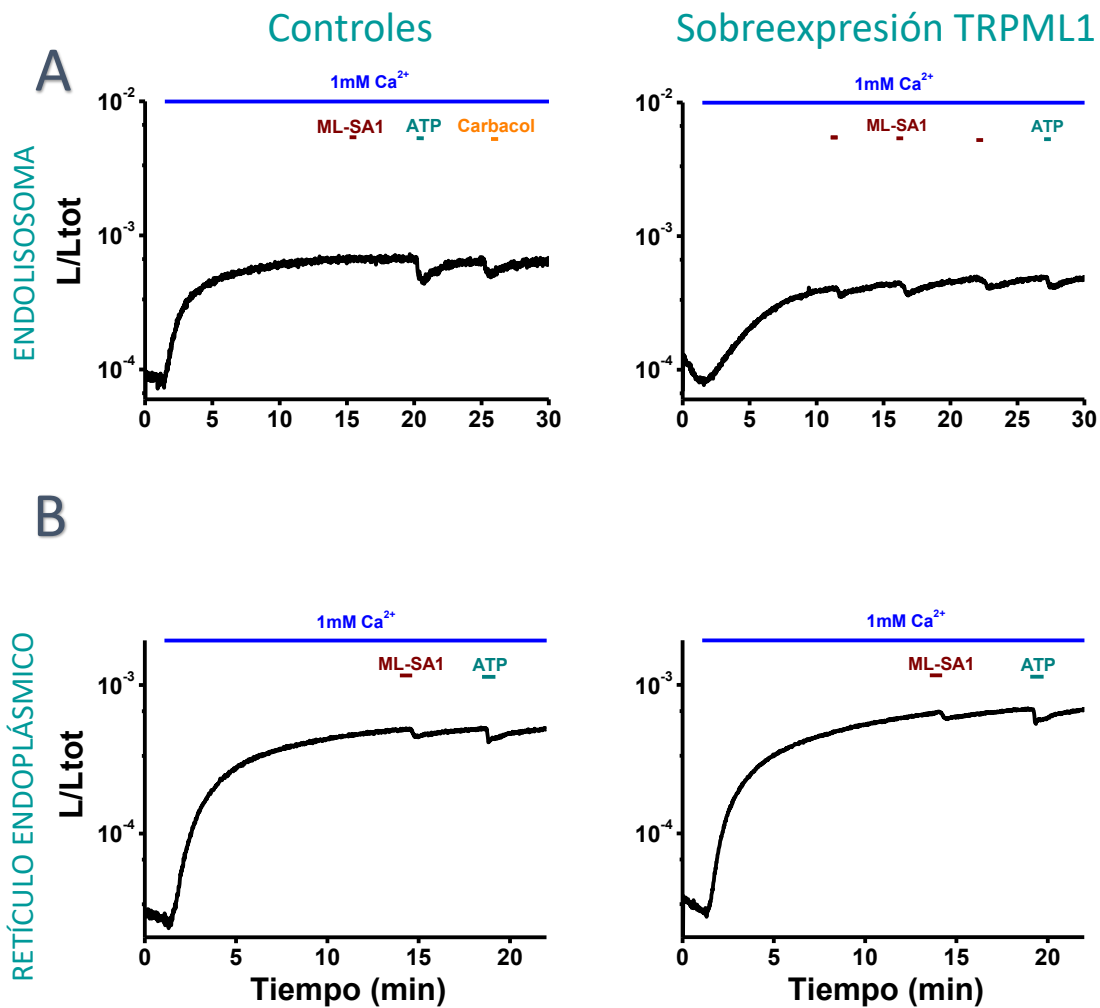


Figura 50. Diferencia en la respuesta a ML-SA1 en células intactas. Representación de células intactas (**A**) transfectadas con ELGA1 para los controles (n=6) y cotransfectadas con TRPML1 (n=7). Figuras representativas de las respuestas a ML-SA1 (20 μ M, 30 s) y ATP (100 μ M, 30 s). Existe diferencia significativa entre controles y sobreexpresión de TRPML1 en EL (p valor de 0.019 del test de Mann-Whitney). (**B**) células intactas transfectadas sólo con ERGA1 (n=7) para los controles y cotransfectadas con TRPML1. Figuras representativas de las respuestas a ML-SA1 (20 μ M, 30s) y ATP (100 μ M, 30 s). No hay diferencia significativa entre controles y sobreexpresión de TRPML1 en ER (p valor de 0.85 del test de Mann Whitney). Por otro lado, no hay diferencia significativa en la respuesta a ML-SA1 entre EL y ER en controles, columna de la izquierda (p valor de 0.13 del test de Mann-Whitney) ni en sobreexpresadas con TRPML1, columna de la derecha (p valor de 0.20 del test de Mann-Whitney).

Con respecto al rellenado del lumen, la diferencia entre ER y EL se mantiene en intactas, en este caso también entre los controles sin sobreexpresión (p Valor= 0.007, $n=7$) además de en las células con sobreexpresión de TRPML1 (p valor= 0.022, $n=7$) (**Figura 51**) (como ocurría en permeabilizadas (**Figura 49**)).

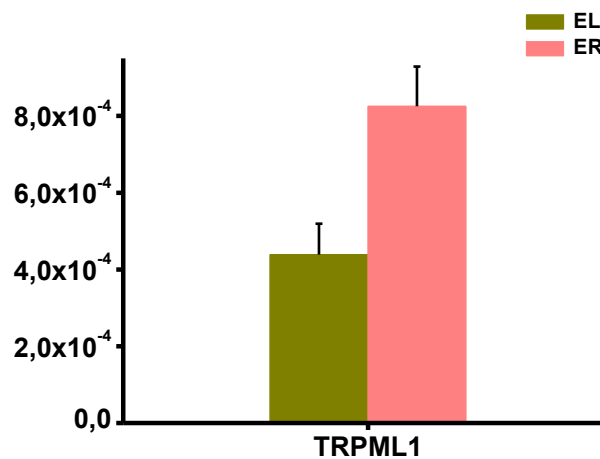


Figura 51. Diferencia en el almacenamiento del Ca^{2+} tras sobreexpresar TRPML1 en células intactas. Existe diferencia significativa entre retículo y endolisosomas con sobreexpresión de TRPML1 (p valor de 0.0022 con Mann-Whitney).

Buscando una posible diferencia en la respuesta a ML-SA1 entre EL y ER, se realizaron algunas pruebas utilizando BAPTA en lugar de EGTA en células permeabilizadas. La diferencia en la velocidad de respuesta de los dos orgánulos no fue concluyente, por lo que no se continuó indagando la posibilidad.

04 | DISCUSIÓN

4.1. Calibración de un nuevo sensor de Ca^{2+} localizado en la vía endocítica

El objetivo general de la tesis era medir la $[\text{Ca}^{2+}]$ luminal de organelas ácidas y su capacidad para liberar el ion ante estímulos específicos. Generar un indicador de Ca^{2+} capaz de medir en el lumen de las organelas ácidas es realmente complicado debido a sus características de pH (Saeed and Ashraf, 2009). Por eso, las medidas de Ca^{2+} de forma indirecta se realizaron en los años 90 (Haller *et al.*, 1996), pero las medidas directas, es decir, lumbinales, no fueron posibles hasta varios años después. Las medidas directas se consiguieron con indicadores de Ca^{2+} basados en BAPTA (Christensen, Myers and Swanson, 2002), el problema fue que debían ser calibrados para cada medida utilizando indicadores de pH, lo que hace que la medida del vaciado del orgánulo y el análisis de los resultados sean muy complicados, y poco versátiles. Además, existen sondas de Ca^{2+} fluorescentes GECO (Albrecht *et al.*, 2015) capaces de medir en el lumen, pero a diferencia de lo que ocurre con los indicadores basados en BAPTA, los resultados sobre la $[\text{Ca}^{2+}]$ intraluminares no coinciden con las medidas realizadas en los años 90 de forma indirecta. Por otro lado, también existen clones con GCAMP3 (Garrity *et al.*, 2016) capaces de medir Ca^{2+} en la cara citosólica (no en el lumen) del canal TRPML1 específico de endolisosomas (**Figura 18**), el verdadero problema, es que los cambios de Ca^{2+} citosólico medidos por el indicador podrían ocurrir por acciones celulares diferentes a las experimentales, ya que es un indicador de alta afinidad típico para medir cambios de Ca^{2+} en citosol.

Debido a la necesidad de encontrar un indicador de Ca^{2+} (ver sección 1.5) capaz de medir en el lumen de las organelas ácidas por su posible implicación en enfermedades como la mucopolipidosis de tipo IV (MLIV) (Peng, Wong and Krainc, 2020; Kilpatrick *et al.*, 2016) y neurodegenerativas como Alzheimer o Huntington (Xu and Ren, 2015); y debido a la dificultad para conseguirlo, en torno a 2011 en nuestro laboratorio, el doctor Francisco Aulestia generó una sonda (ELGA) y unos clones HeLa-ELGA, que podían medir potencialmente la $[\text{Ca}^{2+}]$ en el lumen de las organelas. ELGA utilizaba un localizador específico de organelas ácidas VAMP7 (D'Esposito *et al.*, 1996) y una Aequorina de baja afinidad (Rodríguez-García *et al.*, 2014; Rodríguez-Prados *et al.*, 2015) orientada hacia la cara luminal (**Figura 24**) y capaz de medir en bioluminiscencia. Como se ha comentado, las medida bioluminiscentes debería ser menos sensible a los cambios de pH que las sondas fluorescentes (Mitchell *et al.*, 2001). El problema fue que no se conseguía reproducir el rellenado de los orgánulos. Años después, los resultados comenzaron a ser reproducibles y han dado lugar a esta tesis. La reproducibilidad se debió al uso de buenos modelos como HeLa, HEK293T y astrocitos primarios muscarínicos (descartando los clones HeLa-ELGA) y a la utilización de concentraciones celulares adecuadas y bien adheridas al pocillo. Si se utilizaban pocas células éstas se levantaban, debido al flujo constante que permite la perfusión (**Figura 20**), y si se utilizaban demasiadas células, había tal muerte celular que no se conseguía suficiente respuesta como para ser

detectada por el luminómetro. Además, se necesitó una puesta a punto de transfecciones y contrasfecciones. Los primeros resultados de bioluminiscencia reproducibles se obtuvieron en 2019 en células intactas HeLa y astrocitos primarios intactos con ELGA y después se pusieron a punto los experimentos en células principalmente HEK293T permeabilizadas. La permeabilización se realizó con Dig 50 μM durante 1min en lugar de Dig 100 μM (**Figura 21** y punto sobre calibración) porque se mejoraba el rellenado, seguramente por la gran [colesterol] que se encuentran en los LE (muy importante para la motilidad y maduración **Figura 6**); la solución en la que se diluyó la Dig fue similar al citosol con Ca^{2+} 200 nM y sin ATP para evitar la posible entrada de Ca^{2+} por las bombas (**Tabla 8 A, Figura 36**). Seguidamente en 2021, se generó por la doctora Alba del Río, la sonda ELGA1 con la que se realizaron todos los experimentos de la tesis (**Figura 26**). Los resultados fueron aún mejores con ELGA1, ya que permite experimentos más largos por su menor afinidad por el Ca^{2+} . Además, las concentraciones máximas de Ca^{2+} con bioluminiscencia (**Figuras 36 y 38**) eran las esperadas en células intactas ($249 \pm 65 \mu\text{M}$ ($n = 6$)) y en permeabilizadas ($396 \pm 30 \mu\text{M}$ ($n = 42$)); mientras que, por el contrario, con ELGA en permeabilizadas se obtuvo menor concentración ($147 \pm 10 \mu\text{M}$ ($n = 7$)) que en células intactas ($213 \pm 10 \mu\text{M}$ ($n = 7$)), lo que hacía pensar que en los ensayos en permeabilizadas estaba ocurriendo algo que escapaban a nuestro control. Por tanto, realizamos pruebas utilizando Western Blot (imágenes no mostradas) que nos hicieron ver que el peso y las bandas de ELGA1 eran los esperados, mientras que ELGA aparecían en dos bandas (como si la Aequorina estuviera dividida en dos partes). Debido a estos datos se utilizó la sonda ELGA sólo como método de marcaje de EL en microscopía, ya que VAMP7 estaba intacta y la EGFP es más brillante que la GFPuv. Finalmente, se intentó generar una sonda utilizando como plásmido de expresión pcdna3 en lugar de phsv (**Figura 22**) para aumentar el nivel de expresión de ELGA1 en las células, pero el clonaje no fue posible.

Una vez conseguida ELGA1 y la reproducibilidad en el rellenado, necesitábamos saber si ELGA1 era capaz de medir a pHs ácidos; en que localización reportaba (de entre las posibles para VAMP7); los mecanismos de rellenado de los orgánulos (para poder vaciarlos) y si ELGA1 era capaz de medir la salida de Ca^{2+} con estímulos específicos.

4.2. Localización de ELGA1

Una vez se corroboró la capacidad de medida de ELGA1 teníamos que saber cuál es el orgánulo en el que se localiza ELGA1 (de entre los ácidos en los que se expresa VAMP7). Se utilizaron ensayos de pH y de colocalizaciones mediante fluorescencia (entre ELGA1 y diferentes marcadores) para poder acercarnos a la respuesta. Con respecto a los ensayos de calibración/rendimiento a pH ácido realizados por otros autores (Mitchell *et al.*, 2001; Ronco *et al.*, 2015; SantoDomingo *et al.*, 2010), se determinó que las

aequorinas no eran significativamente sensibles al entorno de pH, al contrario de lo que ocurría con las sondas basadas en GFP. En esta tesis hemos podido determinar a partir de qué rango de pH entre 4.5 y 7 (**Figura 28 y 29**) es sensible la aequorina, y qué combinaciones de aequorinas (**Figura 19 y 24**) se deben utilizar, según las $[Ca^{2+}]$ a medir y los rangos de pH que contenga el orgánulo. En nuestro caso, se puede medir a partir de 5.5 utilizando celenteracina nativa y a partir de 6 utilizando celenteracina n, debido a las $[Ca^{2+}]$ de los orgánulos ácidos debemos utilizar celenteracina n, lo que nos obliga a medir a partir de pH 6.

En este sentido, según algunos estudios, VAMP7 parece estar relacionada en la [vía endocítica](#) con eventos de fusión y en el tráfico vesicular, en concreto, en el transporte entre LE-lisosomas (Rossi *et al.*, 2004). Si además se añade, como se ha comentado durante los resultados, que AP3 está relacionado con la ubicación de la sonda principalmente en endosomas tardíos (Chaineau, Danglot and Galli, 2009; Kent *et al.*, 2012), la opción de LE parece la más probable a priori. Los datos y resultados obtenidos durante la tesis en los experimentos de confocal (**Figura 27**) y de pH (**Figuras 28 y 29**) apuntan a una localización en orgánulos ligeramente ácidos. Dentro de la vía endocítica (**Figura 2**) ELGA no puede medir cambios de Ca^{2+} a un pH inferior a 5.5 en estado fisiológico (**Figuras 28 B y 30 A**), lo que excluiría los lisosomas clásicos. Sí que puede observarse un aumento de la fluorescencia en células fijadas con respecto a células vivas (**Figuras 27 y 30**), lo que implica que se encuentra en orgánulos más ácidos pero no es capaz de medir; además, según los datos de colocalización (**Figuras 27**) utilizando anticuerpos contra EEA1 y medidos en confocal, ELGA no está localizada en endosomas tempranos (con un coeficiente de Pearsonde $0,27 \pm 0,03$ ($n=10$)), y además, como se puede observar en la **Figura 40** colocaliza con el canal de Ca^{2+} TRPML1 (con un coeficiente de Pearsonde 0.70 ± 0.02 ($n= 18$) en células fijadas), que es un canal típico de endosomas tardíos y lisosomas (Elfmark, 2023). Con respecto al canal TRPML1 se han obtenido resultados muy reproducibles en los experimentos de liberación de Ca^{2+} con su agonista ML-SA1. Por tanto, todos estos datos hacen pensar que efectivamente ELGA1 se encuentra localizado en los endosomas tardíos, endolisosomas y lisosomas, pero sólo puede reportar en orgánulos con pH igual o inferior a 6. En este sentido, se sabe que mTORC1 se activa principalmente por la translocación a la membrana de los LE, donde colocaliza con TRPML1 (Li *et al.*, 2016). Por tanto, se podría utilizar esta colocalización para ayudar a determinar si realmente nos encontramos en endosomas tardíos y en qué condiciones de alimentación, ya que mTORC1 se traduce cuando hay suficiente alimento en el contexto de los endosomas tardíos (**Figura 4**). Además, con esta colocalización se podría poner a punto el estado alimenticio en el que deberían encontrarse las células para conseguir resultados más controlados, de forma que pudieran compararse mejor los resultados de diferentes tipos celulares.

Otra [localización diferente a la de LE](#) podrían ser otros orgánulos con el rango de pH adecuado y que contenga nuestro localizador VAMP7. Otros autores relacionan VAMP7

con la vía secretora, en concreto, con la fusión de vesículas secretoras derivadas del aparato de Golgi con la membrana plasmática (Chaineau, Danglot and Galli, 2009). En este sentido, es posible que se encontrara en algunas vesículas cercanas al TNG, ya que en nuestras medidas con anticuerpos anti-tgn46 (imágenes no mostradas) en células HEK293T, se obtuvo un coeficiente de Pearson de 0.39 ± 0.04 ($n=10$), que era el resultado esperado, pero afinando más, al evaluar el coeficiente de Mander, pudimos ver que hay una menor colocalización de ELGA con respecto a TNG (coeficiente de Mander de ELGA con respecto a Golgi de 0.23 ± 0.04) mientras que hay una mayor colocalización de TNG con respecto a ELGA1 (coeficiente de Mander de Golgi con respecto a ELGA de 0.70 ± 0.06). Es decir, que para el TNG de HEK293T, ELGA1 parece bastante importante. Por otro lado, la colocalización con RE (**Figura 27**) utilizando erTA (sonda generada en el laboratorio para medir Ca^{2+} en RE) es de $0,42 \pm 0,02$ ($n=10$) en Pearson y de $0,39 \pm 0,05$ ($n=10$) en Manders ELGA / ER (y de $0,12 \pm 0,02$ ($n=10$) en Manders ER / ELGA. Teniendo en cuenta el nivel de colocalización no significativo pero llamativo de ELGA con TGN y con ER, es interesante nombrar un trabajo realizado en *Drosophila* (Zhou *et al.*, 2023), ya que éste describe una alta cantidad de lisosomas (aunque no de LE) en las zonas de ERES-Golgi. La hipótesis de los autores es que podría existir un inicial GERL en el que habría una estrecha relación entre Golgi-RE-lisosomas. Y aunque con ELGA1 no se podría medir el lisosomas debido al pH ácido, existe otro estudio, en el que Johnson y colaboradores, han descubierto lisosomas más periféricos y con pH más neutro de 5.98 (Johnson *et al.*, 2016). En este sentido, en las imágenes de fluorescencia de ELGA en confocal puede observarse, de forma cualitativa, una localización periférica, por lo que podríamos estar midiendo este tipo de lisosomas. En el caso de LE, los estudios comentan que una localización periférica o nuclear depende del tipo celular (Huotari and Helenius, 2011), pero también se ha comentado que una mayor concentración de Rab7 (típica de los LE) en la membrana implica una localización más nuclear de los endosomas (Johnson *et al.*, 2016) (al menos en HeLa); mientras que una mayor concentración de Arl8b frente a Rab7 implica una localización periférica (Johnson *et al.*, 2016). Por último, también hay autores que proponen una maduración circular de los lisosomas (Bright, Davis and Luzio, 2016) que incluye a endosomas tardíos, endolisosomas, lisosomas y lisosomas terminales. Conteniendo los lisosomas terminales un pH más neutro (y además son capaces no sólo de almacenar y sino también de hacer madurar las hidrolasas que se activarán posteriormente en endolisosomas) (**Figura 3**). Es decir, que en este caso ELGA1 podría medir en lisosomas periféricos, en GERL, en endosomas tardíos, en endolisosomas y en lisosomas terminales.

Por otro lado, un ambiente iónico podría afectar la **maduración de los endosomas**. La $[\text{Ca}^{2+}]$ parece más baja al principio de la vía endocítica y luego aumenta (Huotari and Helenius, 2011). Por tanto, saber este dato también debería ayudar a conocer la localización de ELGA1. Desde los primeros experimentos realizados con ELGA1 se observaron indicios de que el compartimento objetivo era de alta $[\text{Ca}^{2+}]$, ya que la medida con ELGA1 no es posible sin el previo vaciado de los depósitos de Ca^{2+} y sin una

combinación aequorina-cofactor muy poco sensible al ion. Ambos aspectos son necesarios para medir en compartimentos de alta $[Ca^{2+}]$ utilizando aequorinas. Finalmente, gracias a los experimentos de luminiscencia concluimos que la $[Ca^{2+}]$ según ELGA1 es bastante alta, de unos $396 \pm 30 \mu M$ en células HEK293T permeabilizadas (ver punto 3.1.4). Por tanto, si nos encontráramos en la vía endocítica, es muy probable que se localice en las zonas más maduras, en torno a endosomas tardíos. Algunos autores abogan por diferentes poblaciones de LE según las concentraciones de EGFR y PI(3)P o de BMP/LBPA (Huotari and Helenius, 2011). PI(3,5)P2 se genera a partir de PI(3)P en los LE. Durante los experimentos de luminiscencia, en un principio no se consiguieron resultados con PI(3,5)P2, aunque finalmente, en las mismas condiciones experimentales, se acabaron consiguiendo resultados (datos conseguidos por otras investigadoras del laboratorio). Por tanto, sería posible que pudiéramos medir en varias poblaciones de EL con ELGA1. PI(3,5)P2 es importante principalmente en la vía degradativa, activa directamente canales de Ca^{2+} y regula la fusión y la fisión (Huotari and Helenius, 2011). La inhibición de la V-ATPasa con Bafilomicina A no cambió los resultados de luminiscencia, lo que podría significar que no nos encontramos en el paso de cargo entre EL y LE ni en la maduración clásica de EL a lisosomas (Huotari and Helenius, 2011).

4.3. Almacenamiento de Ca^{2+} en los orgánulos ácidos medidos con ELGA1

Otro punto realmente importante para poder conseguir medidas de Ca^{2+} es conocer la forma de entrada del Ca^{2+} (**Figuras 13 y 14**) en la localización de ELGA1, ya que es imposible medir con Aequorinas si no se vacían antes los depósitos de alto Ca^{2+} (**Figura 19, 20 y 21**). En un primer momento se intentó el vaciado con diferentes candidatos propuestos por la comunidad científica (**Figura 37**) como GPN, Baf-A1 y protonóforos alcalinizadores del lumen, pero nada dio resultados, ya que fue imposible observar el rellenado en el luminómetro. Sin embargo, la utilización de TBH y Tg, que utilizamos por casualidad, debido a la inercia de su uso en el laboratorio para el vaciado de ER, siempre dieron resultado. Por tanto, se realizaron las pruebas adecuadas, de forma que en esta tesis se ha demostrado que gran parte de la entrada parece depender principalmente de SERCA (**Figura 38**), ya que la entrada y la salida del ion son sensibles a TBH y a tapsigargina 200 nM. Tapsigargina 200 nM elimina completamente la entrada de Ca^{2+} al compartimento, y TBH 10 μM es algo más permisivo, (la diferencia no es significativa entre ambos resultados). Al utilizar un medio con características similares al del citosol (**Tabla 8 A**), pero sin ATP, hay un pequeño porcentaje de Ca^{2+} capaz de entrar al compartimento, esta diferencia es significativa con respecto a los resultados con TBH, lo que implica que un porcentaje de Ca^{2+} , es capaz de entrar en el compartimento de forma independiente a las bombas de Ca^{2+} .

Por otro lado, la salida de Ca^{2+} (**Figura 39**) depende de TBH pero también de EGTA, ya que hay una diferencia significativa entre los experimentos sólo con TBH y aquellos con TBH y con EGTA. Por lo tanto, existe una salida desde el compartimento que no dependa de SERCA. Por último, y más importante, hay una diferencia muy significativa en la salida del ion entre los experimentos en los que se utilizó TBH y en los que se utilizó un medio sin ATP. Esto implica una mayor salida de Ca^{2+} por medio de canales, transporte pasivo y transporte activo secundario, que por medio de bombas SERCA (aunque también hay salida por la bomba SERCA).

Gracias a trabajos anteriores ((Rosado *et al.*, 2004; Cavallini, Coassin and Alexandre, 1995)) se sabe que existen dos isoformas de SERCA, al menos en plaquetas y Hek293T (García-Sancho Martín, Alonso Alonso and Aulestia Araya, 2013), las de 100 y las de 97 kDa. La isoforma de 100 kDa se ha identificado como SERCA 2b, se inhibe con [Tg] bajas y no se inhibe con TBH (son insensibles a TBH). La isoforma de 97 kDa se ha identificado como SERCA 3, es mucho menos sensible a Tg y es inhibida por TBH (son sensibles a TBH). Por lo tanto, si en los EL sólo existiera esta última isoforma, al utilizar bajas [Tg] (unos 10 nM (Cavallini, Coassin and Alexandre, 1995)) no habría cambio en la capacidad de captación de Ca^{2+} , ya que no se inhibiría SERCA, y por tanto, no se vaciaría el lumen. En el caso de utilizar luminiscencia basada en aequorina, si usáramos bajas [Tg] para vaciar el Ca^{2+} del lumen, y SERCA 3 fuera la principal responsable de la captación de Ca^{2+} en el lumen de EL, no tendríamos resultado de luminiscencia (ya que la aequorina captaría todo el Ca^{2+} durante el vaciado y no se vería luminiscencia durante el experimento). Hemos realizado todos los experimentos suponiendo que se trata de SERCA 3 ya que es sensible a Tapsigargina 200 nM y a TBH 10 μM . Además Según un estudio relevante y clásico realizado en plaquetas (Cavallini, Coassin and Alexandre, 1995) los compartimentos que son sensibles a TBH o a tapsigargina a su vez pueden ser, o no ser, sensibles a ionomicina. Proponen que podría existir una subdivisión en los compartimentos. Esta subdivisión sería de alta fuga o de baja fuga; y también proponen que la fuga de Ca^{2+} podría depender del estado de rellenado del compartimento, es decir, que si contienen alta concentración de Ca^{2+} la fuga sería alta, mientras que ésta bajaría a partir de un valor límite de concentración del ion.

Como conclusión, según los datos expuestos, existe una inhibición debido a TBH y alta concentración de tapsigargina (200 nM), por lo que seguramente exista mayoritariamente SERCA de tipo 3 ((Rosado *et al.*, 2004; Cavallini, Coassin and Alexandre, 1995)). No hemos conseguido resultados utilizando bajas concentraciones de tapsigargina, lo que podría hacer pensar que quizás también existe una pequeña porción de SERCA de tipo 2 (no sensible a TBH y sí sensible a bajas concentraciones de tapsigargina). Por otro lado, seguramente las bombas sean de alta fuga (porque son de alta concentración de Ca^{2+}) y sabemos que son no sensibles a ionomicina (**Figura 36**) (Cavallini, Coassin and Alexandre, 1995).

4.4. Liberación de Ca^{2+} en los orgánulos ácidos medidos con ELGA1

Unos de los objetivos principales de la tesis era determinar si ELGA1 podía medir la salida de Ca^{2+} desde canales concretos (**Figura 13**) que respondieran a estímulos específicos. En este sentido, también se consiguieron resultados muy interesantes ya que ML-SA1 (20 μM , 30 s), agonista del canal TRPML1 (**Figura 17**) específico de LE y lisosomas, produjo una liberación robusta de Ca^{2+} en EL, al sobreexpresar el canal en células HEK293T permeabilizadas, del $40 \pm 3 \%$ ($n = 6$) con respecto al estado estacionario (**Figura 41 B**); y se obtuvo un valor de EC 50 de $6,77 \pm 0,9 \mu\text{M}$ (**Figura 42**). Con respecto a TRPML1 también se consiguieron resultados en la inhibición (**Figura 43**) con ML-SI1 (20 μM , 2.5min). Además, también se consiguieron resultados reproducibles con IP3 (sin necesidad de sobreexpresar el canal) con una respuesta de $73.9 \pm 3.9 \%$ ($n = 6$) (**Figura 45**) en células HEK293T permeabilizadas; y se obtuvo un valor de EC 50 de $0,19 \pm 0,06 \mu\text{M}$ (**Figura 46**). La inhibición fue posible utilizando la línea mutante HEK293T nula para las tres isoformas de IP3R (IP3-3KO) generada mediante tecnología CRISPR/Cas9 (Alzayady *et al.*, 2016) (**Figura 47**). La capacidad de rellenado en estos clones sugiere que, a menos que haya efectos compensatorios, IP3R no es esencial para rellenar el depósito de Ca^{2+} de EL, a pesar de las sugerencias de algunos autores (Yang *et al.*, 2019a) (**Figura 11 y 16**). También se consiguió la reexpresión de IP3R1 en células IP3-3KO y la respuesta de IP3 se rescató parcialmente ($54,44 \pm 1,20 \%$; $n = 7$), lo que podría sugerir la existencia de más tipos de IP3R implicados (además del tipo 1, que podría ser el principal).

Teniendo en cuenta los resultados de esta tesis, las conclusiones de algunos autores sobre la posibilidad de una CICR (Kilpatrick *et al.*, 2016), debido a los resultados de falta de respuesta de ML-SA1 al bloquear SERCA con Tg (100 μM) e IP3R con 2-APB, no serían óptimas, ya que al bloquear SERCA se vacía EL y sería normal que no hubiera respuesta de ML-SA1 sin necesidad de CICR.

4.5. Crosstalk entre EL y ER

La posibilidad de que una fracción de la sonda pudiera estar dirigida incorrectamente al RE debido a las similitudes con SERCA y con la respuesta de IP3 en IP3R (ver punto 3.3), hizo que realizáramos comprobaciones en la respuesta de ML-SA1 en RE de células permeabilizadas e intactas. Además, inicialmente se detectó con ELGA1 diferencia significativa en la velocidad de rellenado de EL entre células intactas y permeabilizadas (**Figura 36**) que podría ser relevante para la comunicación entre los orgánulos. La idea era encontrar diferencia significativa entre RE y LE para poder explicar las similitudes, lo que nos llevó a pensar en la posibilidad de una comunicación entre LE y RE, en lugar de

una deslocalización de ELGA1, ya que en lugares de expresión de VAMP7 existen sitios de contacto entre RE y EL (**Figura 9**) (Elfmark, 2023). La respuesta de TRPML1 tanto en ER como en EL podría estar implicada en una de las funciones propuestas para estos sitios de contacto, como el intercambio de lípidos, la maduración y localización de los endosomas o su motilidad (Elbaz-Alon *et al.*, 2020; Elfmark, 2023; Wijdeven *et al.*, 2015; Wu and Voeltz, 2021). Otro dato importante en este sentido es que VAMP7 y TRPML1 están implicados en el proceso de fagocitosis, pero parecen llevarla a cabo por vías distintas (Edwards-Jorquera *et al.*, 2020).

En los experimentos realizados con luminiscencia, se han obtenido resultados con TRPML1 en RE (**Figura 50**) muy similares a los obtenidos con la sonda ELGA1 (no hay diferencia significativa entre ellos). Estos no fueron los datos esperados inicialmente, ya que TRPML1 es un canal característico de EL, mientras que TRPML3 es característico de RE (Venkatachalam, Hofmann and Montell, 2006). Se sabe que TRPML3 se expresa en EL cuando se coexpresa con TRPML1 y 2, pero no ocurre lo mismo con TRPML1 en RE. Es decir, que se esperaba encontrar TRPML3 en EL pero no TRPML1 en RE. En este sentido, se conoce que existen sitios de contacto en la membrana entre RE y LE (**Figura 7, 9, 10**). Por lo que proponemos que TRPML1 se encontraría en uno de estos sitios de contacto con RE y, de alguna forma, quelaría Ca^{2+} desde esa posición hacia el espacio intracelular, más allá de la zona de contacto, incluyendo a RE. En este sentido, otros autores han encontrado que la eliminación por ARNi de TRPML1 produjo una acumulación de Ca^{2+} en RE (Tedeschi *et al.*, 2021), lo que apoyaría nuestra propuesta: podría existir una relación entre RE y TRPML1 localizada en EL. Además, TRPML1 coimmunoprecipita con STIM1 (Tedeschi *et al.*, 2021; Tedeschi *et al.*, 2019), es más, en las neuronas que carecían de STIM1: ML-SA1 y PI(3,5)P2 no liberaron Ca^{2+} en el RE, lo que reforzaría la opción de SOCE. En otro estudio sobre ELA (esclerosis lateral amiotrófica) (Tedeschi *et al.*, 2019), en un modelo neuronal de párkinson/ELA, se hipotetizó que existía un acoplamiento disfuncional entre RE y EL y se demostró que TRPML1 y LAMP1 colocalizan cerca de ER. Estos datos, sobre la cercanía entre TRPML1 y RE, concuerdan con nuestros resultados (**Figura 49**) en los que la sobreexpresión de TRPML1 en células permeabilizadas HEK293T disminuyó la $[\text{Ca}^{2+}]$ en el EL pero no en ER (tanto en intactas como en permeabilizadas), a pesar de que ML-SA1 no produjo diferencia significativa entre la respuesta de ambos compartimentos (es decir, que no hubo diferencia en la respuesta a ML-SA1 entre RE y LE en células intactas con sobreexpresión de TRPML1) (**Figura 50**). En células intactas hubo diferencia significativa (en el rellenado de Ca^{2+}) tanto en sobreexpresadas como en controles de RE y de LE (**Figura 51**). Ver cuadro resumen en la **tabla 11**. Lo que podría hacer pensar que la permeabilización a través de digitonina podría interferir en la comunicación a través del canal TRPML1 entre LE y RE, generando cambios en las proporciones del rellenado de los orgánulos con Ca^{2+} que se compensarían con la sobreexpresión del canal TRPML1. Estos datos funcionales distinguen los depósitos de Ca^{2+} de EL y de RE, ya que no responden de la misma forma a la sobreexpresión de TRPML1.

Tabla 11. Diferencia significativa en el rellenado con Ca^{2+} de LE y RE en células intactas y permeabilidad control y con sobreexpresión de TRPML1

Células	RE/LE control	RE/LE sobreexpresión TRPML1
Intactas	Sí	Sí
Permeabilizadas	No	Sí

Por otro lado, los resultados con células permeabilizadas y células intactas no han revelado diferencias significativas en la respuesta a ML-SA1 entre EL y RE (a pesar de que en LE sí hay diferencia significativa entre las células control y las sobreexpresadas) (**Figura 50 A y B**). Con respecto a la respuesta a ML-SA1 en intactas, en LE hay diferencia significativa en la respuesta a ML-SA1 entre controles y sobreexpresadas con TRPML1; mientras que en RE, no hay diferencia significativa (**Figura 50 B**).

Otro dato interesante fue que en ER hubo respuesta a ML-SA1 en células intactas con y sin transfección de TRPML1 (una respuesta en controles y dos respuestas en células con sobreexpresión de TRPML1 del total de experimentos), mientras que en EL sólo hubo alguna respuesta a ML-SA1 con sobreexpresión del canal TRPML1 (nunca en controles). En perspectiva (ya que los experimentos no se realizaron), la cotransfección de D3471K (**Figura 43**) y ERGAP1 en células intactas (en los que se detecta respuesta con y sin sobreexpresión de TRPML1) podría ser un recurso interesante para intentar conocer la relación entre ER y EL a través de TRPML1.

Otros autores aseguran que el RE rellena los EL (López-Sanjurjo *et al.*, 2013) (**Figura 11**). Si la realidad fuera que el ER rellena de Ca^{2+} los EL, esta tesis podría aportar que IP3R y TPCs no parecen estar implicado en el rellenado, ya que ambos agonistas disminuyen la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{EL}}$ en lugar de aumentarla. Según nuestros datos quizás el canal TRPML1 sí podría estar relacionado con la salida de Ca^{2+} a través de su localización en LE (Tedeschi *et al.*, 2021). En cualquier caso, nuestros datos apuntan a que realmente existe una bomba de Ca^{2+} SERCA en EL, ya que hay vaciado debido a TBH 10 μM y tapsigargina 200 nM, y ELGA no colocaliza con SERCA2b (coeficiente de Pearson de $0,186 \pm 0.028$ y de manders de SERCA2b / ELGA1 de $0,078 \pm 0.012$ y de ELGA1 / SERCA2b de $0,132 \pm 0.025$) a pesar de que esta isoforma es ubicua para el RE.

4.6. Ventajas y posibles futuros trabajos

ELGA1 es una herramienta capaz de aportar datos relevantes sobre los cambios de Ca^{2+} en EL tanto para el rellenado como para el vaciado de los orgánulos. Podría ayudar a conocer mejor enfermedades neurodegenerativas como ELA, párkinson o Alzheimer y sobre otras enfermedades como MLIV y Nieman Pick. Sobre todo podría aportar datos

en aquellas enfermedades o estados fisiológicos en los que los canales TRPML1 se encuentre involucrado o potencialmente involucrados.

En futuros trabajos es necesario seguir aportando datos sobre la localización más exacta de ELGA1, ya que aunque parece no localizarse en RE, sí parece existir una relación fuerte y muy interesante entre ambos compartimentos. Además, sería necesario obtener más datos de la bomba SERCA y de los canales o transportadores activos involucrados en la liberación y relleno del ion en EL. Estos retos hacen que el estudio de las características de ELGA1 y su posterior uso sea aún más interesante.

05 | CONCLUSIONES

- 1- ELGA1 es capaz de medir en organelas ligeramente ácidas con alta $[Ca^{2+}]$, en concreto en aquellas con un pH igual o mayor a 6.
- 2- Posiblemente se localiza en endosomas tardíos, endolisosomas y lisosomas con un pH óptimo para ELGA1.
- 3- Los orgánulos diana para ELGA1 se rellenan de Ca^{2+} vía TBH y Tg, lo que implica la actuación mayoritaria de SERCA en el relleno. Posiblemente se trate de SERCA3, debido a las concentraciones de inhibidores utilizadas. Aunque seguramente, en menor medida, existan otros transportadores implicados.
- 4- La $[Ca^{2+}]$ luminal medida por ELGA1 es de $396 \pm 30 \mu M$ en células HEK293T permeabilizadas.
- 5- ML-SA1 agonista de TRPML1 (canal específico de endosomas tardíos y lisosomas) libera Ca^{2+} , al aumentar la expresión del canal en células HEK293T permeabilizadas, en un $40 \pm 3 \%$, y tiene un valor de EC50 de $6,77 \pm 0,9 \mu M$.
- 6- IP3 libera Ca^{2+} en un $73.9 \pm 3.9 \%$ en células HEK293T permeabilizadas y tiene un EC50 de $0,19 \pm 0,06 \mu M$.
- 7- El receptor de IP3 mayoritariamente expresado parece ser IP3R1, aunque no parece ser el único.
- 8- Parece existir una relación de comunicación estrecha entre retículo endoplasmático y endolisosomas a través de TRPML1.

06 | BIBLIOGRAFÍA

Libros

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. 2008. Molecular Biology of the cell.

Alonso, A., Teresa, M., Martín, G.-S., Javier, F., Prados, R. and Macarena. (2017) *Dinámica del calcio reticular en astrocitos corticales*. info:eu-repo/semantics/doctoralThesis, Universidad de Valladolid [Online] Available at: <https://uvadoc.uva.es/handle/10324/28634> (Accessed.

García-Sancho Martín, F. J., Alonso Alonso, M. T. and Aulestia Araya, F. J. (2013) *Heterogeneidad funcional de los depósitos de calcio del retículo endoplasmático y el aparato de Golgi*. info:eu-repo/semantics/publishedVersion, Universidad de Valladolid. [Online] Available at: <https://uvadoc.uva.es/handle/10324/39348> (Accessed.

Martín, G.-S., Javier, F., Alonso, A., Teresa, M., Navarro, N. and Paloma. (2016) *Diseño de un nuevo sensor de Ca²⁺ y su aplicación a los orgánulos intracelulares "ex vivo e in vivo"*. info:eu-repo/semantics/doctoralThesis, Universidad de Valladolid. [Online] Available at: <https://uvadoc.uva.es/handle/10324/18635> (Accessed.

Artículos de investigación

Advani, R., Bae, H., Bock, J., Chao, D., Doung, Y., Prekeris, R., Yoo, J. and Scheller, R. (1998) 'Seven novel mammalian SNARE proteins localize to distinct membrane compartments', *The Journal of biological chemistry*, 273(17).

Advani, R., Yang, B., Prekeris, R., Lee, K., Klumperman, J. and Scheller, R. (1999) 'VAMP-7 mediates vesicular transport from endosomes to lysosomes', *The Journal of cell biology*, 146(4).

Albrecht, T., Zhao, Y., Nguyen, T., Campbell, R. and Johnson, J. (2015) 'Fluorescent biosensors illuminate calcium levels within defined beta-cell endosome subpopulations', *Cell calcium*, 57(4).

Alonso, M., Barrero, M., Carnicero, E., Montero, M., Garcia-Sancho, J. and Alvarez, J. (1998) 'Functional measurements of [Ca²⁺] in the endoplasmic reticulum using a herpes virus to deliver targeted aequorin', *Cell calcium*, 24(2).

Alvarez, J. and Montero, M. (2002) 'Measuring [Ca²⁺] in the endoplasmic reticulum with aequorin', *Cell calcium*, 32(5-6).

Alzayady, K., Wang, L., Chandrasekhar, R., Wagner, L., Van Petegem, F. and Yule, D. (2016) 'Defining the stoichiometry of inositol 1,4,5-trisphosphate binding required to initiate Ca²⁺ release', *Science signaling*, 9(422).

Baker, P., Hodgkin, A. and Ridgway, E. 1971. Depolarization and calcium entry in squid giant axons. *J Physiol*.

Berg, T., Strømhaug, E., Løvda, T., Seglen, O. and Berg, T. (1994) 'Use of glycyl-L-phenylalanine 2-naphthylamide, a lysosome-disrupting cathepsin C substrate, to distinguish between lysosomes and prelysosomal endocytic vacuoles', *The Biochemical journal*, 300 (Pt 1)(Pt 1).

Bolte, S. and Cordelières, F. (2006) 'A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy', *Journal of microscopy*, 224(Pt 3).

Brailoiu, G. C. and Brailoiu, E. (2016) 'Modulation of Calcium Entry by the Endo-lysosomal System', *Adv Exp Med Biol*, 898, pp. 423-47.

Bright, N. A., Davis, L. J. and Luzio, J. P. (2016) 'Endolysosomes Are the Principal Intracellular Sites of Acid Hydrolase Activity', *Curr Biol*, 26(17), pp. 2233-45.

- Cavallini, L., Coassin, M. and Alexandre, A. 1995. Two classes of agonist-sensitive Ca^{2+} stores in platelets, as identified by their differential sensitivity to 2,5-di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone and thapsigargin. *Biochem J*.
- Chaineau, M., Danglot, L. and Galli, T. (2009) 'Multiple roles of the vesicular-SNARE TI-VAMP in post-Golgi and endosomal trafficking', *FEBS letters*, 583(23).
- Chen, Q., She, J., Zeng, W., Guo, J., Xu, H., Bai, X. C. and Jiang, Y. (2017) 'Structure of mammalian endolysosomal TRPML1 channel in nanodiscs', *Nature*, 550(7676), pp. 415-418.
- Christensen, K., Myers, J. and Swanson, J. (2002) 'pH-dependent regulation of lysosomal calcium in macrophages', *Journal of cell science*, 115(Pt 3).
- Clapham, D. (2007) 'Calcium signaling', *Cell*, 131(6).
- Clapper, D. and Lee, H. (1985) 'Inositol trisphosphate induces calcium release from nonmitochondrial stores in sea urchin egg homogenates', *The Journal of biological chemistry*, 260(26).
- D'Esposito, M., Ciccodicola, A., Gianfrancesco, F., Esposito, T., Flagiello, L., Mazzarella, R., Schlessinger, D. and D'Urso, M. (1996) 'A synaptobrevin-like gene in the Xq28 pseudoautosomal region undergoes X inactivation', *Nature genetics*, 13(2).
- Edwards-Jorquera, S., Bosveld, F., Bellaïche, Y., Lennon-Duménil, A. and Glavic, Á. (2020) 'Trpml controls actomyosin contractility and couples migration to phagocytosis in fly macrophages', *The Journal of cell biology*, 219(3).
- Elbaz-Alon, Y., Guo, Y., Segev, N., Harel, M., Quinnell, D. E., Geiger, T., Avinoam, O., Li, D. and Nunnari, J. (2020) 'PDZD8 interacts with Protrudin and Rab7 at ER-late endosome membrane contact sites associated with mitochondria', *Nat Commun*, 11(1), pp. 3645.
- Elfmark, L. 2023. Protrudin-mediated ER-endosome contact sites promote phagocytosis. Cellular and Molecular Life Sciences.
- Fujimoto, T., Nakade, S., Miyawaki, A., Mikoshiba, K. and Ogawa, K. (1992) 'Localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae', *The Journal of cell biology*, 119(6).
- Gallego-Sandín, S., Alonso, M. and García-Sancho, J. (2011) 'Calcium homeostasis modulator 1 (CALHM1) reduces the calcium content of the endoplasmic reticulum (ER) and triggers ER stress', *The Biochemical journal*, 437(3).
- Galli, T., Zahraoui, A., Vaidyanathan, V., Raposo, G., Tian, J., Karin, M., Niemann, H. and Louvard, D. (1998) 'A novel tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein in SNARE complexes of the apical plasma membrane of epithelial cells', *Molecular biology of the cell*, 9(6).
- Garritty, A. G., Wang, W., Collier, C. M., Levey, S. A., Gao, Q. and Xu, H. (2016) 'The endoplasmic reticulum, not the pH gradient, drives calcium refilling of lysosomes', *Elife*, 5.
- Gerasimenko, J. V., Tepikin, A. V., Petersen, O. H. and Gerasimenko, O. V. (1998) 'Calcium uptake via endocytosis with rapid release from acidifying endosomes', *Curr Biol*, 8(24), pp. 1335-8.
- Guha, S., Baltazar, G., Coffey, E., Tu, L., Lim, J., Beckel, J., Patel, S., Eysteinnsson, T., Lu, W., O'Brien-Jenkins, A., Laties, A. and Mitchell, C. 2013. Lysosomal alkalization, lipid oxidation, and reduced phagosome clearance triggered by activation of the P2X7 receptor. In: Baltazar GC, C.E., Tu LA, Lim JC, Beckel JM, Patel S, Eysteinnsson T, Lu W, O'Brien-Jenkins A, Laties AM, Mitchell CH (ed.).
- Guillén-Samander, A., Bian, X. and De Camilli, P. (2019) 'PDZD8 mediates a Rab7-dependent interaction of the ER with late endosomes and lysosomes', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(45), pp. 22619-22623.
- Haller, T., Völkl, H., Deetjen, P. and Dietl, P. 1996. The lysosomal Ca^{2+} pool in MDCK cells can be released by $\text{ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -dependent hormones or thapsigargin but does not activate store-operated Ca^{2+} entry. *Biochemical Journal*.
- Hasanagic, M., Waheed, A. and Eissenberg, J. C. (2015) 'Different Pathways to the Lysosome: Sorting out Alternatives', *Int Rev Cell Mol Biol*, 320, pp. 75-101.

- Head, J., Inouye, S., Teranishi, K. and Shimomura, O. (2000) 'The crystal structure of the photoprotein aequorin at 2.3 Å resolution', *Nature*, 405(6784), pp. 372-6.
- Hirschi, K., Zhen, R., Cunningham, K., Rea, P. and Fink, G. 1996. CAX1, an H⁺/Ca²⁺ antiporter from Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (PNAS).
- Huotari, J. and Helenius, A. (2011) 'Endosome maturation', *Embo j*, 30(17), pp. 3481-500.
- Inouye, S., Noguchi, M., Sakaki, Y., Takagi, Y., Miyata, T., Iwanaga, S., Miyata, T. and Tsuji, F. 1985. Cloning and sequence analysis of cDNA for the luminescent protein aequorin. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Johansson, M., Lehto, M., Tanhuanpää, K., Cover, T. L. and Olkkonen, V. M. (2005) 'The oxysterol-binding protein homologue ORP1L interacts with Rab7 and alters functional properties of late endocytic compartments', *Mol Biol Cell*, 16(12), pp. 5480-92.
- Johnson, D., Ostrowski, P., Jaumouillé, V. and Grinstein, S. (2016) 'The position of lysosomes within the cell determines their luminal pH', *The Journal of cell biology*, 212(6).
- KA, C., JT, M. and JA, S. (2002) 'pH-dependent regulation of lysosomal calcium in macrophages', *Journal of cell science*, 115(Pt 3).
- Kendall, J., Sala-Newby, G., Ghalaut, V., Dormer, R. and Campbell, A. (1992) 'Engineering the CA(2⁺)-activated photoprotein aequorin with reduced affinity for calcium', *Biochemical and biophysical research communications*, 187(2).
- Kent, H., Evans, P., Schäfer, I., Gray, S., Sanderson, C., Luzio, J., Peden, A. and Owen, D. (2012) 'Structural basis of the intracellular sorting of the SNARE VAMP7 by the AP3 adaptor complex', *Developmental cell*, 22(5).
- Khan, H., Chen, L., Tan, L. and Im, Y. J. (2021) 'Structural basis of human PDZD8-Rab7 interaction for the ER-late endosome tethering', *Sci Rep*, 11(1), pp. 18859.
- Kilpatrick, B. S., Yates, E., Grimm, C., Schapira, A. H. and Patel, S. (2016) 'Endo-lysosomal TRP mucolipin-1 channels trigger global ER Ca²⁺ release and Ca²⁺ influx', *J Cell Sci*, 129(20), pp. 3859-3867.
- Krebs, J., Agellon, L. and Michalak, M. (2015) 'Ca(2⁺) homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling', *Biochemical and biophysical research communications*, 460(1).
- Li, R. J., Xu, J., Fu, C., Zhang, J., Zheng, Y. G., Jia, H. and Liu, J. O. (2016) 'Regulation of mTORC1 by lysosomal calcium and calmodulin', *Elife*, 5.
- Lim, F., Hartley, D., Starr, P., Lang, P., Song, S., Yu, L., Wang, Y. and Geller, A. (1996) 'Generation of high-titer defective HSV-1 vectors using an IE 2 deletion mutant and quantitative study of expression in cultured cortical cells', *BioTechniques*, 20(3).
- Lloyd-Evans, E., Morgan, A., He, X., Smith, D., Elliot-Smith, E., Sillence, D., Churchill, G., Schuchman, E., Galione, A. and Platt, F. (2008) 'Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium', *Nature medicine*, 14(11).
- Luzio, J., Bright, N. and Pryor, P. (2007) 'The role of calcium and other ions in sorting and delivery in the late endocytic pathway', *Biochemical Society transactions*, 35(Pt 5).
- Luzio, J., Pryor, P. and Bright, N. (2007) 'Lysosomes: fusion and function', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(8).
- López-Sanjurjo, C., Tovey, S., Prole, D. and Taylor, C. 2013. Lysosomes shape Ins(1,4,5)P₃-evoked Ca²⁺ signals by selectively sequestering Ca²⁺ released from the endoplasmic reticulum. *In: Tovey SC, P.D. (ed.). J Cell Sci*.
- López-Sanjurjo, C., Tovey, S., Prole, D. and Taylor, C. 2013 Jan 1. Lysosomes shape Ins(1,4,5)P₃-evoked Ca²⁺ signals by selectively sequestering Ca²⁺ released from the endoplasmic reticulum. *In: Tovey SC, P.D. (ed.). J Cell Sci*.
- Manjarrés, I., Chamero, P., Domingo, B., Molina, F., Llopis, J., Alonso, M. and García-Sancho, J. (2008) 'Red and green aequorins for simultaneous monitoring of Ca²⁺ signals from two different organelles', *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 455(5).

- McCarthy, A., McMahan, L. and Schaffer, P. (1989) 'Herpes simplex virus type 1 ICP27 deletion mutants exhibit altered patterns of transcription and are DNA deficient', *Journal of virology*, 63(1).
- Medina, D. L. and Ballabio, A. (2015) 'Lysosomal calcium signaling regulates autophagy via calcineurin and TFEB', *Autophagy*, 11(6), pp. 970-1.
- Miesenböck, G., De Angelis, D. and Rothman, J. (1998) 'Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins', *Nature*, 394(6689).
- Mitchell, K., Pinton, P., Varadi, A., Tacchetti, C., Ainscow, E., Pozzan, T., Rizzuto, R. and Rutter, G. (2001) 'Dense core secretory vesicles revealed as a dynamic Ca(2+) store in neuroendocrine cells with a vesicle-associated membrane protein aequorin chimera', *The Journal of cell biology*, 155(1).
- Morgan, A. J., Davis, L. C. and Galione, A. (2015) 'Imaging approaches to measuring lysosomal calcium', *Methods Cell Biol*, 126, pp. 159-95.
- Morgan, A. J., Platt, F. M., Lloyd-Evans, E. and Galione, A. (2011) 'Molecular mechanisms of endolysosomal Ca2+ signalling in health and disease', *Biochem J*, 439(3), pp. 349-74.
- Morise, H., Shimomura, O., Johnson, F. and Winant, J. (1974) 'Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of Aequorea', *Biochemistry*, 13(12).
- Murrell-Lagnado, R. D. and Frick, M. (2019) 'P2X4 and lysosome fusion', *Curr Opin Pharmacol*, 47, pp. 126-132.
- NELSON, D. L. and COX, M. M. 2013. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 6th Edition ed.
- Pascua-Maestro, R., Corraliza-Gomez, M., Fadrique-Rojo, C., Ledesma, M., Schuchman, E., Sanchez, D. and Ganfornina, M. (2020) 'Apolipoprotein D-mediated preservation of lysosomal function promotes cell survival and delays motor impairment in Niemann-Pick type A disease', *Neurobiology of disease*, 144.
- Patel, S. and Docampo, R. 2010. Acidic calcium stores open for business: expanding the potential for intracellular Ca2+ signaling. *Trends Cell Biol*.
- Patel, S. and Muallem, S. (2011) 'Acidic Ca(2+) stores come to the fore', *Cell Calcium*, 50(2), pp. 109-12.
- Peng, W., Wong, Y. C. and Krainc, D. (2020) 'Mitochondria-lysosome contacts regulate mitochondrial Ca', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117(32), pp. 19266-19275.
- Peters, C. and Mayer, A. (1998) 'Ca2+/calmodulin signals the completion of docking and triggers a late step of vacuole fusion', *Nature*, 396(6711).
- Platta, H. and Stenmark, H. (2011) 'Endocytosis and signaling', *Current opinion in cell biology*, 23(4).
- Podinovskaia, M. P.-B., C Buser, D Spang, A 2021. A novel live-cell imaging assay reveals regulation of endosome maturation. *Elife*.
- Prasher, D., McCann, R. and Cormier, M. (1985) 'Cloning and expression of the cDNA coding for aequorin, a bioluminescent calcium-binding protein', *Biochemical and biophysical research communications*, 126(3), pp. 1259-68.
- Prinz, W. A., Toulmay, A. and Balla, T. (2020) 'The functional universe of membrane contact sites', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 21(1), pp. 7-24.
- Pryor, P., Mullock, B., Bright, N., Lindsay, M., Gray, S., Richardson, S., Stewart, A., James, D., Piper, R. and Luzio, J. (2004) 'Combinatorial SNARE complexes with VAMP7 or VAMP8 define different late endocytic fusion events', *EMBO reports*, 5(6).
- Ridgway, E. and Ashley, C. (1967) 'Calcium transients in single muscle fibers', *Biochemical and biophysical research communications*, 29(2).
- Rodríguez-García, A., Rojo-Ruiz, J., Navas-Navarro, P., Aulestia, F., Gallego-Sandin, S., García-Sancho, J. and Alonso, M. (2014) 'GAP, an aequorin-based fluorescent indicator for imaging Ca2+ in organelles', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(7).

- Rodríguez-Prados, M., Rojo-Ruiz, J., Aulestia, F., García-Sancho, J. and Alonso, M. (2015) 'A new low- Ca^{2+} affinity GAP indicator to monitor high Ca^{2+} in organelles by luminescence', *Cell calcium*, 58(6).
- Ronco, V., Potenza, D., Denti, F., Vullo, S., Gagliano, G., Tognolina, M., Guerra, G., Pinton, P., Genazzani, A., Mapelli, L., Lim, D. and Moccia, F. (2015) 'A novel Ca^{2+} -mediated cross-talk between endoplasmic reticulum and acidic organelles: implications for NAADP-dependent Ca^{2+} signalling', *Cell calcium*, 57(2).
- Rosado, J. A., López, J. J., Harper, A. G., Harper, M. T., Redondo, P. C., Pariente, J. A., Sage, S. O. and Salido, G. M. (2004) 'Two pathways for store-mediated calcium entry differentially dependent on the actin cytoskeleton in human platelets', *J Biol Chem*, 279(28), pp. 29231-5.
- Rossi, V., Banfield, D., Vacca, M., Dietrich, L., Ungermann, C., D'Esposito, M., Galli, T. and Filippini, F. (2004) 'Longins and their longin domains: regulated SNAREs and multifunctional SNARE regulators', *Trends in biochemical sciences*, 29(12).
- Russell, M. R., Nickerson, D. P. and Odorizzi, G. (2006) 'Molecular mechanisms of late endosome morphology, identity and sorting', *Curr Opin Cell Biol*, 18(4), pp. 422-8.
- Saeed, I. and Ashraf, S. (2009) 'Denaturation studies reveal significant differences between GFP and blue fluorescent protein', *International journal of biological macromolecules*, 45(3).
- Saeki, Y., Fraefel, C., Ichikawa, T., Breakefield, X. and Chiocca, E. (2001) 'Improved helper virus-free packaging system for HSV amplicon vectors using an ICP27-deleted, oversized HSV-1 DNA in a bacterial artificial chromosome', *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 3(4).
- Samie, M. and Xu, H. (2014) 'Lysosomal exocytosis and lipid storage disorders', *Journal of lipid research*, 55(6).
- SantoDomingo, J., Fonteriz, R., Lobatón, C., Montero, M., Moreno, A. and Alvarez, J. (2010) ' Ca^{2+} dynamics in the secretory vesicles of neurosecretory PC12 and INS1 cells', *Cellular and molecular neurobiology*, 30(8).
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J., White, D., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. and Cardona, A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*.
- Scott, C. C., Vacca, F. and Gruenberg, J. (2014) 'Endosome maturation, transport and functions', *Semin Cell Dev Biol*, 31, pp. 2-10.
- Shen, D., Wang, X., Li, X., Zhang, X., Yao, Z., Dibble, S., Dong, X. P., Yu, T., Lieberman, A. P., Showalter, H. D. and Xu, H. (2012) 'Lipid storage disorders block lysosomal trafficking by inhibiting a TRP channel and lysosomal calcium release', *Nat Commun*, 3, pp. 731.
- Shi, M., Chen, B., Mahajan, D., Boh, B., Zhou, Y., Dutta, B., Tie, H., Sze, S., Wu, G. and Lu, L. 2018. Amino acids stimulate the endosome-to-Golgi trafficking through Ragulator and small GTPase Arl5.: *Nat Commun*.
- Shimomura, O. and Johnson, F. 1978. Peroxidized coelenterazine, the active group in the photoprotein aequorin. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Shimomura, O., Musicki, B. and Kishi, Y. 1989. Semi-synthetic aequorins with improved sensitivity to Ca^{2+} ions. *Biochem J*.
- Shirane, M. (2020) 'Lipid Transfer-Dependent Endosome Maturation Mediated by Protrudin and PDZD8 in Neurons', *Front Cell Dev Biol*, 8, pp. 615600.
- Sun, J., Liu, Y., Hao, X., Lin, W., Su, W., Chiang, E., Baudry, M. and Bi, X. (2022) 'LAMTOR1 inhibition of TRPM1-dependent lysosomal calcium release regulates dendritic lysosome trafficking and hippocampal neuronal function', *EMBO J*, 41(5), pp. e108119.
- Sun, Q., Westphal, W., Wong, K. N., Tan, I. and Zhong, Q. (2010) 'Rubicon controls endosome maturation as a Rab7 effector', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(45), pp. 19338-43.
- Tedeschi, V., Petrozziello, T. and Secondo, A. (2019) 'Calcium Dyshomeostasis and Lysosomal Ca^{2+} Dysfunction in Amyotrophic Lateral Sclerosis', *Cells*, 8(10).

- Tedeschi, V., Petrozziello, T., Sisalli, M., Boscia, F., Canzoniero, L. and Secondo, A. (2019) 'The activation of Mucolipin TRP channel 1 (TRPML1) protects motor neurons from L-BMAA neurotoxicity by promoting autophagic clearance', *Scientific reports*, 9(1).
- Tedeschi, V., Sisalli, M., Petrozziello, T., Canzoniero, L. and Secondo, A. (2021) 'Lysosomal calcium is modulated by STIM1/TRPML1 interaction which participates to neuronal survival during ischemic preconditioning', *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 35(2).
- Toma, S., Chong, K., Nakagawa, A., Teranishi, K., Inouye, S. and Shimomura, O. 2005. The crystal structures of semi-synthetic aequorins. *Protein Sci*.
- Vats, S. and Galli, T. (2022) 'Role of SNAREs in Unconventional Secretion-Focus on the VAMP7-Dependent Secretion', *Frontiers in cell and developmental biology*, 10.
- Venkatachalam, K., Hofmann, T. and Montell, C. (2006) 'Lysosomal localization of TRPML3 depends on TRPML2 and the mucopolidosis-associated protein TRPML1', *The Journal of biological chemistry*, 281(25).
- Vergarajauregui, S., Connelly, P., Daniels, M. and Puertollano, R. (2008) 'Autophagic dysfunction in mucopolidosis type IV patients', *Human molecular genetics*, 17(17).
- Wang, W., Zhang, X., Gao, Q. and Xu, H. (2014a) 'TRPML1: an ion channel in the lysosome', *Handb Exp Pharmacol*, 222, pp. 631-45.
- Wang, Z., Liu, S., Kakizaki, M., Hirose, Y., Ishikawa, Y., Funato, H., Yanagisawa, M., Yu, Y. and Liu, Q. (2014b) 'Orexin/hypocretin activates mTOR complex 1 (mTORC1) via an Erk/Akt-independent and calcium-stimulated lysosome v-ATPase pathway', *J Biol Chem*, 289(46), pp. 31950-31959.
- Wijdeven, R. H., Jongsma, M. L., Neefjes, J. and Berlin, I. (2015) 'ER contact sites direct late endosome transport', *Bioessays*, 37(12), pp. 1298-302.
- Wong, Y., Ysselstein, D. and Krainc, D. (2018) 'Mitochondria-lysosome contacts regulate mitochondrial fission via RAB7 GTP hydrolysis', *Nature*, 554(7692).
- Wu, H. and Voeltz, G. K. (2021) 'Reticulon-3 Promotes Endosome Maturation at ER Membrane Contact Sites', *Dev Cell*, 56(1), pp. 52-66.e7.
- Xu, H. and Ren, D. (2015) 'Lysosomal physiology', *Annu Rev Physiol*, 77, pp. 57-80.
- Yang, J., Zhao, Z., Gu, M., Feng, X. and Xu, H. (2019a) 'Release and uptake mechanisms of vesicular Ca', *Protein Cell*, 10(1), pp. 8-19.
- Yang, Y., Xu, M., Zhu, X., Yao, J., Shen, B. and Dong, X. P. (2019b) 'Lysosomal Ca²⁺ release channel TRPML1 regulates lysosome size by promoting mTORC1 activity', *Eur J Cell Biol*, 98(2-4), pp. 116-123.
- Zajac, M., Mukherjee, S., Anees, P., Oettinger, D., Henn, K., Srikumar, J., Zou, J., Saminathan, A. and Krishnan, Y. (2024) 'A mechanism of lysosomal calcium entry', *Sci Adv*, 10(7), pp. eadk2317.
- Zhang, X., Cheng, X., Yu, L., Yang, J., Calvo, R., Patnaik, S., Hu, X., Gao, Q., Yang, M., Lawas, M., Delling, M., Marugan, J., Ferrer, M. and Xu, H. (2016) 'MCOLN1 is a ROS sensor in lysosomes that regulates autophagy', *Nat Commun*, 7, pp. 12109.
- Zhou, L., Xue, X., Yang, K., Feng, Z., Liu, M. and Pastor-Pareja, J. 2023. Convergence of secretory, endosomal, and autophagic routes in trans-Golgi-associated lysosomes. *J Cell Biol*.