UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

Facultad de Medicina

Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM)

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología

Diseño de un nuevo sensor de Ca^{2+} y su aplicación a los orgánulos intracelulares *ex vivo* e *in vivo.*

Memoria de tesis para optar al grado de doctor presentada por

Paloma Navas Navarro

Directores:
Dr. Javier García-Sancho Martín
Dra. María Teresa Alonso Alonso

Valladolid, Julio de 2016

ABBREVIATIONS **1**

SUMMARY **5**

INTRODUCTION **11**

1. Ca^{2+} as a second messenger 13

1.1. Ca^{2+} entry mechanisms to the cytosol 14

1.1.2. Ca^{2+} channels of endomembranes 16

1.2. Cytosolic Ca^{2+} extrusion mechanisms 17

1.2.1. Plasma membrane 17

1.2.2. Endomembranes 18

1.3. $[Ca^{2+}]_C$ buffering systems 19

1.3.1. Mitochondria 19

1.3.2. Ca^{2+} buffering proteins 19

1.3.2.1 Calmodulin 19

1.3.2.2 Other Ca^{2+} binding proteins 22

1.4. $[Ca^{2+}]_{ER}$ homeostasis in tissues 22

1.4.1. Monocytes 23

1.4.2. Langerhans islets 23

1.4.3. Hippocampus 24

1.4.4. Hypophysis 25

1.4.5. Striated muscle 25

2. Ca^{2+} sensors 26

2.1. Synthetic indicators 26

2.2. Genetically encoded Ca^{2+} indicators (GECIs) 30

2.2.1. Bioluminescent GECIs 30

2.2.1.1. Aequorin 30

2.2.1.2. BRET based Ca^{2+} sensors 33
2.2.2. Fluorescent GECIs 34
2.2.2.1. The Green Fluorescent Protein 34
2.2.2.2. Red fluorescent proteins 38
2.2.2.3. FRET based Ca^{2+} sensors 40
2.2.2.3.1. Chameleons 40
2.2.2.3.2. Troponin based Ca^{2+} sensors 42
2.2.2.4. Non-FRET based Ca^{2+} sensors 43
2.2.2.4.1. Camgaroo 43
2.2.2.4.2. Pericam 44
2.2.2.4.3. GCaMPs 45
2.2.2.4.4. GECOs 46
2.2.2.5 Low affinity Ca^{2+} sensors 47
3. *In vivo* measurements through GECIs expression 50
4. Background: GAP and GAP1 52
OBJECTIVES 57
MATERIALS AND METHODS 61
1. List of plasmids 63
2. Generation of GAP mutants 63
3. Protein induction and extraction 64
4. Protein purification 67
5. Coomassie staining 67
6. Fluorescence spectra 67
7. Fluorescence measurements in the plate reader 68
7.1. Analysis and characterization of GAP mutants 68

7.2. GAP *in vitro* titration 68
7.3. Effect of pH 69
7.4. Effect of divalent metals 69
8. Expression in mammal cells 70
9. Western blot 71
10. Generation of transgenic mice 72
11. Histology 74
12. Inmunofluorescence 74
13. Mice spleen inmune cells extraction 76
14. Flow cytometry 77
15. Hippocampus cultures 77
16. Langerhans islets isolation 78
17. Hypophysis extraction 79
18. Hippocampus slices 79
19. Ca^{2+} cell imaging measurements 79
20. Generation of transgenic flies 83
21. *In vivo* $[Ca^{2+}]_{ER}$ measurement in *Drosophila* striated muscle 84
22. Statistical analysis 86
23. List of materials 86
RESULTS 87
1. GAP mutants design and analysis 89
2. *In vitro* GAP2 characterization 93
2.1. GAP2 purification 93
2.2. Fluorescence spectra 94
2.3. *In vitro* GAP2 titration 95

2.4. GAP2 pH sensitivity 97

2.5. Other divalent cations effects 98

3. GAP2 expression in mammal cells 100

3.1. *In situ* erGAP2 titration 102

3.2. $[Ca^{2+}]_{ER}$ measurement in intact cells..... 103

4. GAP2 modifications to increase brightness 108

5. GAP3 characterization 113

5.1. Fluorescence spectrum 114

5.2. *In vitro* and *in situ* titration..... 115

5.3. erGAP1, erGAP2 and erGAP3 comparison..... 116

6. GAP3 expression in Golgi Apparatus 118

7. Transgenic animals models 120

7.1. Transgenic mice..... 120

7.2. Transgenic flies..... 123

8. Concept tests of erGAP3 behaviour in different biologic systems.. 123

8.1. *In vitro* $[Ca^{2+}]_{RE}$ measurements in mice monocytes..... 123

8.2. *In vitro* $[Ca^{2+}]_{RE}$ measurements in hippocampal glia and neurons in primary cultures..... 126

8.3. *Ex vivo* $[Ca^{2+}]_{RE}$ measurements in Langerhans islets..... 128

8.4. *Ex vivo* $[Ca^{2+}]_{RE}$ measurements in adenohypophysis 131

8.5. *Ex vivo* functional distribution of acetilcholine metabotropic receptors in hippocampus slices..... 134

8.6. *In vivo* $[Ca^{2+}]_{RE}$ measurements in striated muscle sarcoplasmic reticulum of transgenic flies..... 137

DISCUSSION 141

1. Development of a new Ca^{2+} sensor 143

2. New Ca^{2+} sensor characterization 146

3. Possible GAP mechanism of action 151

4. Concept tests and *in vivo* measurements 153

CONCLUSIONS 159

BIBLIOGRAPHY..... 163

ABREVIATURAS

No hay talento más valioso que el de no usar dos palabras cuando basta una.

Thomas Jefferson

[Ca^{2+}]: concentración de calcio.
[Ca^{2+}]$_C$: concentración de calcio en el citosol.
[Ca^{2+}]$_M$: concentración de calcio en la mitocondria.
[Ca^{2+}]$_{GO}$: concentración de calcio en el aparato de Golgi.
[Ca^{2+}]$_{RE}$: concentración de calcio en el retículo endoplasmático.
ACh: acetilcolina.
ACSF: fluido cerebro-espinal artificial.
NA: apertura numérica.
APC: aloficocianina.
BFP: proteína fluorescente azul.
BRET: transferencia de energía de resonancia bioluminiscente.
CA: cuerno de Amón.
CaM: calmodulina.
CFP: proteína fluorescente cian.
CICR: liberación de calcio inducida por calcio.
CP: permutada circularmente.
CRH: hormona liberadora de corticotropinas.
DSM: desviación estándar de la media.
EBFP: proteína fluorescente azul mejorada.
ECFP: proteína fluorescente cian mejorada.
EGFP: proteína fluorescente verde mejorada.
ESM: error estándar de la media.
EYFP: proteína fluorescente amarilla mejorada.
FBS: suero fetal bovino.
FRET: transferencia de energía de resonancia de Föster (o también, fluorescente).
FP: proteína fluorescente.
GADPH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.
GECI: indicadores de calcio codificados genéticamente.
GFP: proteína fluorescente verde.
GHRH: hormona liberadora de la hormona del crecimiento.
IP_3: inositol-tri-fosfato.
IPTG: isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido.
LB: medio Luria Broth.
LH: hormona luteinizante.
LHRH: hormona liberadora de la hormona luteinizante.
LPS: lipopolisacáridos.
MCU: uniportador mitocondrial de calcio.

MEC: medio extracelular.
PE: ficoeritrina.
PLC: fosfolipasa C.
R: cociente de la fluorescencia de dos longitudes de onda.
R_0: cociente de las señales fluorescentes a dos longitudes de onda em condiciones basales.
RE: retículo endoplasmático.
RFP: proteína fluorescente roja.
ROC: canales operados por receptor.
ROI: región de interés.
RS: retículo sarcoplasmático.
SERCA: bomba ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarco/endoplasmático.
SNR: cociente señal/ruido.
SOC: canales operados por depósitos.
SOCE: entrada capacitativa de Ca^{2+}.
SMOC: canales operados por segundo mensajero.
SPCA: ATPasa de calcio 1 de la vía secretora.
STIM: molécula de interacción con el estroma.
TBH: 2,5-di(*t*-butil)-1,4-benzohidroquinona.
Tg: tapsigargina.
TnC: troponina C.
TRH: hormona liberadora de tirotropina.
TRP: canales receptores de potencial transitorio.
VOC: canales operados por voltaje.
YFP: proteína fluorescente amarilla.

RESUMEN

Hay muchos que se van por las ramas, por uno que va directamente a la raíz.

Henry David Thoreau

Ca^{2+} is an ubiquitous messenger involved in a plethora of cellular processes, including muscle contraction, secretion, gene expression or differenciation. Ca^{2+} signals occur when its cytosolic concentration ($[Ca^{2+}]_C$) increases. However, maintained high $[Ca^{2+}]_C$ is toxic and it must be extruded it to the extracellular space or uptaken into the endoplasmic reticulum (ER).

The ER is the main cellular Ca^{2+} store, and it contains high Ca^{2+} concentration in its lumen, neccesary for the normal functioning of this organelle, which is involved in protein folding and the secretion pathway, and the activity of several luminal proteins, such as BiP or calreticulin. In fact, chronic decrease of Ca^{2+} concentration in the ER ($[Ca^{2+}]_{ER}$) triggers the unfolded protein response, and eventually, cell death. The ER actively contributes to the cytosolic Ca^{2+} signalling, releasing it through the channels present in its membrane to the cytosol, following a favorable electrochemical gradient. Once the stimulus ceases, the ER uptakes Ca^{2+} back to its lumen. For all this, monitoring the Ca^{2+} homeostasis directly in the ER lumen is essential to fully understand the physiological and pathological processes.

At present, there is a broad variety of genetically encoded Ca^{2+} sensors (GECIs), either bioluminescent or fluorescent, whose light emission changes depending on $[Ca^{2+}]$. However, most of the available sensors are of high affinity for Ca^{2+}, not suitable to measure the high $[Ca^{2+}]$ existing inside the ER or the Golgi apparatus. Bioluminescent protein aequorin, originally isolated from the jellyfish *Aequorea victoria*, was the first GECI to be used in the ER. Aequorin is a very used tool that has given important insights in the Ca^{2+} signalling field, but it has two caveats: first, its poor spatial resolution, which seriously limits cell imaging; second, it needs to be reconstituted with its cofactor coelenterazine, which makes impossible *in vivo* measurements in the ER. These problems were circumvented by low affinity fluorescent Ca^{2+} sensors, engineered from fluorescent proteins and Ca^{2+} binding proteins, such as calmodulin or troponin. Fluorescent low affinity GECIs elicit imaging measurements with good spatio and temporal resolution. However, many of them do not have a low enough affinity, a good dynamic range or adequate Hill coefficient.

Our group has recently developed a new class of fluorescent Ca^{2+} sensors based on the fusion of two proteins from the jellyfish *Aequorea victoria*,

the green fluorescent protein (GFP) and the aequorin, called GAP. The use of aequorin instead of calmodulin or troponin-C as the Ca^{2+} binding protein makes it bio-orthogonal, meaning, association of the indicator with endogenous proteins is much less likely, thus avoiding possible interferences. GAP has an excitation spectrum with two maximums, at 405 and 470 nm. In presence of Ca^{2+}, the first peak decreases and the second one increases, allowing ratiometric measurements. GAP affinity is tunable, as wild type GAP, that is, GFP fused to native aequorin, is a high affinity sensor (K_d = 660 nM), while GAP with mutations D117A/D119A/D163A, named GAP1, is an intermediate affinity sensor (K_d = 12 μM).

The aim of this project was to engineer a low affinity variant of GAP, which enables to measure the Ca^{2+} concentration in high Ca^{2+} content organelles, such as the ER or the Golgi apparatus. To this purpose, aequorin was first mutated in 22 residues of the three EF hands. The resulting proteins were produced and extracted from *E. coli*, and screened *in vitro* through a plate reader fluorescent assay. One of the variants, the double mutant D24N/D119A, named GAP2, displayed the suitable affinity (K_d = 410 μM) to measure the [Ca^{2+}] present in the ER. GAP2 was somehow dimmer that its parental GAP or GAP1. In order to compensate this loss of fluorescence, additional substitutions within the GFP moiety were introduced, generating GAP3, which displayed 2 fold increased fluorescence respect to GAP2. The fluorescent properties of GAP2 and GAP3 were very similar. The new sensors were fully characterized in vitro and in transfected HeLa cells. They were ratiometric, with a dynamic range of 4-5 fold, a Hill coefficient of 1, and it was quite insensitive to pH and Mg^{2+}.

GAP2 and GAP3 are targetable to the ER, where they successfully recorded stimuli-induced Ca^{2+} releases from the ER in HeLa cells, with IP_3-coupled stimuli and with the SERCA pump inhibitors. Moreover, simultaneous measurements of $[Ca^{2+}]_{ER}$ and $[Ca^{2+}]_C$ were recorded by combining GAP with spectrally compatible synthetic sensors, such as Rhod-3.

The ability of erGAP2 and 3 molecules to record $[Ca^{2+}]_{ER}$ in more intact tissues was assessed by expressing the new sensors in transgenic mice, under the control of a ubiquitous promoter. Transgene expression of erGAP was found in virtually all tissues tested. We measured ER Ca^{2+} dynamics in the following cells and tissues: monocytes, hippocampal

neurons (in dissociated cultures and acute slices), pancreatic islets and hypophysis.

The ability of the new sensors to measure $[Ca^{2+}]_{ER}$ *in vivo* was address by creating transgenic flies for erGAP3 specifically expressed in skeletal muscles. *In vivo* recordings were performed in thoracic fly muscles electrically stimulated through the motoneurons.

Its use in combination with new disease models, such as those provided by iPS cell technology (Fernandez-Santiago y Ezquerra, 2016) or aging models, promises novel approaches to investigate the pathophysiological relevance of organellar Ca^{2+} dyshomeostasis.

INTRODUCCION

Cada hombre debe restringir y limitar más su conocimiento a fin de competir con otros. El especialista sabe más y más sobre menos y, por último, sabe todo sobre nada.

Konrad Lorenz

1. EL Ca^{2+} COMO SEGUNDO MENSAJERO

El Ca^{2+} es un segundo mensajero ubicuo e implicado en múltiples procesos celulares, como la división celular, la apoptosis, la contracción muscular, la secreción, la neurotransmisión, y la expresión génica (revisado por (Clapham, 2007)). Al contrario que otros segundos mensajeros, el Ca^{2+} no puede degradarse, por lo que cuando la $[Ca^{2+}]_C$ es anormalmente alta y mantenida, resulta nocivo. Por esta razón, cobran especial relevancia los mecanismos de extrusión del Ca^{2+} citosólico, que transportan el Ca^{2+} o bien al exterior celular, donde su concentración es de alrededor de 2 mM, o bien al lumen de organelas como el retículo endoplasmático (RE) donde su concentración ($[Ca^{2+}]_{RE}$) puede alcanzar niveles de cientos de micromolar (Alonso y cols., 1998). Estos mecanismos mantienen la $[Ca^{2+}]_C$ basal a 100 nM aproximadamente, es decir, cuatro órdenes de magnitud más baja que el medio extracelular, y esta diferencia de concentraciones crea un gran gradiente electroquímico que facilita la rápida entrada del Ca^{2+} al citosol tras la apertura de los canales situados tanto en la membrana plasmática como en las de las organelas (Krebs y cols., 2015). En la **Figura 1** se resumen esquemáticamente los principales componentes de la homeostasis del Ca^{2+} celular.

En contraste con el citosol, la alta $[Ca^{2+}]_{RE}$ no sólo no es perniciosa, sino que además es necesaria para la función de muchas proteínas residentes en el lumen del RE que se unen al Ca^{2+} con baja afinidad. Entre ellas destacan la calreticulina, la chaperona BiP, o la calsecuestrina. De hecho, un vaciamiento prolongado del RE provoca estrés reticular y desencadena de la respuesta de las proteínas no plegadas (UPR) (Gallego-Sandin y cols., 2011).

El aparato de Golgi también almacena altas concentraciones de Ca^{2+}, el cual está implicado en el control de procesos como las modificaciones postraduccionales o el tráfico de vesículas. En los últimos años, se han descrito otros orgánulos como los lisosomas, peroxisomas y endosomas como otros reservorios de alta $[Ca^{2+}]$ (revisado por (Prins y Michalak, 2011)).

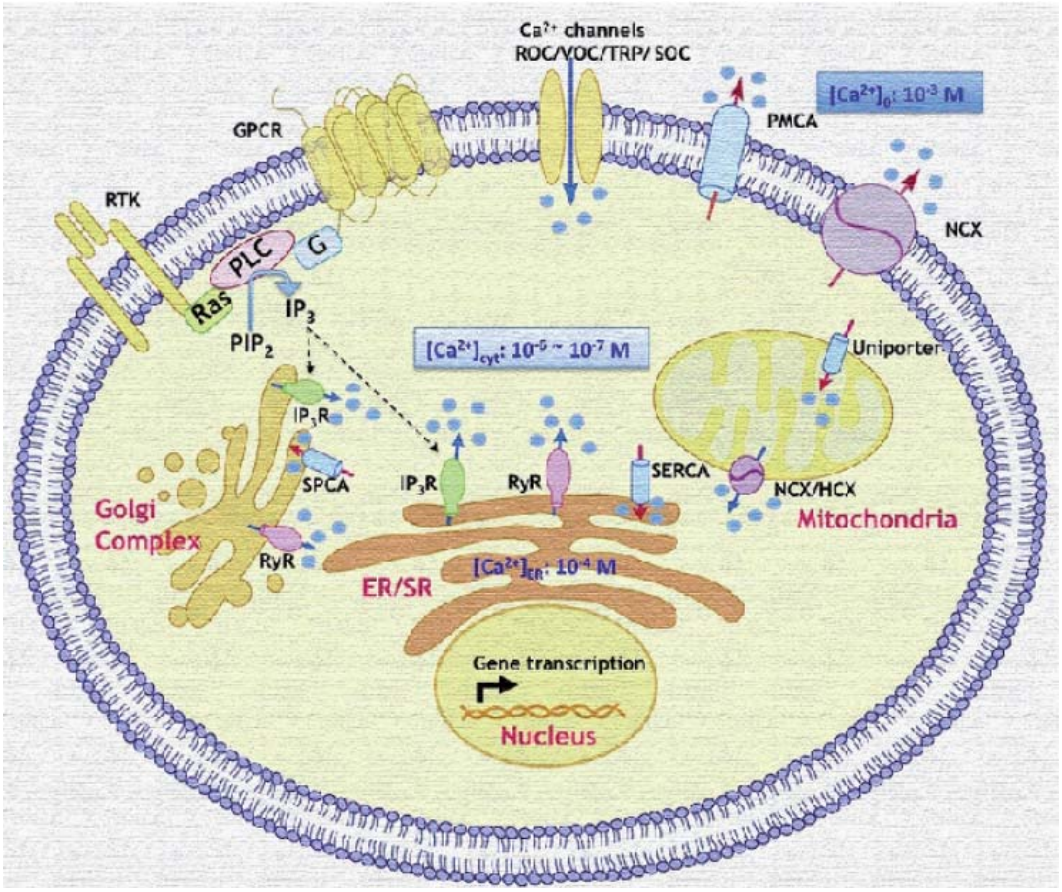

Figura 1. Homeostasis del Ca^{2+} celular. Para mantener la $[Ca^{2+}]_C$ basal en 100 nM (10^{-7} M) es necesario importarlo a los depósitos intracelulares o expulsarlo al exterior celular. Por ello, en la membrana plasmática y en las endomembranas se sitúan bombas e intercambiadores que cumplen con esta función. También la mitocondria retira Ca^{2+} del citosol a través del uniportador de calcio mitocondrial. Para aumentar la $[Ca^{2+}]_C$ son necesarios los canales localizados en la membrana plasmática y las endomembranas (Figura obtenida de http://www.snipview.com/q/Calcium_signaling).

1.1. MECANISMOS DE ENTRADA DE Ca^{2+} AL CITOSOL

La naturaleza señalizadora del Ca^{2+} reside en el aumento transitorio de su concentración en el citosol, por lo que existen diversos mecanismos para permitir su entrada desde el exterior celular, o su liberación desde los depósitos intracelulares. Estos mecanismos se basan en la activación de unos canales de Ca^{2+} que, cuando se abren, permiten la entrada del ion Ca^{2+} al citosol a favor de su gradiente electroquímico.

1.1.1. CANALES DE Ca^{2+} DE LA MEMBRANA PLASMATICA

Los canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática pueden clasificarse en los siguientes tipos: los canales operados por voltaje (VOCs), los canales operados por receptor (ROCs), los canales operados por vaciamiento de depósitos (SOCs), los canales operados por segundos mensajeros (SMOCs) y los canales de la familia de los receptores de potencial transitorio (TRPs).

Los VOCs son característicos de las células excitables, como las neuronas, las células secretoras y las musculares. Cuando la membrana plasmática sufre una despolarización, estos canales se abren y permiten la entrada de Ca^{2+} al citosol; tras la repolarización de la membrana plasmática se vuelven a cerrar (revisado por (Catterall, 2000). Los VOCs pueden activarse en los experimentos *in vitro* provocando despolarizaciones en las células mediante medios extracelulares con alta concentración de K^+.

Los ROCs son canales de Ca^{2+} que se abren al unirse a ellos un ligando como las hormonas, los nucleótidos o los neurotransmisores. El canal puede ser la propia proteína receptora o puede estar asociado al receptor, abriéndose para permitir la entrada de Ca^{2+} al citosol, aunque también tienen cierta permeabilidad a Na^+ o K^+ (dependiendo del tejido), lo cual despolariza la célula y activa indirectamente los VOCs. Los receptores nicotínicos de acetilcolina son un subtipo de canales ROCs, que responden al neurotransmisor acetilcolina y al principio activo del tabaco, la nicotina. Se localizan en determinadas neuronas del sistema nervioso central y periférico, donde participan en la modulación de la liberación de otros neurotransmisores, o en células del sistema inmune como macrófagos o linfocitos (revisado por (Dajas-Bailador y Wonnacott, 2004)).

Los SOCs son canales implicados en la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular que se activan por vaciamiento de los depósitos de Ca^{2+} intracelulares. En la membrana del RE se localiza la proteína STIM (molécula de interacción con el estroma), que tiene un dominio de unión a Ca^{2+} situado en el lado luminal, el cual mantiene inactiva a la proteína mientras permanezca unido a Ca^{2+}. Al vaciarse el RE, la proteína libera el Ca^{2+} y se activa, formando agregados y dirigiéndose a puntos de contacto de la membrana del RE con la membrana plasmática (Liou y cols., 2005; Roos y cols., 2005). De esta forma, puede interaccionar con la proteína Orai, un canal de Ca^{2+} de la membrana plasmática (Feske y cols., 2006), provocando la apertura y la entrada de Ca^{2+} a su través. Este mecanismo

potencia la señal de Ca^{2+} citosólica y facilita el rellenado de los depósitos a través de la bomba SERCA, y se conoce como entrada capacitativa de Ca^{2+} o SOCE (*Store Operated Calcium Entry*). Los canales Orai eran conocidos como canales activados por la liberación de calcio (CRAC) antes de conocerse la identidad de la proteína (revisado por (Berridge, 2014)).

Los SMOC se activan por segundos mensajeros generados en otras vías de señalización como los nucleótidos cíclicos (AMPc y el GMPc) o también por el ácido araquidónico (Bird y cols., 2004).

Los TRPs conforman una amplia familia de canales codificados por 23 genes distintos. Se localizan en la membrana plasmática, aunque también se han descrito en el RE, el aparato de Golgi, el lisosoma y el endosoma (Gees y cols., 2010). Estos canales son permeables a Ca^{2+} y a otros cationes, y responden a una gran variedad de estímulos, como a variaciones de temperatura, ligandos, voltaje o estímulos mecánicos; además, su actividad puede ser regulada por depósitos o por la fosfolipasa C (PLC) (revisado por (Berridge, 2014)).

1.1.2. CANALES DE Ca^{2+} DE LAS ENDOMEMBRANAS

Los principales canales de liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares son los receptores de inositol-trifosfato (IP_3R) y los receptores de rianodina (RyR), presentes fundamentalmente en el RE (Friel y Tsien, 1992) y también en el aparato de Golgi (Pinton y cols., 1998).

En mamíferos existen tres tipos de IP_3R, cada uno codificado por un gen distinto, que por splicing alternativo da lugar, a su vez, a varias isoformas. El IP_3R1 se expresa mayoritariamente en neuronas, el IP_3R2 en cardiomiocitos y astrocitos y el IP_3R3 en todos los tipos celulares (revisado por (Missiaen y cols., 2004)). La cascada de señalización del IP_3 comienza con la unión de determinados ligandos a sus receptores de membrana. Estos receptores están acoplados a proteínas G_q, que reclutan la PLC, la cual hidroliza una molécula de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato en diacilglicerol (DAG) e inositol-trifosfato (IP_3). El IP_3 se une a sus receptores en las endomembranas, provocando su apertura y la consecuente liberación de Ca^{2+} al citosol (Streb y cols., 1983; Furuichi y cols., 1989; Maeda y cols., 1990).

Los RyR también están codificados por tres genes distintos (1 a 3), que dan lugar a sus respectivas proteínas; el RyR1, que se expresa en el músculo esquelético, y se activa mediante el acoplamiento con los canales VOC; el RyR2, que abunda en el músculo cardiaco, esquelético y liso, neuronas y células cromafines; y se activa mediante su unión a Ca^{2+}; y al RyR3, descubierto en el cerebro, pero existente en una gran variedad de tejidos (revisado por (Van Petegem, 2012)). Cuando la $[Ca^{2+}]_C$ aumenta, el Ca^{2+} se une a los RyR2, y provoca la apertura de estos canales, liberando el Ca^{2+} de los depósitos. Este fenómeno se denomina "liberación de calcio inducida por calcio" o CICR (*Calcium Induced Calcium Release*), y tiene la función de potenciar la señalización del Ca^{2+} citosólico (Fabiato, 1983). Los RyR son sensibles a compuestos químicos exógenos como el alcaloide vegetal rianodina (Sutko y cols., 1985), la cafeína (Ogawa, 1994), y de forma inespecífica, al rojo de rutenio, a los metales pesados y al dandroleno (Butanda-Ochoa y cols., 2006).

1.2. MECANISMOS DE EXTRUSION DEL Ca^{2+} CITOSOLICO

Los mecanismos de extrusión del Ca^{2+} citosólico, responsables de restaurar o mantener la $[Ca^{2+}]_C$ basal, son las bombas y los intercambiadores iónicos, que deben operar con gasto energético en contra del gradiente electroquímico de este catión. En el caso de las bombas, es necesaria la energía que se libera al hidrolizar una molécula de ATP, mientras que los intercambiadores aprovechan la energía liberada al permitir el movimiento de un contraión a favor de gradiente.

1.2.1. MEMBRANA PLASMATICA

En la membrana plasmática se encuentran principalmente el intercambiador Na^+/Ca^{2+} (NCX), el intercambiador Na^+/Ca^{2+}- K^+ (NCKX) y la bomba ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA). Los intercambiadores son sistemas de baja afinidad y alta capacidad, es decir, que su función tiene una mayor relevancia cuando la $[Ca^{2+}]_C$ es alta, y que tienen una rápida velocidad de recambio que les permite realizar hasta 5000 reacciones por segundo. Aprovechan la energía liberada en la entrada a favor de gradiente de tres iones de Na^+ para expulsar al exterior celular un ion de Ca^{2+}, en el caso de NCX, o de cuatro iones de Na^+ para expulsar al exterior un ion de Ca^{2+} y otro de K^+, en el caso de NCKX (Hilgemann y cols., 2006; Sharma y O'Halloran, 2014).

Al contrario que los intercambiadores, la PMCA es un sistema de alta afinidad y baja capacidad. Esto es, que se mantiene activa cuando la $[Ca^{2+}]_C$ es baja, y que su velocidad de recambio es lenta, llevando a cabo hasta 150 reacciones por segundo. Por ello, la PMCA es el principal mecanismo de la membrana plasmática encargado de mantener la $[Ca^{2+}]_C$ en los niveles basales, para lo cual emplea la energía liberada por la hidrólisis de una molécula de ATP para bombear un ion de Ca^{2+} desde el citosol al medio extracelular, intercambiándolo por un H^+ (Hao y cols., 1994; Brini y cols., 2013).

1.2.2. ENDOMEMBRANAS

En la membrana del RE y del retículo sarcoplasmático (RS) se localiza la bomba ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarco/endoplasmático (SERCA) que, al igual que la PMCA, es un sistema de alta afinidad y baja capacidad, que bombea dos iones de Ca^{2+} al lumen del RE en intercambio con dos H^+ a costa de la energía liberada por la hidrólisis de una molécula de ATP (Toyoshima, 2009; Krebs y cols., 2015). La SERCA se regula mediante fosforilaciones, o a través de la interacción con determinadas proteínas de la membrana del propio RE. En el primer caso, cuando aumenta la $[Ca^{2+}]_C$, la proteína calmodulina une Ca^{2+}, lo que conlleva la activación de la quinasa dependiente de Ca^{2+}/calmodulina, la cual fosforila la SERCA, potenciando su actividad (revisado por (Narayanan y Xu, 1997)). En el segundo caso, las proteínas fosfolamban y sarcolipina ralentizan la actividad de la SERCA cuando se unen a ella, en los músculos cardiaco y esquelético, respectivamente (Michalak y cols., 1999). Se han descrito dos inhibidores específicos de la esta bomba: uno reversible, la 2,5-di(*t*-butil)-1,4-benzohidroquinona (TBH) (Moore y cols., 1987), y otro irreversible, la tapsigargina (Tg) (Thastrup y cols., 1989).

El aparato de Golgi también contribuye a restaurar los niveles basales de la $[Ca^{2+}]_C$ mediante dos bombas de Ca^{2+}: la SERCA, mayoritariamente ubicada en el cis-Golgi, y la ATPasa de calcio de la vía secretora (SPCA), presente sobre todo en el trans-Golgi (Missiaen y cols., 2007). Ésta última, al contrario de la SERCA, es insensible a tapsigargina (Van Baelen y cols., 2003).

1.3. SISTEMAS TAMPONADORES DE $[Ca^{2+}]_C$

Además de los sistemas que modifican de forma activa la $[Ca^{2+}]_C$, existen otros que tamponan los cambios en la $[Ca^{2+}]_C$, como son la mitocondria y las proteínas de unión a Ca^{2+}.

1.3.1. MITOCONDRIA

La mitocondria no es un orgánulo donde se almacene Ca^{2+} en condiciones normales, pero ejerce un importante papel tamponador del Ca^{2+} citosólico. Al incrementarse la $[Ca^{2+}]_C$, el Ca^{2+} entra a favor de gradiente a la matriz mitocondrial a través del uniportador mitocondrial de calcio (MCU) presente en la membrana interna mitocondrial (Baughman y cols., 2011; De Stefani y cols., 2011). La salida del Ca^{2+} está mediada por los intercambiadores mitocondriales Na^+/Ca^{2+} (mNCX) y H^+/Ca^{2+} (mHCX) (Crompton y cols., 1977) en intercambio con Na^+ o H^+, respectivamente. La concentración del Ca^{2+} mitocondrial ($[Ca^{2+}]_M$) puede alcanzar niveles de milimolar y, provocando la liberación del citocromo c, desencadenar en última instancia el proceso de apoptosis (Liu y cols., 1996). El papel amortiguador de la mitocondria es especialmente relevante en los llamados microdominios de Ca^{2+}, donde se ha medido $[Ca^{2+}]$ entre 5 y 10 veces mayores que la $[Ca^{2+}]_C$ global. Estos dominios de alto Ca^{2+} se producen en las inmediaciones de los canales de Ca^{2+} del RE durante su vaciamiento (Rizzuto y cols., 1993).

1.3.2. PROTEINAS TAMPONADORAS DE Ca^{2+}

Las proteínas tamponadoras de Ca^{2+} tienen dominios de unión a este ion y, por tanto, pueden modificar la $[Ca^{2+}]$ en los compartimentos celulares en los que se localizan, especialmente en el citosol. Estas proteínas no son meras atrapadoras del Ca^{2+}, sino que tras su unión, se inducen cambios conformacionales esenciales para desarrollar sus funciones. Se han identificado cientos de proteínas distintas que se unen al Ca^{2+}. A continuación se describen las más relevantes.

1.3.2.1 CALMODULINA

La calmodulina (*cal*cium *m*odulated *protein* o CaM) es la proteína más abundante en las células de mamífero. Fue descubierta hace más de 30 años en el citosol (Harper y cols., 1980), aunque posteriormente se han

descrito isoformas en otros compartimentos como el núcleo o asociada a la membrana plasmática (Li y cols., 1999). Tiene un tamaño de 16.3 kDa y está altamente conservada en animales y plantas. Cada molécula tiene cuatro dominios de unión a Ca^{2+}, llamados manos EF.

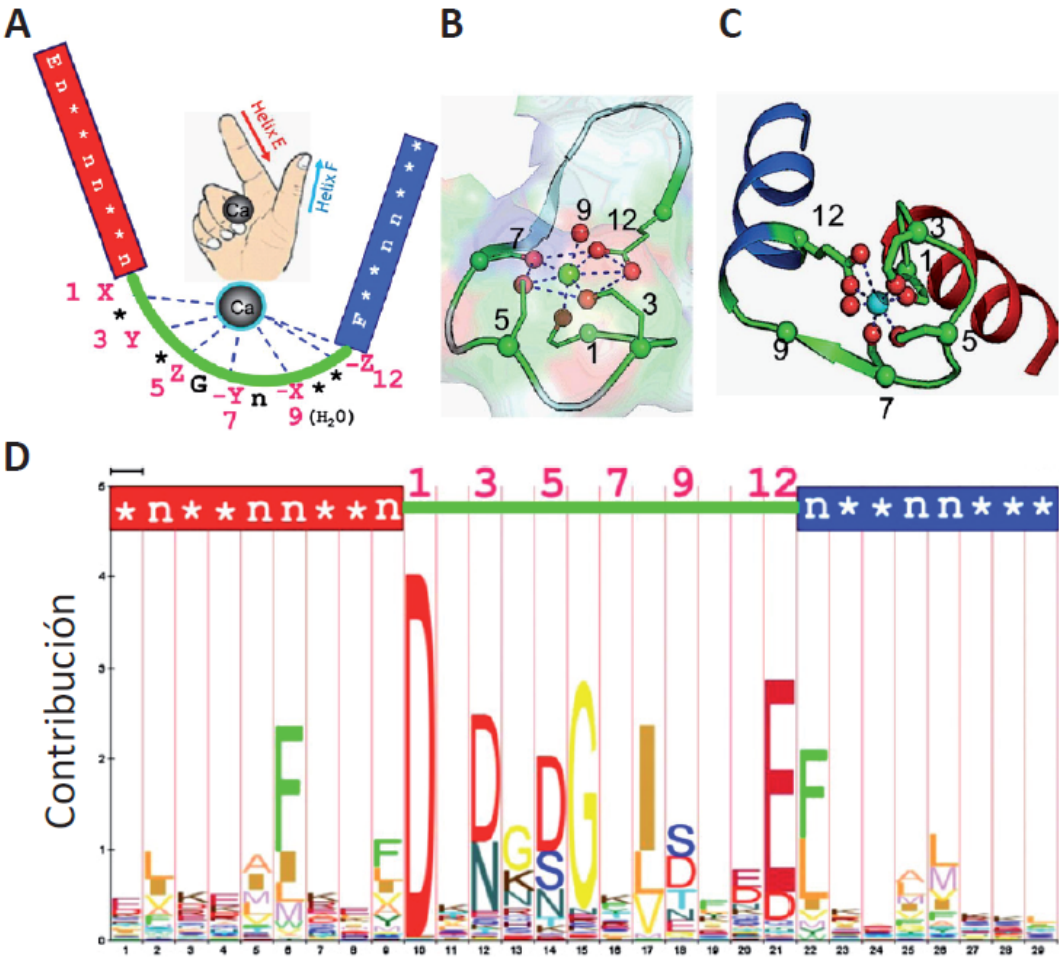

Figura 2. El motivo de unión a Ca^{2+} mano EF. (A) Este motivo contiene 29 residuos con una topología hélice-bucle-hélice, de forma similar al pulgar y el índice extendidos de una mano; n indica los residuos hidrofóbicos. (B) El Ca^{2+} se coordina con algunos residuos del bucle de 12 aminoácidos, para formar un bolsillo de unión a Ca^{2+} con geometría de pirámide doble pentagonal. (C) Estructura tridimensional típica de una mano EF de la calmodulina unida a Ca^{2+}. (D) Logo HMM para el motivo canónico del motivo de mano EF. La conservación de los aminoácidos en determinadas posiciones permite predecir los motivos mano EF en las secuencias genómicas. Figura tomada de (Zhou y cols., 2009).

El dominio mano EF fue descubierto originalmente en la proteína parvalbúmina, y se lo denominó así por el parecido de la distribución espacial de sus hélices α E y F con la "L" que forman los dedos pulgar e

índice de la mano al extenderse (**Figura 2**) (Kretsinger y Nockolds, 1973). Este motivo es muy común entre las proteínas de unión a Ca^{2+}, como la calsecuestrina, la calbindina o la troponina C (Chattopadhyaya y cols., 1992; Procyshyn y Reid, 1994). Se compone de dos hélices α unidas por un bucle de doce residuos. Los aminoácidos que participan directamente en la coordinación con el Ca^{2+} son los que ocupan las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, y 12 en dicho bucle. A estos residuos también se les denomina como X, Y, Z, -Y, -X, y –Z, atendiendo a los ejes tridimensionales. Las posiciones 1, 3, 5, y 12 están muy conservadas y son de naturaleza acídica, con grupos carboxilo o hidroxilo que interaccionan con el Ca^{2+}; además, el residuo en la posición 12 participa con dos enlaces. El aminoácido en la posición 7 interacciona con el Ca^{2+} a través del grupo carbonilo de la cadena peptídica, y el aminoácido 9 se enlaza a través de una molécula de agua. En cada mano EF el Ca^{2+} está coordinado con 7 enlaces formando una pirámide pentagonal doble (Tsuji y cols., 1986). En la posición 6 suele encontrarse una glicina muy conservada, que permite que el bucle gire 90°, ángulo necesario para conformar el sitio de unión a Ca^{2+} (Jafarian y cols., 2011).

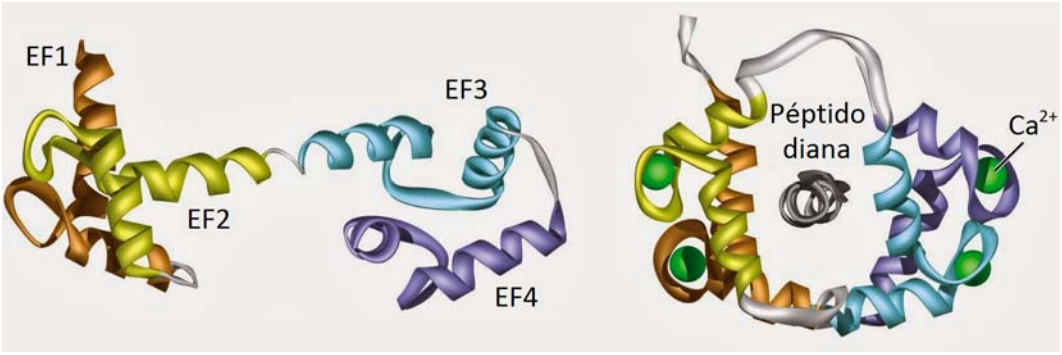

Figura 3. Estructura tridimensional de la calmodulina. La proteína libre, no unida a Ca^{2+}, se dispone en una configuración distendida, en la que se aprecian bien las cuatro manos EF. Al unirse al átomo de Ca^{2+} (representado como esferas verdes) se produce un cambio conformacional que facilita su unión a una proteína diana (representada con una hélice α gris) (Imagen de http://propanona.blogspot.com.es/2014_02_01_archive.html).

Las cuatro manos EF de la calmodulina (1 a 4) están distribuidas en dos parejas, cada una formando un lóbulo, uno en el extremo amino (N) y otro en el extremo carboxilo (C) Terminal (**Figura 3**). La unión de Ca^{2+} es de tipo cooperativo, siendo el lóbulo del extremo N terminal de baja afinidad, y el C terminal de alta afinidad (Thulin y cols., 1984). La unión de la

calmodulina al Ca^{2+} provoca un gran cambio conformacional que expone dominios hidrofóbicos, a través de los cuales puede interactuar con muchas proteínas diana, como quinasas, fosfatasas, y canales y bombas iónicos de la membrana plasmática y los depósitos intracelulares (revisado por (Marshall y cols., 2015)).

1.3.2.2 OTRAS PROTEINAS DE UNION A Ca^{2+}

La calreticulina, con una masa de 46 kDa, es la proteína más abundante del RE. La región N-terminal ejerce la función chaperona mientras que la región C-terminal contiene un dominio de unión al Ca^{2+} de alta capacidad y baja afinidad, con una K_d de 2 mM (revisado por (Michalak y cols., 1999)). La región C terminal tiene un papel muy relevante en la capacidad de almacenamiento de Ca^{2+} del RE. Se ha demostrado que las células procedentes de mutantes nulos para la calreticulina almacenan menos Ca^{2+} que las células control (Nakamura y cols., 2001).

La calsecuestrina es la proteína más abundante del RS de los músculos esquelético y cardiaco. Tiene una baja afinidad por el Ca^{2+}, con una K_d de 670 μM, y ejerce un importante papel como tampón en el RS y regulando los canales RyR (revisado por (Royer y Rios, 2009)).

Las S100 son una familia de proteínas de unión a Ca^{2+} citosólicas y nucleares de entre 10 y 12 kDa, implicadas en procesos de diferenciación, crecimiento celular, división celular, transcripción y señalización a través de proteínas de membrana. Forman dímeros con dos manos EF cada uno, que al unirse al Ca^{2+} sufren un cambio conformacional que expone dominios hidrofóbicos a través de los que interactúan con sus proteínas diana (revisado por (Karlin, 1993)).

1.4. HOMEOSTASIS DEL Ca^{2+} RETICULAR EN LOS TEJIDOS

Esta Tesis se ha centrado en el RE, y en la medición de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ en diversos tipos celulares y tejidos. A continuación se describen someramente los principales mecanismos de señalización en cada uno de los tipos celulares estudiados.

1.4.1. MONOCITOS

Los monocitos son células inmaduras del sistema inmunitario que viajan por el torrente sanguíneo y se filtran en los tejidos, donde terminan de madurar y se diferencian en macrófagos, que dependiendo del tejido en el que se localicen reciben diferentes nombres: en el sistema nervioso pasan a formar parte de la microglía, son osteoclastos en los huesos, macrófagos alveolares en los pulmones, células de Kupffer en el hígado, etc.

Los monocitos y macrófagos son células que responden al ATP extracelular, liberado por las células apoptóticas para atraerlos (Elliott y cols., 2009). El ATP se une a sus receptores P2Y o P2X presentes en este tipo celular. El receptor P2X es un canal de Ca^{2+} con menor afinidad por el ATP (del rango de mM) y cuando se abre permite la entrada del este ión al citosol desde el exterior celular (Alonso-Torre y Trautmann, 1993). El receptor P2Y tiene mayor afinidad por el ATP y está asociado a proteínas G_q, por lo que este canal incrementa la $[Ca^{2+}]_C$ mediante el vaciamiento del RE a partir de IP_3 (Cowen y cols., 1989). Además se conoce que estas células exhiben el fenómeno SOCE controlado por la interacción de STIM y Orai (Hogan y cols., 2010).

1.4.2. ISLOTES DE LANGERHANS

La función endocrina del páncreas se lleva a cabo en los islotes de Langerhans, unos grupos celulares que ocupan entre el 1 y 2% del volumen total del páncreas y se componen de tres tipos principales de células secretoras:

- Células β: segregan la hormona insulina, que se libera cuando el nivel de glucosa en sangre aumenta. Comprenden entre el 75 y 80% del volumen de los islotes.

- Células α: segregan la hormona glucagón cuando el nivel de glucosa del torrente sanguíneo disminuye. Estas células ocupan entre el 10 y 20% del volumen de los islotes, y se sitúan en la periferia.

- Células δ: segregan somatostatina, que inhibe la actividad de los músculos lisos del sistema digestivo y la vesícula biliar cuando la digestión ha finalizado. Representan un 5% del volumen de los islotes y se localizan en su periferia.

En las células β la secreción de insulina se regula por oscilaciones de su $[Ca^{2+}]_C$, proporcionalmente a su frecuencia y duración. Las oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_C$ son inducidas por la glucosa, que aumenta el cociente ATP/ADP, lo que disminuye la actividad de los canales de K^+ dependientes de ATP, y provocan, a su vez, una despolarización de la membrana plasmática, y con ella la apertura los canales VOC de Ca^{2+} (Ashcroft y Rorsman, 1989). Todas las células del islote están sincronizadas, por lo que es posible seguir los cambios de Ca^{2+} en el islote entero (Santos y cols., 1991; Valdeolmillos y cols., 1993). Aparte de reaccionar en función del nivel de glucosa en sangre, las células que componen los islotes también están inervadas por el sistema nervioso parasimpático, (Satin y Kinard, 1998) y el neurotransmisor acetilcolina provoca despolarizaciones de la membrana plasmática y activa la ruta de señalización por IP_3 (Wollheim y Biden, 1986).

1.4.3. HIPOCAMPO

El hipocampo es una región del cerebro implicada en la memoria y la orientación espacial. Es una zona importante en la fisiopatología del envejecimiento y de las enfermedades neurodegenerativas. Es, por ejemplo, es una de las primeras regiones del cerebro afectadas por la enfermedad de Alzheimer.

La señalización por Ca^{2+} en el hipocampo es muy importante en la transmisión del impulso nervioso y en la regulación de la expresión génica. Los incrementos en la $[Ca^{2+}]_C$ se deben a la entrada desde el exterior celular a través de los VOC o de los ROC activados por NMDA o AMPA (Greer y Greenberg, 2008), aunque también puede deberse al vaciamiento del RE por la ruta del IP_3 o por CICR (Berridge, 1998; Emptage y cols., 1999).

En el hipocampo, al igual que en todo el cerebro, están los astrocitos, cuya función primordial es asegurar el buen funcionamiento del sistema nervioso. Estas células también tienen señalización intracelular mediante la liberación de Ca^{2+} desde el RE a través de los IP_3R y RyR, y también presentan los fenómenos de CICR (Verkhratsky y cols., 2012) y SOCE (Verkhratsky y Parpura, 2014).

1.4.4. HIPOFISIS

La hipófisis es una glándula endocrina muy importante situada en la silla turca. Contiene cinco tipos principales de células, cada una de las cuales secreta una hormona: lactotropas, que secretan prolactina; somatotropas, que secretan hormona del crecimiento o GH; tirotropas, que secretan tirotropina o TH; corticotropas, que secretan hormona adrenocorticotropa o ACTH; y gonadotropas, que secretan hormona estimulante del folículo, FSH, y hormona luteinizante, LH. La secreción de estas hormonas está controlada, a su vez, por las hormonas hipotalámicas: la hormona liberadora de GH (GHRH), la hormona liberadora de tirotropina (TRH), la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la hormona liberadora de corticotropinas (CRH) y la hormona liberadora de LH (LHRH). Existen también factores inhibidores de la liberación, por ejemplo de prolactina y de GH (la hormona inhibidora de la liberación de hormona del crecimiento, GHIH).

Cada hormona liberadora puede desencadenar una respuesta específica en su célula diana, dependiendo de la cascada de señalización a la que esté acoplada. Así por ejemplo, la TRH y la LHRH están acopladas a la proteína $G_{q/11}$, que activa la ruta de señalización del IP_3, provocando un aumento del Ca^{2+} citosólico en células tirotropas y gonadotropas, respectivamente (Stojilkovic y cols., 1991; Ashworth y Hinkle, 1996). La CRH provoca la despolarización de la membrana plasmática de las células corticotropas y la apertura de los canales VOCs de Ca^{2+}, con el consiguiente aumento de la $[Ca^{2+}]_C$ (Luini y cols., 1985). La GHRH, al unirse a su receptor, activa la proteína G_S, acoplada a la cascada del AMPc y la proteína quinasa A (DeAlmeida y Mayo, 2001). Por último, las células de la adenohipófisis también son excitables, y son capaces de disparar potenciales de acción (Tischler y cols., 1976).

1.4.5. MUSCULO ESTRIADO

A nivel celular, el sarcómero es la unidad funcional de los músculos, y se rodean de RS y túbulos T, unas invaginaciones de la membrana plasmática que transmiten las despolarizaciones a toda la fibra muscular. Los sarcómeros se componen de fibras de miosina situadas en el centro, y fibras de actina dispuestas en los dos extremos. Cuando el músculo está relajado, la proteína α-tropomiosina bloquea los sitios de interacción entre

la miosina y la actina. La despolarización de la membrana plasmática provoca la liberación de Ca^{2+} desde el RS, incrementando la $[Ca^{2+}]_C$, que se une a la troponina C. Esta desplaza la α-tropomiosina y expone los sitios de unión de la miosina a la actina, permitiendo así la contracción.

En gran parte de los insectos, incluyendo las moscas, se da un fenómeno de activación por estiramiento, característico de los músculos indirectos del vuelo dorsoventrales y dorsolongitudinales, que se sitúan antagónicamente en el tórax. Este fenómeno hace que el batido de las alas ocurra mediante un mecanismo oscilatorio: cuando el músculo dorsoventral se contrae, hace que el dorsolongitudinal se estire, y este estiramiento activa el músculo dorsolongitudinal, provocando su contracción. Esto hace que el músculo dorsoventral se estire a su vez, por lo que vuelve a activarse y a contraerse, y así sucesivamente. Para que este mecanismo tenga lugar, se requiere tanto del estiramiento inicial del músculo como de una alta $[Ca^{2+}]_C$, ya que el desplazamiento de la α-tropomiosina no ocurre hasta que el Ca^{2+} se haya unido a la troponina C, ni los músculos se contraen si no hay un estiramiento inicial, aunque la troponina C haya unido Ca^{2+} (Gordon y Dickinson, 2006; Perz-Edwards y cols., 2011).

2. SENSORES DE Ca^{2+}

Debido a la gran importancia del Ca^{2+} como segundo mensajero, desde hace décadas los científicos se han interesado en determinar su concentración en los diversos procesos fisiológicos, tejidos y tipos celulares. Por este motivo se han desarrollado y perfeccionado numerosos sensores de Ca^{2+} de muy distinta naturaleza, que describiremos en los siguientes apartados. Los sensores de Ca^{2+} se dividen en dos grandes grupos: los sintéticos y los proteicos, también denominados sensores de Ca^{2+} codificados genéticamente o GECIs (*Genetically Encoded Calcium Indicators*).

2.1. INDICADORES SINTETICOS

Los indicadores de Ca^{2+} sintéticos fueron las primeras sondas fluorescentes para medir este ion. Los pioneros, como el Fura-2 o el Indo-1, son moléculas derivadas del quelante BAPTA (acido 1,2-bis(o-

aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético) y como éste, se unen a un ion Ca^{2+}en intercambio por dos H^{+}.

Estos sensores son hidrosolubles, lo que supone un inconveniente para introducirlos en las células sin utilizar métodos invasivos, como las microinyecciones. Como alternativa, se diseñaron versiones liposolubles uniendo sus grupos carboxilo a grupos acetoximetiléster (AM) (Tsien, 1981). Los indicadores difunden a través de la membrana plasmática, y una vez en el citosol, esterasas inespecíficas intracelulares hidrolizan los enlaces éster, liberando el indicador ácido. Esto, además, impide la salida pasiva del indicador a través de la membrana plasmática.

Los primeros indicadores tenían el inconveniente de que se excitaban con luz ultravioleta, la cual es nociva para las células. Posteriormente se desarrollaron otros indicadores con los espectros de excitación y de emisión desplazados hacia longitudes de onda mayores como la familia del Fluo, derivado de la fluoresceína y de fluorescencia verde, y la familia del Rhod, derivado de la rodamina, y de fluorescencia roja (**Tabla 1**). Además, existen otros indicadores no tan extendidos como el OGB-1, el CaFG, el Calcium Orange y el Calcium Crimson. El Fura y el Indo tienen la ventaja de ser ratiométricos, mientras que el Fluo y el Rhod son intensiométricos. Los sensores ratiométricos tienen dos máximos en el espectro de excitación o de emisión, que cambian su intensidad de fluorescencia de forma inversa cuando la $[Ca^{2+}]$ aumenta o disminuye (**Figura 4A** y **B**). Por el contrario, los indicadores intensiométricos sólo tienen un pico máximo en su espectro, cuya intensidad de fluorescencia varía en función de la $[Ca^{2+}]$ (**Figura 4C** y **D**). Los sensores ratiométricos son útiles porque permiten distinguir si un cambio en la fluorescencia es un artefacto o una variación real de la $[Ca^{2+}]$, y calibrar la señal fluorescente a $[Ca^{2+}]$ de forma más fiable. Por otra parte, los sensores intensiométricos suelen tener un mayor rango dinámico.

ALTA AFINIDAD							
Nombre	**Tipo**	**K_d**	**Molécula precursora**	**Rango dinámico**	**λ_{MAX}**		**Comentarios**	**Referencia**
					Excitación	**Emisión**		
Fura-2	Ratiométrico de excitación	224 nM	Furano	4	340 nm 380 nm	510 nm	El Mn^{2+} apaga su fluorescencia; es el más usado de los indicadores sintéticos.	(Cobbold y Rink, 1987); (Tsien, 1989)
Indo-1	Ratiométrico de emisión	250 nM	Indol	40	355 nm	400 nm 480 nm	Permea en los orgánulos mejor que el Fura-2, pero tiene más fotoblanqueo.	(Cobbold y Rink, 1987); (Tsien, 1989)
Calcium Green	Intensiométrico	269 nM (pH 7.2) 660 nM (pH 5.8)	Fluoresceína	14	507 nm	530 nm	Sensible a pH.	(Eberhard y Erne, 1991)
Calcium orange	Intensiométrico	434 nM (pH 7.2) 1.1 µM (pH 5.8)	Fluoresceína	3	551 nm	574 nm	Sensible a pH.	(Eberhard y Erne, 1991)
Calcium crimson	Intensiométrico	300 nM (pH 7.2) 2 µM (pH 5.8)	Fluoresceína	2.5	589 nm	607 nm	Sensible a pH.	(Eberhard y Erne, 1991)
Fluo-3	Intensiométrico	400 nM	Fluoresceína	40	500 nm	525 nm	Insensible a pH y Mg^{2+}.	(Minta y cols., 1989)
OGB-1	Intensiométrico	240 nM	Fluoresceína	14	475 nm	520nm	Tiene la cinética más rápida.	(Hendel y cols., 2008)
Rhod-2	Intensiométrico	1 µM	Rodamina	3.4	555 nm	575 nm	Muy usado en mitocondria.	(Minta y cols., 1989)
Rhod-3	Intensiométrico	240 nM	Rodamina	2.5	555 nm	575 nm		
BAJA AFINIDAD								
Nombre	**Tipo**	**K_d**	**Derivado**	**Rango dinámico**	**λ_{MAX}**		**Comentarios**	**Referencia**
					Excitación	**Emisión**		
Mag-Fura-2	Ratiométrico de excitación	53 µM	Furano	80	350 nm 385 nm	510 nm	Tiene afinidad por Mg^{2+}dependiente de temperatura (K_d = 1-5 mM).	(Lattanzio y Bartschat, 1991); (Hofer y Machen, 1993)
Indo-1	Ratiométrico de emission	30 µM	Indol	40	355 nm	400 nm 480 nm	Gran insensibilidad a pH, tiene afinidad por Mg^{2+} dependiente de temperatura (K_d = 2-6 mM).	(Lattanzio y Bartschat, 1991)
CaFG	Intensiométrico	100 µM *in vitro* 60 µM *in vitro*	Fluoresceína	10	488 nm	530 nm		(Tour y cols., 2007)
Rhod-5N	Intensiométrico	320 µM	Rodamina	>100	555 nm	575 nm		

Tabla 1. Resumen de las características de los principales indicadores de Ca^{2+} sintéticos.

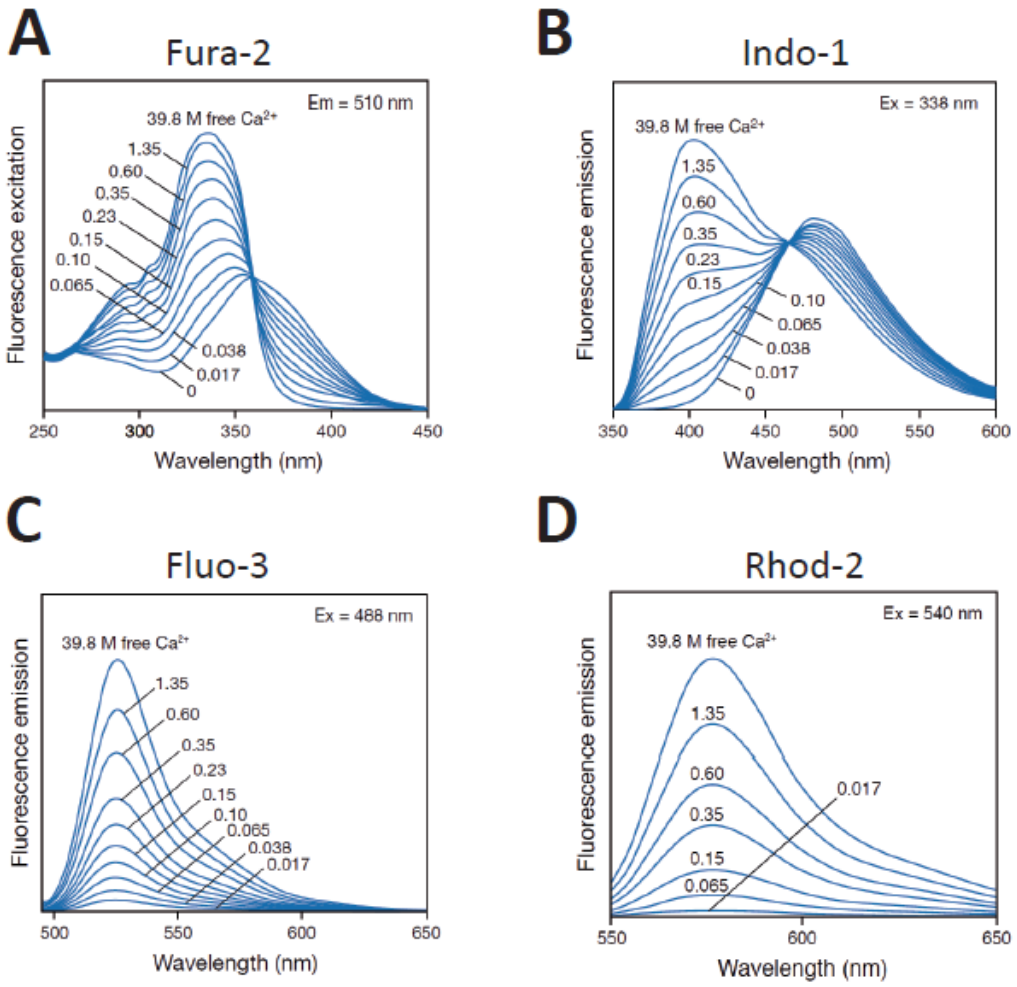

Figura 4. Espectros de fluorescencia de los principales indicadores de Ca^{2+} sintéticos. (A) Espectro de excitación del Fura-2. (B) Espectro de emisión del Indo-1. (C) Espectro de emisión del Fluo-3. (D) Espectro de emisión del Rhod-2. (Imágenes del manual de Molecular Probes "A guide to fluorescent probes and labeling technologies", capítulo 19 "Indicators for Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+} and other metal ions").

Los indicadores de Ca^{2+} sintéticos tienen varias ventajas: son fáciles de introducir en las células, ya que con una hora de incubación es suficiente para cargarlas; tienen una cinética de unión al Ca^{2+} más rápida y mayor rendimiento cuántico en comparación con las proteínas fluorescentes naturales. Como contrapartida, la medida de Ca^{2+} en los orgánulos requiere de la carga a 37°C y la permeabilización de la membrana plasmática para lavar el exceso de colorante no incorporado en la organela de interés y retenido en el citosol, que contamina la señal fluorescente. Esto supone una gran limitación del uso de los colorantes, especialmente en experimentos con rodajas u órganos enteros.

2.2. INDICADORES DE CALCIO CODIFICADOS GENETICAMENTE (GECIs)

Los GECIs son proteínas cuyas propiedades lumínicas se alteran al unir Ca^{2+}. Las principales ventajas de este grupo de sensores son que, al expresarse en las células de modo recombinante, pueden dirigirse a los distintos orgánulos celulares fusionándolas a péptidos señal, y permiten la generación de animales transgénicos. A lo largo de los últimos 20 años se han desarrollado y optimizado distintos GECIs, que pueden dividirse en dos grandes grupos: los GECIs bioluminiscentes y los fluorescentes.

2.2.1. GECIs BIOLUMINISCENTES

En el reino animal, los filos Cnidaria y Ctenophora producen de forma natural proteínas bioluminiscentes, muchas de ellas activadas por Ca^{2+}. Estas tienen una gran homología de secuencia, especialmente en los dominios de unión a Ca^{2+}, las manos EF. Se han aislado y estudiado muchas fotoproteínas dependientes de Ca^{2+}, como la halistaurina, la phialidina (Shimomura y Shimomura, 1985) la obelina (Campbell, 1974), la mnemiopsina (Jafarian y cols., 2011), la bolinopsina, la berovina (Ward y Cormier, 1975) y la clitina (Inouye y Sahara, 2007). Pero sin duda la más estudiada y utilizada como herramienta de medición de Ca^{2+} es la aequorina.

2.2.1.1. AEQUORINA

La aequorina es una proteína quimioluminiscente procedente de las medusas del género *Aequorea* (de ahí su nombre), del filo Cnidaria, y que se expresa en los fotocitos, las células emisoras de luz situadas en el anillo periférico de la campana de la medusa (**Figura 5A**). La aequorina fue muy estudiada por Osamu Shimomura durante las décadas de los 60 y 70, mediante su extracción y purificación a partir de la medusa (revisado por (Shimomura, 2009)). La aequorina fue el primer indicador de Ca^{2+} proteico empleado para medir la $[Ca^{2+}]_C$, en las células mediante su microinyección en las fibras de músculos del percebe (Ridgway y Ashley, 1967) o el axón gigante del calamar (Baker y cols., 1971). El clonaje de su cDNA se consiguió años después de que se empezara a usar como sensor de Ca^{2+} (Inouye y cols., 1985; Prasher y cols., 1985), lo cual facilitó el trabajo con las células, y de paso evitó la esquilmación de las medusas, de las que se

calcula que Shimomura pescó más de 850.000 a lo largo de su vida científica (revisado por (Miyawaki, 2008)).

La aequorina tiene un tamaño de 21.5 kDa y una estructura terciaria globular, con 8 hélices α que forman parte de cuatro manos EF (**Figura 5B**) (Head y cols., 2000), de las cuales, la segunda no es funcional; la primera y la tercera son de alta afinidad por Ca^{2+} y la cuarta es 20 veces menos sensible (Toma y cols., 2005). Este sensor se compone de dos partes: una apoproteína (la apoaequorina) y un cofactor formado por O_2 y el cofactor celenteracina (**Figura 5C**). Cuando la aequorina une tres iones de Ca^{2+} (**Figura 5D**), se desencadena la oxidación de la celenteracina, y se libera CO_2 y celenteramida, y se emite luz azul (a 470 nm) en proporción a la $[Ca^{2+}]$ (Shimomura y Johnson, 1978). Existen distintas versiones de celenteracina, creadas a partir de la modificación de sus grupos químicos, y que pueden afectar de diversas formas a las propiedades de emisión de la bioluminiscencia (Shimomura y cols., 1988). Una de las más utilizadas es la celenteracina n (**Figura 5C**), que reduce la afinidad por Ca^{2+} de la aequorina 50 veces (Shimomura y cols., 1989).

La aequorina reconstituida con celenteracina de tipo salvaje tiene una alta afinidad por Ca^{2+}, con una K_d de aproximadamente 500 nM, un valor adecuado para hacer medidas de Ca^{2+} en el citosol o el núcleo, cuya $[Ca^{2+}]$ basal es de 100 nM. La aequorina con la mutación D119A (un residuo situado en la tercera mano EF), tiene una afinidad por el Ca^{2+} 20 veces menor (Kendall y cols., 1992c), que al reconstituirse con la celenteracina n, tiene la afinidad reducida 1000 veces en total, aproximadamente (Barrero y cols., 1997). Esta nueva aequorina tiene la afinidad adecuada para medir la $[Ca^{2+}]$ en el rango de cientos de micromolar, justamente los niveles que contienen los compartimentos de altas $[Ca^{2+}]$, como el RE y el aparato de Golgi, o de forma transitoria, la mitocondria. La aequorina direccionada al RE se ha conseguido mediante dos estrategias: fusionando el extremo N-terminal de la aequorina al péptido de direccionalidad de la calreticulina y el péptido KDEL en el extremo C-terminal (Kendall y cols., 1992a), o fusionando la cadena pesada de la inmunoglobulina Ig-γ-2b al extremo N-terminal de la aequorina (Montero y cols., 1995). Esta última estrategia se ha desarrollado porque se ha demostrado que la prolina 190 de la aequorina, el último residuo, juega un papel esencial en la fotoestabilidad, ya que se si quita o sustituye la bioluminiscencia disminuye en un 50% y se

favorece la degradación de la proteína (Nomura y cols., 1991; Watkins y Campbell, 1993).

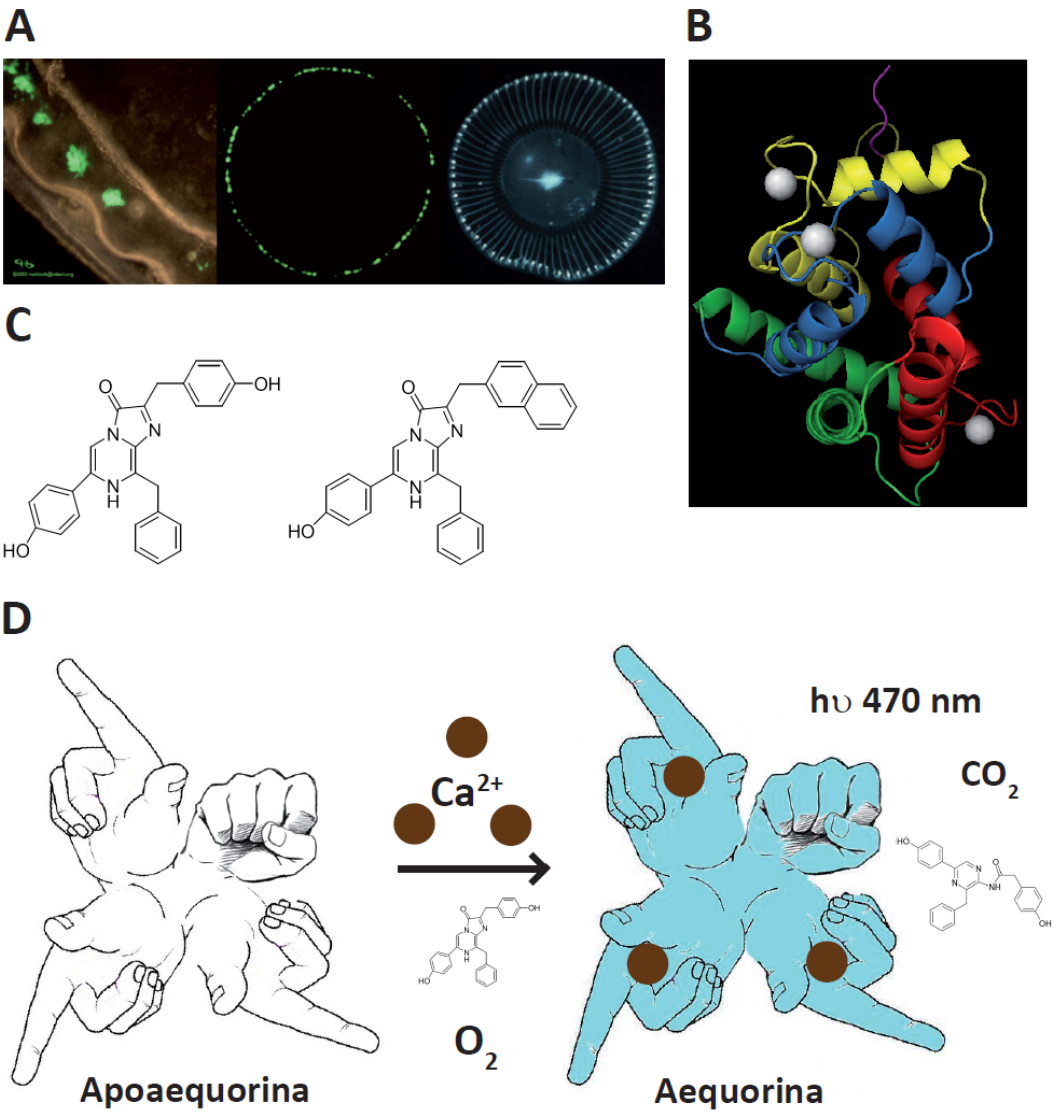

Figura 5. Estructura y reacción luminiscente de la aequorina. (A) Foto microscópica de los órganos de luminiscencia de la medusa (izquierda); *Aequorea victoria* vista durante una reacción de bioluminiscencia (centro) y con luz visible (derecha); los brillos azules se deben a la reflexión de la luz (foto obtenida de http://photobiology.info/Zimmer.html). (B) La estructura tridimensional de la aequorina está formada por cuatro manos EF. En la imagen están coloreadas, desde la primera a la cuarta, en rojo, verde, azul y amarillo, y los iones de Ca^{2+} aparecen como esferas blancas. (C) La celenteracina de tipo salvaje (izquierda) y la celenteracina de baja afinidad n (derecha). (D) Esquema de la reacción bioluminiscente: las tres manos con los dedos pulgar e índice extendidos representan tres manos EF funcionales, y el puño cerrado representa la mano EF no funcional. La apoaequorina se reconstituye con celenteracina y O_2, y al unir tres iones de Ca^{2+} se oxida su cofactor, y emite CO_2 y luz azul.

Como sensor de Ca^{2+}, la aequorina tiene una serie de ventajas: 1) posee un alto cociente señal/ruido (SNR), ya que las células de mamífero no tienen proteínas luminiscentes endógenas; 2) su afinidad por el Ca^{2+} puede modularse con distintas celenteracinas modificadas químicamente; y 3) su uso no implica fototoxicidad para las células, ya que la emisión de fotones se produce a través de una reacción química y no de su previa excitación con luz. Sin embargo, también tiene una serie de inconvenientes: 1) requiere una incubación previa con celenteracina; y 2) la reacción química de la aequorina es virtualmente irreversible en los tiempos experimentales de las células (unos 20 – 30 minutos), por lo que se consume conforme avanza el experimento y complica la calibración. Todo esto supone una mayor limitación cuando se quiere medir la $[Ca^{2+}]$ en compartimentos de alta $[Ca^{2+}]$, ya que hay que vaciarlos de su contenido de Ca^{2+} antes de reconstituir la apoaequorina con su cofactor (para evitar el consumo de la aequorina mientras se reconstituye), y después, rellenarlos al comienzo del experimento.

2.2.1.2. SENSORES DE Ca^{2+} BASADOS EN BRET

El mecanismo de transferencia de energía de resonancia bioluminiscente (BRET) que ocurre de forma natural entre la aequorina y la GFP en la medusa *Aequorea victoria*, se imitó por primera vez para medir $[Ca^{2+}]$ al clonar la GFP en el extremo N-terminal de la aequorina, a través de un péptido enlazante. La fusión GA aumentó entre 19 y 65 veces la cantidad de cuentas emitidas respecto a la aequorina original, probablemente debido a que la fusión incrementa la estabilidad de la aequorina (Baubet y cols., 2000). Desde esta descripción original se han realizado numerosas variantes de sensores de Ca^{2+} basados en BRET entre la aequorina y una proteína fluorescente, como la mRFP, la Venus o la tdTomato. Las sondas BRET cuentan a su favor con la versatilidad de la aequorina, que puede medir un amplio rango de $[Ca^{2+}]$ utilizando su versión de tipo salvaje o mutada y las diversas celenteracinas, y la mayor emisión de señal debido a su unión con la GFP.

Se han obtenido otras combinaciones de fusiones proteína fluorescente (FP)-aequorina, como la mRFP1 o la Venus, una variante de la YFP más brillante (**Tabla 2**), para poder hacer mediciones en animal completo sin el problema de la alta absorción de la luz azul/verde en los tejidos. El BRET entre la aequorina y la Venus es muy eficiente, aunque no tanto como la

mRFP1, pero ambas fusiones mejoraban las mediciones de Ca^{2+} en tejidos más profundos (Curie y cols., 2007). Además permite la medición de la [Ca^{2+}] de dos subcompartimentos celulares a la vez si la aequorina está unida a FP con distintos máximos de emisión, como la GFP y la mRFP1 (Manjarres y cols., 2008).

Debido al interés en desplazar hacia el rojo la emisión de la aequorina, se probaron otras combinaciones de proteínas fluorescentes amarillas o rojas con la aequorina, de las cuales la mejor fue la tdTomato. La fusión de una tdTomato a la que han eliminado los últimos aminoácidos, unida a la aequorina a la que le faltan los primeros residuos, presenta una eficiencia del BRET de 77%. Esta sonda fue llamada Redquorin, y tiene menor afinidad por Ca^{2+} que la aequorina, lo que permite alargar los experimentos debido al menor consumo de cuentas (Bakayan y cols., 2011; Bakayan y cols., 2015).

2.2.2. GECIs FLUORESCENTES

Los GECIs fluorescentes llevan en su estructura, al menos, una proteína fluorescente, que procede de organismos tan diversos como corales, hongos, gusanos y medusas.

Estos sensores tienen las ventajas y desventajas opuestas a la aequorina. Las ventajas son: 1) emiten mucha más luz por molécula que las proteínas bioluminiscentes; 2) no requieren de un cofactor; y 3) no se consumen. Estas ventajas son particularmente interesantes en las medidas de compartimentos de alta [Ca^{2+}]. Las desventajas son: 1) requieren de la iluminación de la muestra para emitir fluorescencia, lo cual puede ser citotóxico (tanto más cuanto menor sea la longitud de onda); 2) tienen un menor coeficiente señal/ruido que la aequorina, porque al iluminar las células se produce autofluorescencia.

2.2.2.1. LA PROTEINA FLUORESCENTE VERDE

Mientras purificaba la aequorina mediante cromatografía de exclusión molecular, Shimomura observó que antes del pico de la aequorina, eluía otra proteína, que era fluorescente y de color verde, a la que denominó “proteína fluorescente verde” o GFP (revisado por (Shimomura, 2009)). El gran potencial de la GFP como proteína marcadora disparó una carrera por clonar su gen, objetivo que finalmente consiguió Douglas Prasher (Prasher

y cols., 1992), aunque no logró expresarlo de forma heteróloga. Fue Martin Chalfie (Mitra y cols., 1996) quien, poco después, eliminando una secuencia inhibidora del gen original, logró expresar la GFP en bacterias y gusanos. Roger Tsien ha sido uno de los científicos que más ha contribuido a desarrollar la GFP y a aplicarla en la investigación básica. El trabajo conjunto de Shimomura, Chalfie y Tsien fue reconocido con el premio Nóbel en Química en 2008.

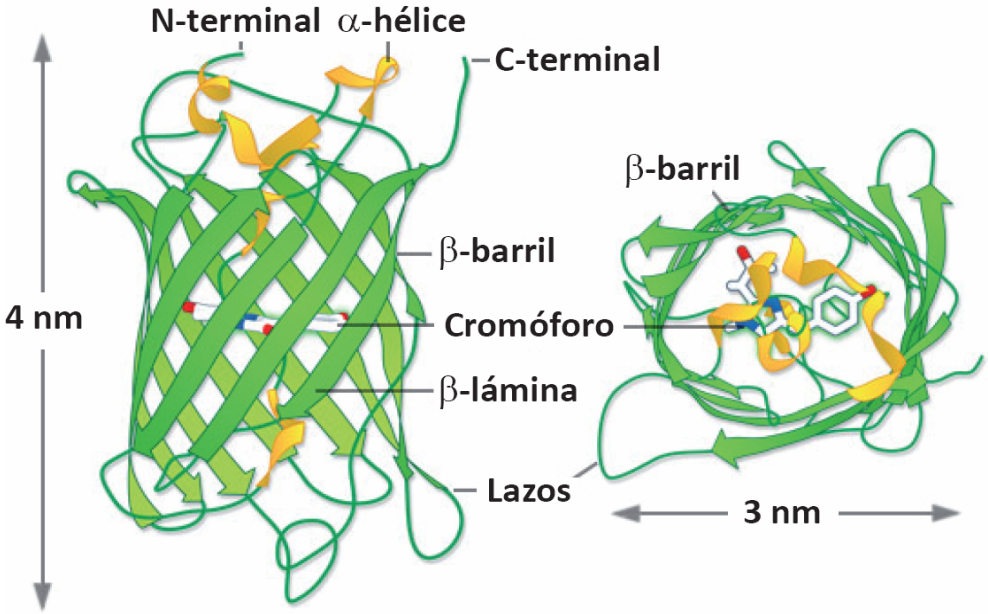

Figura 6. Estructura de la GFP. A la izquierda se ve la GFP desde una perspectiva frontal y a la derecha una perspectiva superior. Las láminas β antiparalelas forman la estructura terciaria barril β, con bucles y hélices α (en amarillo) entre cada lámina. Protegido del ambiente externo, en el interior del barril se aloja el fluoróforo (en blanco, rojo y azul) (Figura de http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/jellyfishfps.html).

La GFP tiene un tamaño de 31 kDa y está compuesta por 11 láminas β antiparalelas plegadas en conformación de barril β (Yang y cols., 1996). Su cromóforo se conforma por tres modificaciones secuenciales catalizadas por la propia GFP, consistentes en la ciclación, la deshidratación y la oxidación del tripéptido Ser65-Tyr66-Gly67 localizado en una hélice α en el interior del barril (**Figura 6**) (Shimomura, 1979; Heim y cols., 1994). Se ha observado que la GFP puede formar dímeros cuando cristaliza, e incluso se ha propuesto que dimeriza de forma natural en los órganos emisores de luz de la medusa, en los que se expresa (Cubitt y cols., 1995; Phillips, 1997)

La fluorescencia de la GFP es independiente de cofactor, y su espectro de absorbancia tiene dos máximos, uno a 395 nm y otro a 475 nm, que coinciden con los picos de excitación (**Figura 7**), el de 395 nm es más brillante y susceptible al fotoblanqueamiento que el de 475 nm. El espectro de emisión sólo tiene un máximo, a 508 nm (Heim y cols., 1994). Los dos máximos de excitación se atribuyen a una mezcla de moléculas de GFP con dos estados distintos de protonación del residuo Y66 en el cromóforo: el máximo a 395 nm correspondería al cromóforo protonado o neutro, y el máximo a 475 nm, al cromóforo desprotonado o aniónico (Heim y cols., 1994; Cubitt y cols., 1995).

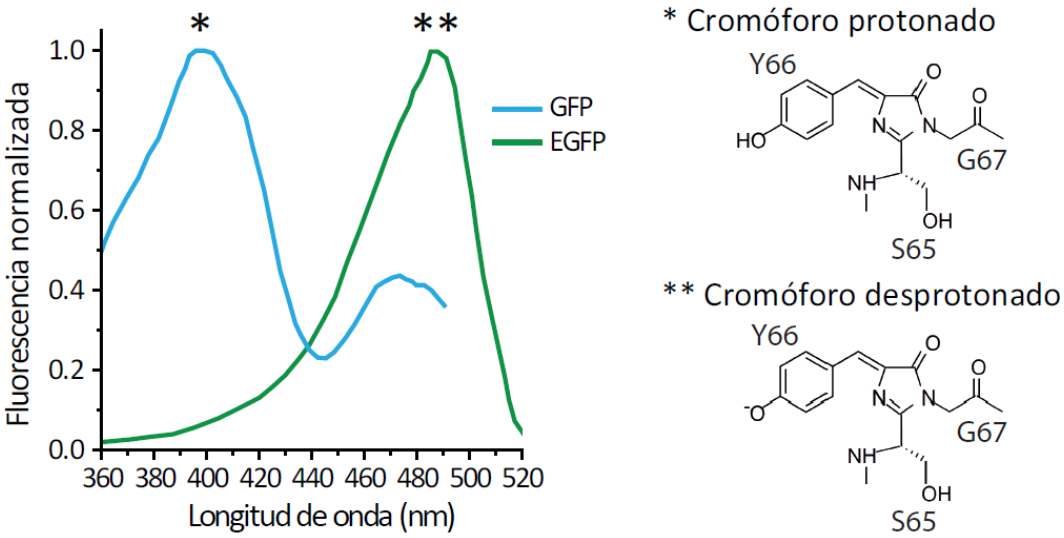

Figura 7. Espectros de excitación de la GFP de tipo salvaje y de la EGFP. La GFP de tipo salvaje (en azul) tiene dos picos máximos de excitación a 395 y 475 nm, mientras que la EGFP (en verde) tiene un solo pico con el máximo a 490 nm. A la derecha se muestra el cromóforo de la GFP en sus dos estados de protonación. El estado protonado es el responsable de la excitación a 395 nm, y el desprotonado de la excitación a 475-490 nm.

La GFP se expresa en los órganos luminiscentes de las medusas junto con la aequorina, donde ambas se encuentran a altas concentraciones. Entre las dos se produce de forma natural un fenómeno de transferencia de energía de resonancia bioluminiscente (BRET), que ocurre cuando la aequorina se une al Ca^{2+} y emite luz azul, que excita a la GFP y a su vez emite luz verde. Se ha propuesto que la distancia necesaria para una alta eficiencia de BRET entre estas dos proteínas sería de unos 30 Å, sin que ocurra una interacción física (Morise y cols., 1974). Sin embargo, otros grupos proponen que existe una interacción física entre la aequorina y el

dímero de GFP en los órganos emisores de luz de la medusa (Cubitt y cols., 1995). De ser así, la interacción entre ambas proteínas permitiría optimizar la orientación de los dipolos para aumentar la eficiencia del BRET, y se ha propuesto que dicha interacción incrementa el pico máximo de excitación a 475 nm de la GFP, para optimizar el solapamiento del espectro de emisión de la aequorina con el de excitación de la GFP (Gorokhovatsky y cols., 2004).

A partir de la GFP de tipo salvaje original se crearon una gran cantidad de mutantes, con objetivos y aplicaciones diversas. En la **Tabla 2** se incluyen algunas de estas mutantes, indicando los residuos modificados respecto a la proteína de tipo salvaje. En las secciones siguientes sobre GECIs fluorescentes se hará referencia en cada caso a las distintas variantes de GFPs de las que proceden. Roger Tsien ha contribuido a la expansión de la GFP, creando versiones de diferentes colores, como la azul (BFP), la cian (CFP) y la amarilla (YFP) (Miyawaki, 2008), y una versión verde más brillante que la original, llamada proteína fluorescente verde mejorada o EGFP (**Tabla 2**). La EGFP posee la mutación S65T en su cromóforo, que disminuye la fluorescencia del primer máximo de excitación de la GFP de tipo salvaje, y aumentan la del segundo pico y lo desplaza hasta 490 nm (**Figura 7**) (Heim y Tsien, 1996). La versión opuesta a la EGFP es la T-Sapphire (**Tabla 2**), a la que se le ha eliminado el pico de excitación a 475 nm (Tsien, 1998; Zapata-Hommer y Griesbeck, 2003). La proteína Cycle-3 o C3, llamada GFPuv en esta tesis (**Tabla 2**), es una variante que contiene las mutaciones F99S, M153T y V163A. Esta variante se pliega mejor a 37°C y es 16 veces más brillante que la GFP de tipo salvaje, cuando se expresan en células de mamíferos (Crameri y cols., 1996).

Algunas de las variantes de GFP se han creado mediante cambios estructurales a través de las permutaciones circulares (cp), que consisten en el intercambio de los extremos N y C-terminales. En la EGFP se realizaron diferentes permutaciones circulares (denominadas cpEGFP) tanto en mitad de los lazos como de las láminas β. Algunas de las variantes funcionales, aunque son más sensibles al pH, expanden las posibilidades de la transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET), debido a sus nuevas conformaciones espaciales (Baird y cols., 1999).

Conforme el uso de la GFP aumentaba, se fueron optimizando sus características, descubriéndose nuevas mutaciones útiles para cada

aplicación. Así, por ejemplo, la mutación I167T aumentaba el brillo a 475 nm (Heim y cols., 1994); la mutación A206K impedía la dimerización (Zacharias y cols., 2002); y las mutaciones V163A y S175G mejoraban el plegamiento a 37°C (Siemering y cols., 1996). Esta propiedad fue particularmente mejorada mediante DNA shuffling sobre la EGFP y la GFPuv, consiguiendo una variante que se pliega más rápido, llamada GFP superfolder (Pedelacq y cols., 2006). Las mutaciones fueron especialmente útiles en el contexto de las versiones cpGFPs, aunque no funcionaron para de las BFP, CFP e YFP.

2.2.2.2. LAS PROTEINAS FLUORESCENTES ROJAS

Las proteínas fluorescentes rojas son de especial interés en los trabajos de investigación con animales porque sus tejidos apenas absorben la luz roja, lo que las convierte en una ventajosa herramienta para imagen en tejido y en animal entero. Se han obtenido a partir de proteínas naturales que se encuentran en corales, anémonas y hongos. Las secuencias aminoacídicas de las proteínas fluorescentes rojas tienen escasa similitud con la de la GFP (Matz y cols., 1999), pero son muy similares en su estructura terciaria, ya que también tienen forma de barril β que protege en su interior un cromóforo formado a partir de modificaciones químicas de determinados aminoácidos (Gross y cols., 2000).

Los corales del género *Discosoma* contienen la proteína roja llamada DsRed*,* que sólo emite fluorescencia cuando forma tetrámeros. Esto es muy inconveniente para usarla fusionada a proteínas porque forma agregados, pero mediante mutagénesis se desarrolló una versión monomérica, la proteína fluorescente roja monomérica 1 (mRFP1), que madura más rápido y cuyo espectro apenas solapa con el de la GFP (Campbell y cols., 2002). Tras múltiples rondas de mutagénesis, se generó toda una familia de proteínas monoméricas de frutas (mFruits), que incluyen la mApple, la mCherry, la mStrawberry y la mOrange (Shaner y cols., 2004). Un caso especial es la tdTomato, llamada así porque suele expresarse como un dímero en tándem (de ahí su nombre, td).

Residuos	GFPwt	GFPuv (C3)	EGFP	GFPsf	Clover	T-Sapphire	BFP	EBFP	CFP	ECFP Miyawaki	ECFP Llopis	mCerulean	mCerulean3	mTurquoise	YFP	EYFP	EYFP 10C	EYFP 10C Q69K	Citrine	Venus	R10-3
26	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	R	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
30	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
39	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
46	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	L	L
64	F	F	L	L	F	F	F	L	F	L	L	L	L	L	F	F	F	F	F	L	L
65	S	S	T	T	G	S	S	S	S	T	T	T	S	S	G	G	G	G	G	G	S
66	Y	Y	Y	Y	Y	Y	H	H	W	W	W	W	W	W	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
67	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
68	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	L	L	L	V	N
69	Q	Q	Q	Q	A	M	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	K	M	Q	Q
70	C	C	C	C	C	V	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
72	S	S	S	S	S	A	S	S	S	S	S	A	A	A	A	A	A	A	A	A	S
99	F	S	F	S	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
105	N	N	N	T	T	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
145	Y	Y	Y	F	F	F	F	F	Y	Y	Y	A	A	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
146	N	N	N	N	N	N	N	N	I	I	I	I	I	I	N	N	N	N	N	N	N
147	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	H	S	S	S	S	S	S	S	S
148	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	D	G	D	H	H	H	H	H	H	H
153	M	T	M	T	T	M	M	M	T	T	T	T	T	T	M	M	M	M	M	T	M
162	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	Q
163	V	A	V	A	A	A	V	V	A	A	A	A	A	A	V	V	V	V	V	A	A
164	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	H	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
166	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	G	K	K	K	K	K	K	K	K
167	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	L	I	I	I	I	I	I	I	V
168	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	N	R	R	R	R	R	R	R	R
169	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	C	H	H	H	H	H	H	H	H
171	I	I	I	V	V	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	L
175	S	S	S	S	S	G	S	S	S	S	S	S	S	G	S	S	S	S	S	G	S
203	T	T	T	T	H	I	T	T	T	T	T	T	T	T	F/H	Y	Y	Y	Y	Y	T
206	A	A	A	V	A	A	A	A	A	A	A	K	K	K	A	A	A	A	A	A	A
212	N	N	N	N	N	N	N	N	K	K	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
231	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	L	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H

Tabla 2. Mutaciones de distintas proteínas fluorescentes derivadas de la GFP. GFPuv o C3 (Crameri y cols., 1996); GFPsf (Pedelacq y cols., 2006); EGFP y CFP (Heim y Tsien, 1996); Clover (Lam y cols., 2012); T-Sapphire (Zapata-Hommer y Griesbeck, 2003); EBFP, ECFP, EGFP, EYFP (Miyawaki y cols., 1997); YFP, EYFP 10C (Tsien, 1998); EYFP V68L/Q69K (Miyawaki y cols., 1999); ECFP (Llopis y cols., 1998); mCerulean, mCerulean3, mTurquoise (Markwardt y cols., 2011); Citrina (Griesbeck y cols., 2001); Venus (Nagai y cols., 2002); R10-3 (Mishin y cols., 2008). La primera columna indica el número del residuo correspondiente a la secuencia primaria de la GFPwt, la segunda son los aminoácidos de la GFP de tipo salvaje. En las otras columnas, y resaltados en el color propio de la proteína fluorescente, se tabulan los residuos mutados respecto a la GFP original. Los residuos 65 al 67 conforman el cromóforo.

La anémona *Entacmaea quadricolor* también expresa de forma natural una proteína fluorescente roja que necesita tetramerizar para emitir luz. Tras someterla a mutagénesis para impedir su oligomerización, mejorar su plegamiento a 37°C y optimizar el uso de los codones para la expresión en

mamíferos, se obtuvo la mRuby (Kredel y cols., 2009). En una segunda fase se corrigió su sensibilidad al flotoblanqueo y se aumentó el brillo, dando lugar a la mRuby2 (Lam y cols., 2012).

También se han utilizado proteínas fluorescentes rojas-naranjas a partir de hongos, como la mKO (del inglés monomeric Kusabira Orange), que debe su nombre al hongo del que procede, el *Fungia concinna* (en japonés es Kusabira) (Karasawa y cols., 2004).

Existe una versión roja de la GFP llamada R10-3, obtenida a partir del cambio de diversos residuos por otros característicos de las proteínas rojas de la clase *Anthozoa* (que incluye anémonas y corales), y de mutagénesis al azar. R10-3 presenta un tercer máximo de excitación a 555 nm, y un segundo máximo de emisión a 585 nm respecto a la GFP (Mishin y cols., 2008). Sin embargo, esta proteína no puede competir en intensidad de brillo con las proteínas rojas naturales.

2.2.2.3. SENSORES DE Ca^{2+} BASADOS EN FRET

Estos sensores se basan en la fusión de dos moléculas de distinto color y una molécula sensible a Ca^{2+}, generalmente la calmodulina. La transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) es un fenómeno por el cual al excitar una molécula fluorescente en su máximo de excitación, ésta emite fluorescencia a una longitud de onda más larga y a su vez, excita a una segunda molécula, que absorbe la energía transmitida y emite a una longitud de onda aún mayor. El mecanismo de FRET se aplicó por primera vez a las proteínas fluorescentes cuando el grupo de R. Tsien creó la proteína fluorescente azul (BFP) a partir de la GFP, clonó los cDNA de ambas proteínas en tándem con un péptido enlazante, y al excitar la proteína azul, registró la emisión de la verde (Heim y Tsien, 1996). Las dos familias de sensores de Ca^{2+} llamadas Camaleones y TN (troponina) están basadas en el mecanismo FRET.

2.2.2.3.1. CAMALEONES

El primer GECI fluorescente consistía en 4 moléculas unidas entre sí: la BFP, la calmodulina (CaM), el péptido M13 de la quinasa de la cadena ligera de la miosina, y la GFP. En presencia de Ca^{2+}, la CaM cambia de conformación y engarza al péptido, acercando de este modo las dos proteínas fluorescentes e incrementando la eficiencia del FRET. Esto hace

que los camaleones sean sensores ratiométricos de emisión, que se excitan con luz violeta y emiten luz azul y verde en función de la presencia o ausencia de Ca^{2+}. La $[Ca^{2+}]$ es proporcional al cociente de la fluorescencia de la GFP entre la de la BFP. A este sensor se le llamó Camaleón en referencia a la abreviatura de la calmodulina, por el cambio de color de azul a verde que se produce con la unión a Ca^{2+}, y la similitud del péptido M13 a la lengua retráctil del camaleón que saldría disparada fuera de la "boca" de la CaM (Miyawaki y cols., 1997). Este GECI tenía poca fluorescencia. Para mejorarla se sustituyeron las FP por la ECFP y EYPF, dando lugar al camaleón amarillo YC2 (**Figura 8**). Este sensor era más brillante, tenía mayor SNR, y fototoxicidad reducida respecto al camaleón original, aunque padece de un bajo rango dinámico, una alta sensibilidad al pH (pK_a = 6.9) y fotocromismo (Miyawaki y cols., 1997).

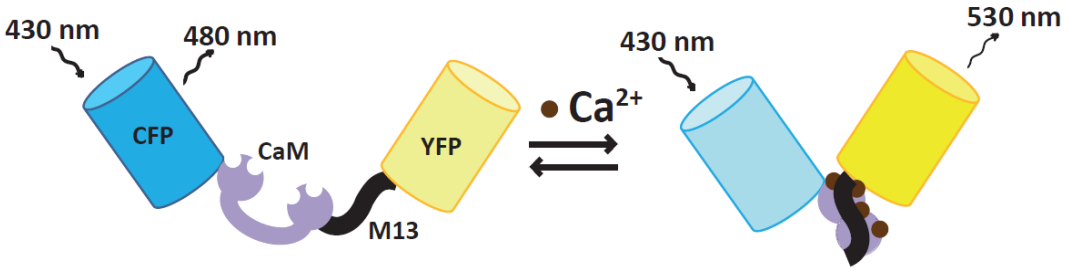

Figura 8. Esquema del funcionamiento de los camaleones. En ausencia de Ca^{2+}, la calmodulina (en violeta) no está unida al péptido M13 (en negro), por lo que el FRET es ineficiente entre las dos FP (cilindros azul y amarillo). En presencia de Ca^{2+} la CaM interacciona con el péptido M13, acercando las FP y aumentando la eficiencia del FRET.

La sensibilidad al pH mejoró al introducir las mutaciones V68L y Q69K en la YFP mejorada (EYFP), disminuyendo el pKa a 6.1. Aun así, el sensor era sensible al Cl^- y exhibía un problema de plegamiento a 37°C en el RE (Miyawaki y cols., 1999). Para solventarlo se desarrolló la proteína Citrina (Heikal y cols., 2000), una YFP con mayor resistencia al pH (pKa = 5.7) y una mejor eficiencia de plegamiento a 37°C en los orgánulos. Precisamente la baja sensibilidad al pH del camaleón de Citrina se demostró midiendo $[Ca^{2+}]$ en el aparato de Golgi (Griesbeck y cols., 2001). Posteriormente se desarrolló la proteína Venus a partir de la YFP, que tras permutarla circularmente, resultó ser la YFP más brillante. Con ella se crearon los camaleones YC3.60 e YC4.60, con un rango dinámico de 6.6 y 4.6 respectivamente, y K_ds de 250 nM el YC3.60, y 58 nM y 14.4 µM el YC4.60 (Nagai y cols., 2004). Recientemente, se introdujo la serie YC-Nano, que

tiene una mayor afinidad por Ca^{2+} y rango dinámico que sus predecesores (Shimomura, 2009).

Debido al solapamiento de sus espectros, no era posible combinar los camaleones con el indicador sintético Fura-2 para medir en dos compartimentos celulares a la vez. Para solventar este inconveniente se desarrolló un camaleón naranja con las proteínas fluorescentes cp173-mGFP y mKOκ, llamado GO-Cam. Aunque este sensor permite la medición simultánea con Fura-2, padece de un rango dinámico pequeño (Waldeck-Weiermair y cols., 2012).

2.2.2.3.2. SENSORES DE Ca^{2+} BASADOS EN TROPONINA

Uno de los inconvenientes de los camaleones es que la calmodulina, en la que están basados, se encuentra en gran abundancia en el interior de las células. Dada la gran cantidad de efectores celulares de la calmodulina, es probable que los camaleones puedan verse afectados por interacciones indeseadas que interferirían con la medición. Como alternativa, se sustituyó la calmodulina de los camaleones por la troponina C (TnC), una proteína de unión a Ca^{2+} con 4 manos EF menos común, ya que es específica de músculo esquelético y cardiaco. La TnC rápida de músculo esquelético de pollo se insertó entre la CFP y la Citrina, dando lugar a la TN-L15 (**Figura 9**), de afinidad intermedia por Ca^{2+} (K_d de 1.2 μM), afinidad alta por Mg^{2+} (K_d de 500 μM) y rango dinámico de 2 (Heim y Griesbeck, 2004).

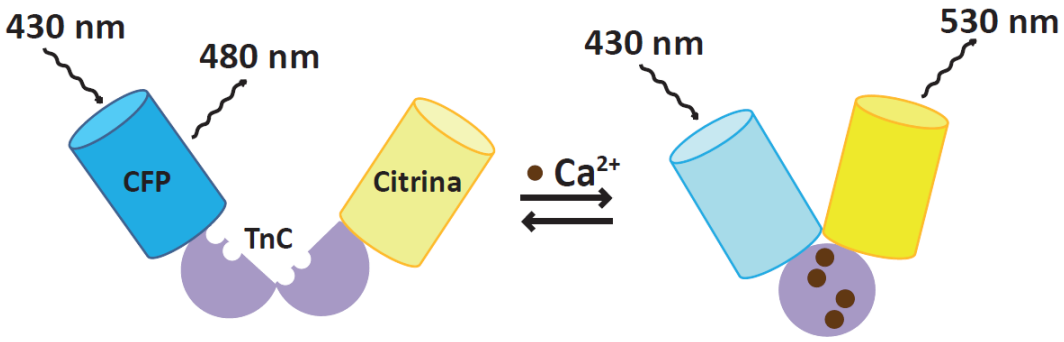

Figura 9. Esquema del funcionamiento de los sensores basados en TnC. En ausencia de Ca^{2+}, la TnC está en un estado laxo, disminuyendo la eficiencia del FRET. En presencia de Ca^{2+} la TnC adquiere una conformación más compacta y acerca las FP, aumentando el FRET.

El TN-L15 se optimizó sustituyendo la Citrina por la cp174Citrina, que incrementó el rango dinámico en ausencia de Mg^{2+}, aunque disminuyó en presencia de dicho ión. Esta alta afinidad por el Mg^{2+} se corrigió mutando varios residuos de las manos EF tercera y cuarta de la TnC. El sensor resultante se llamó TN-XL (K_d = 2.5 μM), tiene un rango dinámico mayor que TN-L15, y es totalmente insensible a Mg^{2+} (Mank y cols., 2006; Mank y cols., 2008). Para incrementar la afinidad a Ca^{2+}, se clonaron en tándem dos dominios C terminales de la TnC (de alta sensibilidad a Ca^{2+}) con las mutaciones para eliminar la afinidad por el Mg^{2+}, creando la variante TN-XXL (K_d = 800 nM) (Mank y cols., 2008). Recientemente se han descrito los sensores Twitch, que tienen una sola mano EF, mayor brillo, menor sensibilidad al Mg^{2+} y mayor rango dinámico que sus antecesores (Thestrup y cols., 2014). Debido a su composición de troponina, estos sensores no pueden utilizarse en el tejido muscular.

2.2.2.4. SENSORES DE Ca^{2+} NO BASADOS EN FRET

Estos sensores tienen una única proteína fluorescente, y una molécula de unión a Ca^{2+} capaz de alterar el estado de protonación del cromóforo, haciendo que aumente o disminuya la emisión de fluorescencia.

2.2.2.4.1. CAMGAROO

Estudiando los efectos de insertar diversas proteínas en la secuencia de las FP, se descubrió que insertando la CaM se obtenían sensores de Ca^{2+}, de los cuales el que mejor respuesta presentaba era el que contenía la YFP mejorada (EYFP) (**Figura 10**). Al unir Ca^{2+}, el cambio de conformación de la proteína CaM provoca la desprotonación del cromóforo de la YFP, aumentando su fluorescencia. Este sensor fue llamado Camgaroo-1 ya que la YFP contiene a la proteína CaM en una "bolsa", es amarillo, y su fluorescencia "da un salto" en presencia de Ca^{2+} (Baird y cols., 1999). Tiene un máximo de excitación a 500 nm y un máximo de emisión a 520 nm. Al sustituir la YFP por la Citrina se mejoró la señal basal y la sensibilidad al pH, pero el rango dinámico era bastante pobre, y más allá de estas mejoras iniciales, este sensor no ha sido optimizado ni utilizado (Griesbeck y cols., 2001; Mank y Griesbeck, 2008).

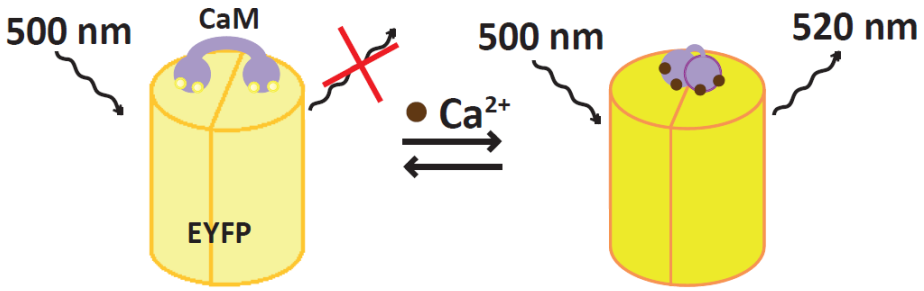

Figura 10. Esquema del funcionamiento del Camgaroo. En ausencia de Ca^{2+}, la CaM está distendida, favoreciendo la protonación del cromóforo, lo que impide la emisión de fluorescencia. En presencia de Ca^{2+}, la CaM adquiere una conformación más compacta, produciendo la desprotonación del cromóforo, y la emisión de fluorescencia.

2.2.2.4.2. PERICAM

El Pericam está compuesto de la cpEYFP(V68L/Q69K) *per*mutada circularmente, la *CaM* y el péptido M13, unidos en los extremos C y N terminal, respectivamente. Este sensor tiene un único máximo de excitación a 500 nm y un único máximo de emisión a 520 nm (**Figura 11**).

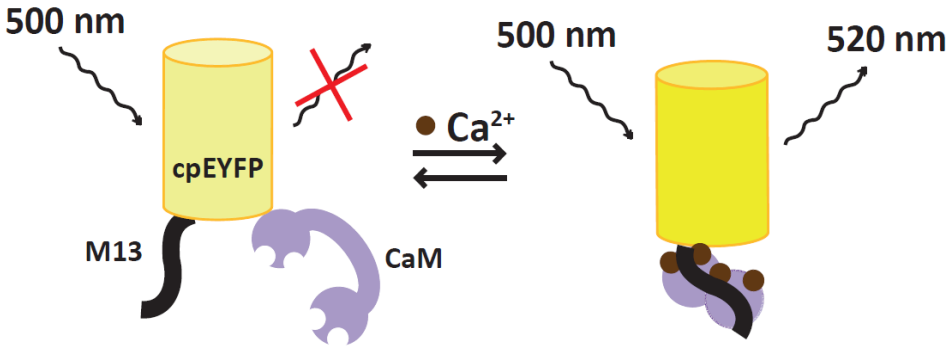

Figura 11. Esquema del funcionamiento del Pericam. En ausencia de Ca^{2+}, la CaM y el péptido M13 no están unidos, mientras que en presencia de Ca^{2+}, la CaM se une al péptido M13. El cambio de conformación de ambas proteínas provoca que el cromóforo de la cpYFP se protone y emita fluorescencia.

De este primer sensor se derivaron otros tres: el flash-pericam, que tiene mayor rango dinámico y mejor plegamiento a 37°C; el pericam ratiométrico, que tiene dos picos máximos de excitación a 494 nm y 515 nm; y el pericam invertido, que es fluorescente en ausencia de Ca^{2+}, y en presencia de Ca^{2+} disminuye su emisión en un 85% (Nagai y cols., 2001). El Pericam se ha dirigido a varios orgánulos como el núcleo y la mitocondria. De hecho, a pesar de todos los GECIs disponibles en la actualidad, sigue

siendo uno de los más utilizados para medir la $[Ca^{2+}]_M$ (revisado por (Jean-Quartier y cols., 2012)).

2.2.2.4.3. GCaMPs

A pesar de la existencia de varios sensores de Ca^{2+}, estos seguían padeciendo de una limitada señal y de una baja resolución espacio-temporal. Para remediarlo se creó un nuevo sensor con una EGFPcp unida en su extremo N terminal al péptido M13, y a CaM en su extremo C terminal. Tras una serie de mutaciones para eliminar la fotoisomerización y aumentar el brillo, se obtuvo una sonda llamada GCaMP1 (G por verde, y CaM por la calmodulina). Tenía un único pico máximo de excitación a 489 nm y otro de emisión a 509 nm, un rango dinámico de 4.5 y una K_d de 235 nm, por lo que es una sonda adecuada para medir en el citosol (Nakai y cols., 2001). Con la intención de aumentar su rango dinámico, los residuos limítrofes de las permutaciones circulares se sometieron a mutagénesis al azar, surgiendo el Case12 y el Case 16, llamados así por sus rangos dinámicos de 12 y 16, respectivamente. Sin embargo, estos sensores eran muy sensibles a pH debido a su pKa de 7.2 (Souslova y cols., 2007). Distintas mutaciones realizadas en la EGFPcp del GCaMP1 dieron lugar a las variantes GCaMP1.6 (Ohkura y cols., 2005) y GCaMP2 (Tallini y cols., 2006) (**Figura 12**).

Más adelante apareció el GCaMP3, que se desarrolló tras eliminar la arginina adyacente a la primera metionina del GCaMP2, una ronda de mutagénesis dirigida en los residuos cercanos al cromóforo, y una mutación puntual sobre la CaM. El GCaMP3 tenía un rango dinámico de 12 y una K_d de 660 nM, y comparado con los mejores sensores de la familia TnC y camaleones, tiene menos señal basal, pero mejor SNR y fotoestabilidad (Tian y cols., 2009). Estas características lo convierten en uno de los GECIs citosólicos más utilizados actualmente.

A pesar de sus ventajas, el GCaMP3 carecía de la sensibilidad necesaria para monitorizar cambios de $[Ca^{2+}]_C$ provocados por un potencial de acción, una de las principales aplicaciones de los GECIs en el campo de la neurociencia. Mediante el diseño dirigido por la estructura y revisión semirracional, se generaron las familias GCaMP5 (Akerboom y cols., 2012) y GCaMP6 (Chen y cols., 2013). Este último ha sido llamado superindicator,

por su alta sensibilidad a Ca^{2+}, y por ser hasta ahora el GECI con la cinética más rápida.

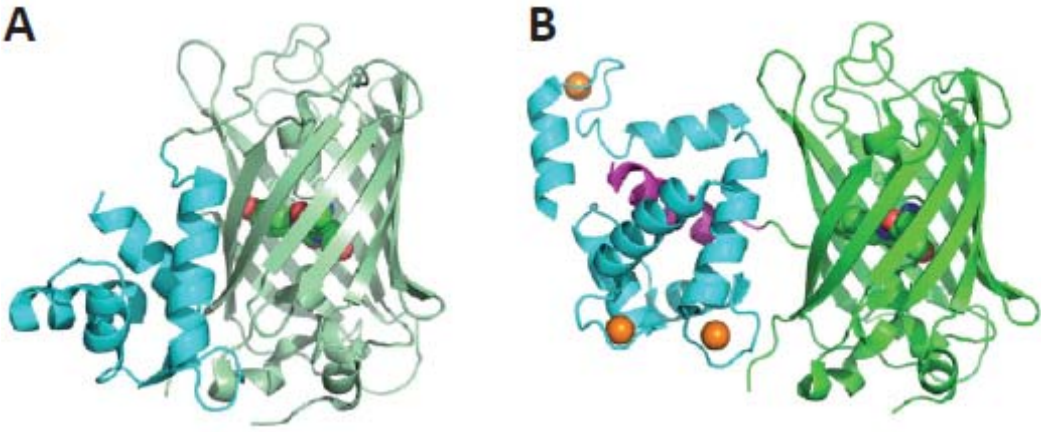

Figura 12. Estructura tridimensional del GCaMP2. (A) En ausencia de Ca^{2+} no aparece el péptido M13, probablemente porque el péptido enlazante a la GFP es demasiado flexible como para cristalizar adecuadamente. La CaM (en azul) aparece solo parcialmente. La GFP se ve en verde, con el cromóforo resaltado como esferas. (B) En presencia de Ca^{2+} (esferas naranjas) la sonda se ve casi completa, con la CaM alrededor del péptido M13 (en violeta) (figura obtenida de (Ai, 2015)).

Para compatibilizar las mediciones de Ca^{2+} con la optogenética, era de sumo interés conseguir GCaMPs de diversos colores. Por ello, se incorporaron a la GFP del GCaMP las mutaciones necesarias para obtener un sensor azul (BCaMP), cian (CyCaMP) y amarillo (YCaMP); para la sonda roja (RCaMP) se empleó la mRubycp. Tras una serie de mutaciones, se obtuvieron diversas variantes con mejor maduración del cromóforo, brillo, rango dinámico, cinética y afinidad (Akerboom y cols., 2013).

2.2.2.4.4. GECOs

Los sensores GECO (de *Genetically Encoded Ca^{2+} indicators for Optical imaging*) son derivados del GCaMP3. Existen variantes de GECO de varios colores: verde (G-GECO), azul (B-GECO) y rojo (R-GECO). Al igual que su predecesor GCaMP3, son sensores intensiométricos, aunque también hay variantes ratiométricas, uno de emisión, el GEM-GECO, y otro de emisión, GEX-GECO (Zhao y cols., 2011). Comparado con el GCaMP3, el R-GECO1 resultó ser una mejor sonda para registrar potenciales de acción en neuronas con microscopía confocal (Walker y cols., 2013). Recientemente

el sensor rojo se ha optimizado para microscopía de dos fotones, el REX-GECO1, de alta afinidad (K_d = 240 nM) (Wu y cols., 2014a).

2.2.2.5 SENSORES DE Ca^{2+} DE BAJA AFINIDAD

Aunque la mayoría de los sensores de Ca^{2+} existentes en la actualidad son de alta afinidad, también se han creado algunos sensores de baja afinidad, más adecuados para medir en organelas o microdominios de alta [Ca^{2+}], cuyas características aparecen especificadas en la **Tabla 3**.

Los primeros GECIs fluorescentes de menor afinidad fueron los camaleones YC3, de afinidad intermedia (K_d = 4.4 μM), y el YC4, de baja afinidad (K_{d1} = 83 nM, K_{d2} = 700 μM) (Miyawaki y cols., 1999). YC4 tenía la afinidad adecuada para medir en compartimentos de alta [Ca^{2+}], pero el hecho de tener dos K_ds complicaba el análisis de la señal fluorescente. Otro camaleón de baja afinidad, llamado YC6.2er, fue desarrollado a partir de la CFP, el extremo N terminal de la proteína CaM, el péptido de la quinasa de la quinasa dependiente de CaM (CKKp), el extremo C terminal de la CaM, y la YFP (Truong y cols., 2001). Sin embargo, el YC6.2er no fue particularmente caracterizado, y no se ha vuelto a utilizar.

Como se ha mencionado anteriormente, una limitación de utilizar la calmodulina como el módulo sensor de Ca^{2+} es que es muy abundante en las células y tiene muchos efectores celulares, lo cual puede interferir con la señal de fluorescencia. Esto se solucionó creando una calmodulina en la que los residuos implicados en la interfase entre la CaM y el MLCK (cadena ligera de la miosina quinasa), se han sustituido de tal forma que se inhibía la interacción con sus efectores. De esta forma se obtuvo el D1ER, un camaleón con el par ECFP-Citrina de baja afinidad (Palmer y cols., 2004) y el D4cpv, formado por la pareja CFP-cpVenus (Palmer y cols., 2006). El camaleón original también se separó en dos proteínas independientes, ECFP-CaM y Citrina-M13, con el objetivo de reducir la señal FRET basal del sensor, generándose el sensor split-YC7.3er (Ishii y cols., 2006). Aunque el split-YC7.3er exhibía una K_d y rango dinámico adecuados, tenía la desventaja de tener que expresar dos proteínas de forma equimolar, lo cual no siempre es una tarea fácil. D1ER era bifásico y padecía de un pequeño rango dinámico, lo que fue corregido en el D4cpv. A pesar de estas limitaciones, ambos camaleones han sido los sensores de baja afinidad más empleados. Recientemente también se ha creado un

derivado del D1ER rojo, el D1ERCmR2, sustituyendo el par de proteínas fluorescentes original por el par Clover-mRuby2. Al igual que la mayoría de los componentes de esta familia, no tenía un buen rango dinámico (Waldeck-Weiermair y cols., 2015).

Más adelante se desarrolló una nueva familia de sensores de baja afinidad, los CatchER. Se basaban en una EGFP a la que sustituyeron cinco aminoácidos situados próximos al cromóforo por residuos acídicos para crear una mano EF artificial. Es un sensor de rápida cinética y baja afinidad, con una K_d de 180 μM, o 480 μM en presencia de 100 mM KCl. Este sensor se direccionó al RE (de ahí su nombre), y se expresó en fibras aisladas de músculo de ratón. El CatchER es el GECI fluorescente de menor tamaño que existe y el único en que la función sensora de Ca^{2+} y emisora de señal fluorescente las ejerce la misma proteína. Sin embargo tiene la desventaja de tener un rango dinámico pequeño, y aún no se ha probado *in vivo* (Tang y cols., 2011).

Otra de las familias que tiene un miembro de baja afinidad es la de las TnC, concretamente la variante Twitch, denominada 2N1 390 54S+ B, que tiene una K_d de 253 μM adecuada para medir en RE (Thestrup y cols., 2014).

A partir de los GCaMP se han originado 3 tipos de sensores de baja afinidad: el LAR-GECO1, el CEPIA y el GCaMPer. LAR-GECO1 procede del R-GECO, donde se sustituyeron los dominios CaM y M13 por los correspondientes de D4cpv (Wu y cols., 2014b). Este sensor tiene la desventaja de su afinidad no es lo suficientemente baja. Los sensores CEPIA (siglas un tanto aleatorias de *calcium-measuring organelle-entrapped protein indicator*) se concibieron desde un principio para ser sondas de baja afinidad por Ca^{2+}. Los CEPIAs son derivados del GCaMP2, al que se sometió a una serie de mutaciones basándose en los GECOs, y seleccionadas en estudios de estructura y función. Esto dio lugar a dos sondas intensiométricas de baja afinidad, una verde (G-CEPIA1er), y otra roja (R-CEPIA1er), además de una sonda ratiométrica de emisión llamada GEM-CEPIA1er (Suzuki y cols., 2014). Los CEPIAs poseen un amplio rango dinámico y una K_d adecuada, pero al ser intensiométricos no es fácil calibrar la señal fluorescente en $[Ca^{2+}]$. Para solventar este inconveniente se puede emplear el GEM-CEPIA, aunque su longitud de onda de excitación está en el ultravioleta. Muy similar, pero con menor rango dinámico que los CEPIAs, es el GCaMPer, generado recientemente mediante cuatro

mutaciones en los bucles de las manos EF del GCaMP3 (Henderson y cols., 2015).

Sensor	Tipo	K_d	n	Rango dinámico	λ (nm)		Referencia
					Exc	Em	
INDICADORES SINTÉTICOS							
Mag-Fura-2	Ratiométrico de excitación	53 μM	1	1.7	350 385	510	(Hofer y Machen, 1993)
Mag-Indo-2	Ratiométrico de emisión	30 μM	1	20	355	400 480	(Lattanzio y Bartschat, 1991)
Rhod-5N	Intensiométrico	320 μM	1	50	551	575	
CaGF	Intensiométrico	60 μM	1	2.5	488	530	(Tour y cols., 2007)
GECIs							
YC4er	Ratiométrico de emisión	83 nM 700 μM	1.5 0.87	1.5	440	485 535	(Miyawaki y cols., 1997)
D1ER	Ratiométrico de emisión	0.8 μM 60 μM	1.18 1.63	1.5	440	485 535	(Palmer y cols., 2004)
D4cpv	Ratiométrico de emisión	80 μM	1.35	3.8	440	485 535	(Palmer y cols., 2006)
split-YC7.3er	Ratiométrico de emisión	130 μM	1.4	2.6	440	485 535	(Ishii y cols., 2006)
CatchER	Intensiométrico	180 μM	0.94	1.5	490	510	(Tang y cols., 2011)
Twitch	Ratiométrico de emisión	253 μM		4.4	432	475 527	(Thestrup y cols., 2014)
G-CEPIA1er	Intensiométrico	672 μM	1.95	4.7	472	520	(Suzuki y cols., 2014)
R-CEPIA1er	Intensiométrico	565 μM	1.7	8.8	562	641	(Suzuki y cols., 2014)
GEM-CEPIA1er	Ratiométrico de emisión	558 μM	1.37	21.7	377	466 520	(Suzuki y cols., 2014)
D1ERCmR2	Ratiométrico de emisión	220 μM	0.5	1.1	480	560 510	(Waldeck-Weiermair y cols., 2015)
GCaMPer	Intensiométrico	238 μM	0.93	2	490	540	(Henderson y cols., 2015)
LAR-GECO1	Intensiométrico	24 μM	1.3	10	559	647	(Wu y cols., 2014b)

Tabla 3. Sensores de Ca^{2+} de baja afinidad.

3. MEDIDAS *IN VIVO* MEDIANTE LA EXPRESION DE GECIs

Una de las principales aplicaciones de los GECIs es su utilidad en los estudios del animal entero *in vivo*. Según se han ido perfeccionando los sensores de Ca^{2+} en la última década, han ido apareciendo nuevas aplicaciones, desde estudios en neurociencia a tejido muscular, por ejemplo. La expresión de los sensores se ha logrado mediante la generación de animales transgénicos, la electroporación del cDNA o la infección con virus. Los virus ofrecen mayor versatilidad, ya que existen muchos tipos disponibles, y es fácil clonar los promotores específicos de tejido y el cDNA del sensor de interés en el genoma viríco (adaptado para su producción *in vitro*). Las microinyecciones de cDNA permiten una expresión más localizada en la región donde se realiza la microinyección. Sin embargo, con estos métodos se requiere la manipulación del animal, y la necesidad de esperar a que el sensor se exprese lo suficiente para poder hacer mediciones. Esto no ocurre con las líneas transgénicas, que al contener el gen del sensor, no requieren de manipulación previa al experimento.

La expresión "medidas *in vivo*" implica la medición de la señal fluorescente en animales vivos, aunque a veces en la literatura se utiliza esta expresión de forma incorrecta, para referirse a la medición en tejidos extraídos de un animal transgénico para un sensor de Ca^{2+} determinado.

La aequorina ha sido el primer GECI empleado para hacer estudios de Ca^{2+}, primero microinyectándola en células de gran tamaño o embriones, y luego mediante el empleo de su cDNA para su expresión transitoria o estable en todo tipo de organismos, como bacterias, levaduras, algas, plantas y animales. Este sensor se ha empleado para mediciones tanto en célula única como en tejido u animal entero (Webb y cols., 2010). Un ejemplo de medida con aequorina en animal entero fueron las realizadas sobre ratones neonatos que expresan de forma condicional la fusión GFP-aequorina en la mitocondria. Se midieron los incrementos de $[Ca^{2+}]_M$ mientras los ratones se movían libremente, o durante ataques epilépticos, en los que se registraron señales de Ca^{2+} sincronizadas, y ondas de Ca^{2+} a través de todo el animal (Rogers y cols., 2007). Al igual que las mediciones en células, la aequorina cuenta con la ventaja de poseer un alto coeficiente señal/ruido, pero tiene la desventaja de necesitar la inyección de la celenteracina en el animal, con la incertidumbre de la concentración final

en el tejido de interés. Además, no es posible medir $[Ca^{2+}]_{RE}$ en animales transgénicos para aequorina *in vivo*, ya que no se pueden vaciar los depósitos intracelulares del animal para impedir que la aequorina se consuma según se va reconstituyendo.

Estas desventajas no las tienen los animales transgénicos para sensores fluorescentes. La mayor parte de los transgénicos se han hecho con sensores de alta afinidad y basados en calmodulina, que expresaban el sensor en tipos celulares específicos como las células β de islotes de Langerhans, los cardiomiocitos o las neuronas. Sin embargo, los resultados han sido decepcionantes debido a la disminución del coeficiente señal/ruido respecto a las mediciones *in vitro*. Esto se ha achacado a que un porcentaje del sensor expresado no es funcional, y se encuentra acomplejado o en forma no soluble (Kotlikoff, 2007).

Los sensores Camgaroo-2 y Pericam invertido fueron los primeros sensores expresados específicamente en las neuronas de ratones transgénicos, y con ellos se hicieron mediciones *in vivo* en el citosol de las neuronas olfatorias (Hasan y cols., 2004). También se crearon ratones transgénicos del TN-XXL, en los que hicieron registros de Ca^{2+} citosólico sobre la misma neurona en la corteza visual repetidas veces (Mank y cols., 2008).

Los sensores citosólicos más utilizados han sido los GCaMPs, con los que también se han hecho bastantes trabajos *in vivo*. Para evitar la citotoxidad provocada por la sobreexpresión del sensor en tejidos especialmente sensibles como el corazón, se generaron ratones condicionales para el GCaMP2 citosólico y el sistema tetO, ambos expresados en el músculo cardiaco. La expresión de GCaMP2 se inhibía tratando a los ratones desde su desarrollo en el útero con doxiciclina para evitar la citotoxicidad que conlleva su sobreexpresión. Para que el sensor se exprese, había que suprimir el tratamiento de doxiciclina hasta seis semanas antes de los experimentos. En los experimentos realizados *in vivo* se registraron ondas de Ca^{2+} citosólico que se propagaban desde los nodos sinoauricular y atrioventricular al resto del órgano (Tallini y cols., 2006). Posteriormente se generaron ratones transgénicos para los sensores citosólicos GCaMP2.2c y el GCaMP3 bajo el control del promotor neuronal Thy1. Con ellos se registraron *in vivo* los incrementos de $[Ca^{2+}]_C$ en neuronas del bulbo olfatorio y de la corteza somatosensorial (Chen y cols., 2012). Más adelante, con estos ratones se observó que la metilprednisolona, utilizada

en el tratamiento de lesiones de médula espinal, protege a las neuronas dañadas de una entrada excesiva de Ca^{2+} al citosol (Tang y cols., 2015). Cuando se generaron los sensores GCaMP5, fueron expresados en las neuronas del ganglio de la retina de ratones mediante inyecciones de virus adenoasociados. También se generaron moscas y gusanos transgénicos, en los que se midieron incrementos de $[Ca^{2+}]_C$ en *Drosophila* en fase de larva (motoneuronas) y adultos (neuronas olfativas), y en neuronas olfativas del gusano *Caenorhabditis elegans* (Akerboom y cols., 2012). Cada vez hay más interés en combinar los sensores de Ca^{2+} las sondas optogenéticas, como se ha hecho con los RCaMPs, con los que se realizaron mediciones en el citosol de músculo esquelético y neuronas sensoriales del gusano *C. elegans* transgénicos (Akerboom y cols., 2013).

También se han realizado medidas *in vivo* en orgánulos como la mitocondria o el RE. El cDNA del camaleón YC2 dirigido a la mitocondria fue microinyectado en músculo esquelético de ratón, y a las 2-3 semanas se registró la captación del Ca^{2+} por parte de esta organela durante las contracciones musculares (Rudolf y cols., 2004). Más adelante, se realizó el mismo procedimiento con el sensor reticular D1ER, con el que se midieron bajadas de $[Ca^{2+}]_{RE}$ en fibras musculares de ratón despolarizadas (Rudolf y cols., 2006). El único ratón transgénico para un sensor reticular son los que generaron (Hara y cols., 2004), que expresan el sensor reticular YC3.3er específicamente en las células β pancreáticas, con el que se registraron vaciamientos del RE inducidos por el neurotransmisor acetilcolina o por tapsigargina. Como contrapartida, el YC3.3er sufría de un menor rango dinámico *in vivo* que *in vitro*, ya que disminuyó de 2.8 a 1.6.

4. ANTECEDENTES: GAP y GAP1

Esta Tesis forma parte de un proyecto más amplio y todavía en curso de desarrollo de una nueva familia de sensores de Ca^{2+}. El trabajo entronca con otro anterior en el que se describe un nuevo sensor de Ca^{2+} fluorescente basado en la fusión de una versión de la GFP (la GFPuv o C3) con la apoaequorina, al que se llamó GAP, de *GFP-Aequorin Protein*. Las proteínas GFPuv y aequorina están unidas por un péptido enlazante de dieciocho aminoácidos, cuya secuencia se especifica en la **Figura 13A**.

GAP es una proteína fluorescente que mantiene el espectro de excitación de la GFP parental, ya que presenta dos picos máximos de excitación a 405

nm y 470 nm, y un único máximo de emisión a 510 nm. En ausencia de Ca^{2+}, el pico es mayor a 405 nm y menor a 470, mientras que en presencia de Ca^{2+} la intensidad de fluorescencia disminuye a 405 nm, y aumenta a 470 nm (**Figura 13B**). El rango dinámico, es decir, la variación del cociente F_{470}/F_{403} en presencia y ausencia de Ca^{2+} es de 3.6 calculado *in vitro*.

El sensor GAP original, denominado GAPwt (de tipo salvaje), está compuesto de la aequorina de tipo salvaje, por lo que es una sonda de alta afinidad, con una K_d de 660 nM (**Figura 13C**). Este sensor es, por lo tanto, adecuado para medir Ca^{2+} en compartimentos como el citosol o el núcleo.

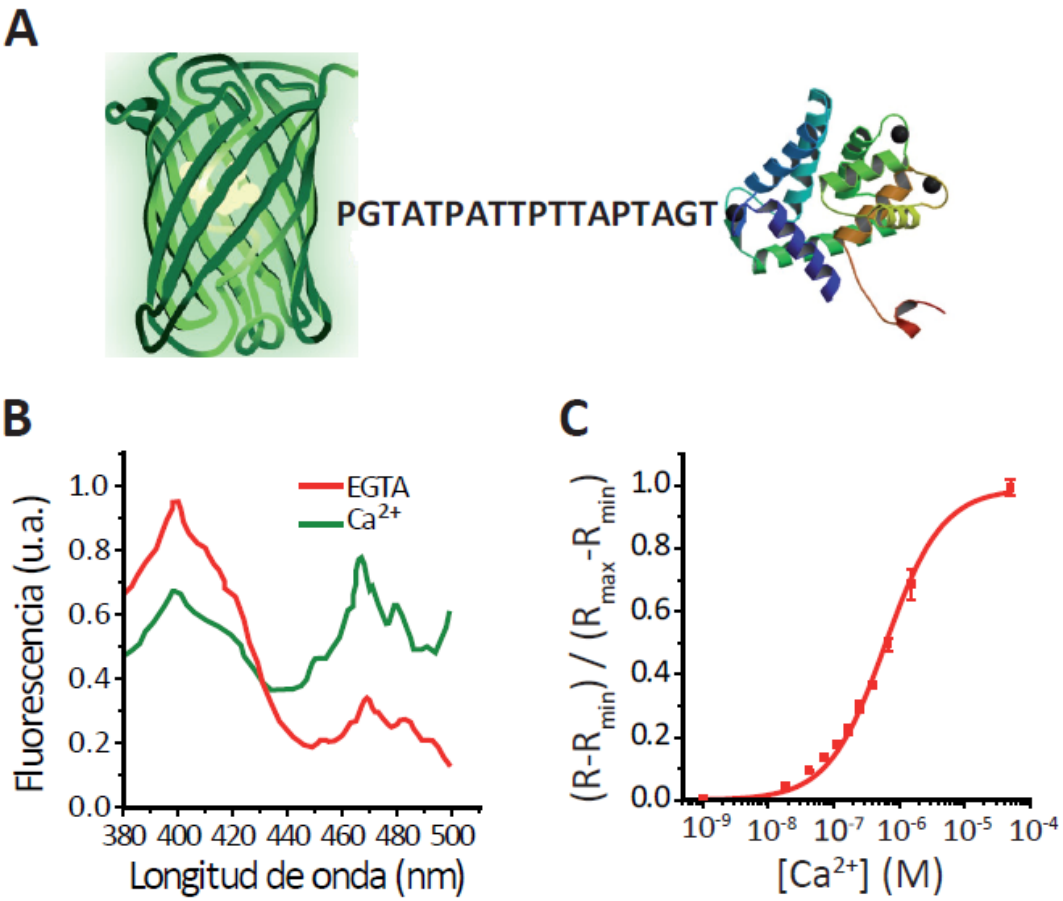

Figura 13. Características de GAPwt. (A) Esquema de la arquitectura de GAPwt, formada por la GFPuv unida en su extremo C terminal a la aequorina a través de un péptido enlazante de 18 aminoácidos. (B) Espectro de excitación de GAPwt, 8.5 μg de proteína en PBS y en ausencia de Ca^{2+} (EGTA 0.1 mM) o presencia de $CaCl_2$ 1 mM. (C) Calibración in *vitro* de GAPwt, realizado con tampones de EGTA y EGTA-Ca^{2+}, en medio KCl 140 mM, $MgCl_2$ 1 mM y MOPS 20 mM pH 7.2. La K_d de esta proteína es de 660 nM.

Para generar un sensor fluorescente idóneo para medir en las organelas de alta [Ca^{2+}], debía reducirse la afinidad por Ca^{2+} de la proteína. Al contrario de la calmodulina, donde se ha estudiado exhaustivamente la relación estructura-función, en la bibliografía existen pocos trabajos donde se haya mutado la aequorina con intención de reducir su afinidad (Tsuji y cols., 1986; de la Fuente y cols., 2012). Uno de los residuos mutados es el aspartato 119, como se comentó en la sección 2.2.1.1 (Aequorina). El aspartato 119 es un residuo esencial para la coordinación con el Ca^{2+} en la tercera mano EF de la aequorina, y su sustitución por alanina reduce la afinidad del complejo aequorina-celenterazina unas 20 veces en un ensayo de bioluminiscencia (Kendall y cols., 1992c). Se comprobó inicialmente que la mutación D119A sola no era suficiente para disminuir la afinidad de GAP por Ca^{2+} de forma sustancial. Por esto, partiendo de esta mutación, se realizaron ensayos de mutagénesis donde se mutaron otros 13 residuos, bien como mutaciones puntuales o bien como combinaciones de dos o más. En general se eligieron posiciones ocupadas por los residuos que participan directamente en la pirámide de coordinación del Ca^{2+}, es decir, las posiciones consensuadas como X, Y, Z, -Y, -X y –Z en las 3 manos EF funcionales de la aequorina. Por ejemplo, la posición X está ocupada por un aspartato, y la –Z por un glutamato, que están muy conservado en los tres lazos (**Tabla 4**).

	X		Y		Z		-Y		-X			-Z
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
EF1:	D	V	N	H	N	G	K	I	S	L	D	E
	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128
EF3:	D	K	D	Q	N	G	A	I	T	L	D	E
	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164
EF4:	D	I	D	E	S	G	Q	L	D	V	D	E

Tabla 4. Secuencias primarias de los lazos de las tres manos EF funcionales de la aequorina. Los números representan las posiciones en la secuencia primaria de la aequorina. En rojo está indicado el aspartato 119. En azul se representan los residuos adicionales que se han mutado.

De todos los mutantes probados, el que mejor resultados ofrecía en un ensayo *in situ* era el que portaba las mutaciones D117A, D119A y D163A, que fue llamado GAP1 (Rodriguez-Garcia y cols., 2014). Se realizó una

calibración *in vivo* de esta proteína, con células HeLa que expresan de forma estable este sensor dirigido al RE con el péptido de direccionalidad de la calreticulina y el péptido de retención KDEL. Esta nueva proteína vio reducida la afinidad por calcio en dos órdenes de magnitud respecto a GAPwt (**Figura 14**) con una K_d de 12 μM.

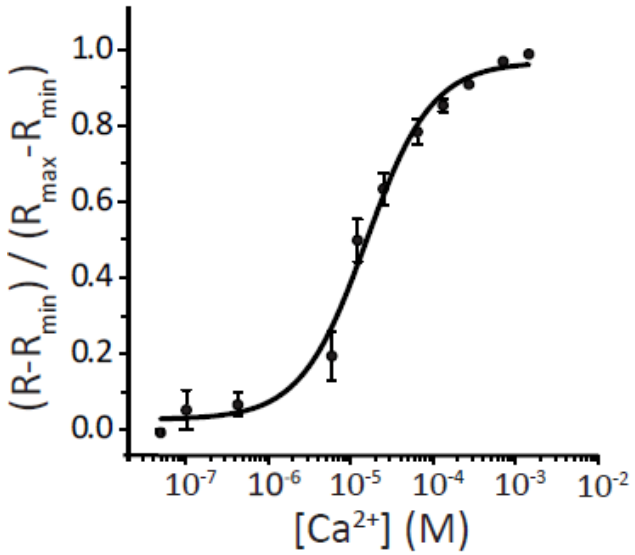

Figura 14. Afinidad de GAP1 por Ca^{2+}. La calibración *in vivo* de GAP1 se realizó con medios internos con ionóforos y tampones de EGTA y EGTA-Ca^{2+}, dando una K_d de 12 μM. En esta gráfica se aprecia el aumento de la K_d en dos órdenes de magnitud respecto a GAPwt.

Es importante resaltar que las proteínas GAP son sensores fluorescentes, que no requieren de la reconstitución de la aequorina con su cofactor coelenteracina para medir el Ca^{2+}. No obstante, si GAP se reconstituye, también puede ser empleada como sensor bioluminiscente (Rodriguez-Prados y cols., 2015), ampliándose de este modo su rango de aplicaciones. GAP es, por lo tanto, una familia única de sensores mixtos, tanto fluorescentes como bioluminiscentes.

OBJETIVOS

Cuando una cosa está hecha, no mire hacia atrás. Mire su próximo objetivo.

George Marshall

El RE es el principal almacén de calcio intracelular y desempeña un papel crucial en la homeostasis de este ión, acumulándolo en su lumen durante el reposo y liberándolo al citosol durante la activación celular. Mantener alta la $[Ca^{2+}]_{ER}$ es esencial para la función del RE, y la depleción mantenida desencadena estrés reticular y respuesta a las proteínas desplegadas (unfolded protein response, UPR) y apoptosis. Por este motivo, es esencial poder medir la $[Ca^{2+}]_{ER}$ con fidelidad y precisión. Aunque existen muchas sondas de Ca^{2+}, la mayor parte tienen alta afinidad por el Ca^{2+} y no son apropiadas para medir las altas concentraciones existentes en el RE, pues se saturan y dejan de medir. Nuestro grupo ha descrito una nueva familia de sensores fluorescentes de Ca^{2+} basada una proteína de fusión de GFP y aequorina, el GAP.

El objetivo general de esta Tesis fue generar un nuevo sensor de la familia GAP con baja afinidad por Ca^{2+} (0.1-1 mM), optimizado para monitorizar $[Ca^{2+}]_{RE}$, y demostrar que la nueva sonda es apropiada para medir en condiciones lo más fisiológicas posible, idealmente *in vivo.* Para ello se abordaron los siguientes objetivos concretos:

1. Desarrollar mutantes de GAP con baja afinidad por el Ca^{2+}, por mutagénesis dirigida, para lo cual es necesario diseñar y desarrollar un sistema de síntesis a escala reducida y un ensayo *in vitro* que permitiera un análisis rápido y cuantitativo de los mutantes. Una vez obtenido el mutante adecuado debe mejorarse en lo posible en cuanto a respuesta espectral, relación señal/ruido, etc. y determinar su rango dinámico, afinidad y posibles interferencias con otros ligandos.

2. Caracterización del nuevo sensor en sistemas celulares sencillos (líneas celulares) con puesta a punto de la expresión selectiva en RE y aparato de Golgi.

3. Generación de animales transgénicos para estudiar el nuevo sensor en sistemas más complejos y en condiciones más fisiológicas, centrándose ya en la sonda dirigida a RE. Se generarán ratones y moscas transgénicas en colaboración con grupos expertos en esta área y se caracterizará el patrón de expresión, el fenotipo, la fertilidad y la supervivencia de estos animales.

4. Realizar pruebas de concepto que demuestren la factibilidad del uso de nuestros nuevos sensores para monitorizar los niveles y los cambios de $[Ca^{2+}]_{ER}$ en modelos lo más fisiológicos posible. Para ello serán de gran ayuda los animales transgénicos generados y caracterizados (3), que serán utilizados como fuentes de células, tejidos u órganos para los experimentos. Se intentarán primero medidas *in vitro*, seguidas por situaciones cada vez más próximas a las fisiológicas, *ex vivo*, conservando la estructura original de tejidos y órganos, y culminando con la situación *in vivo*. Para esta última condición serán de gran utilidad las moscas transgénicas, mucho más accesibles para las medidas *in vivo.*

MATERIALES Y METODOS

Los métodos y medios no pueden separarse del objetivo final.

Emma Goldman

En esta Tesis se han utilizado algunas técnicas de biología molecular que no se han descrito en este memoria por tratarse de técnicas básicas y estándar: mini- y maxi-preparación de DNA plasmídico; transformación bacteriana mediante $CaCl_2$; electroforesis de DNA en gel de agarosa; manipulación enzimática del DNA con enzimas de restricción, ligasas, DNA polimerasas y fosfatasas; cuantificación del DNA por espectroscopía; reacción en cadena de la polimerasa (PCR); mutagénesis dirigida; diseño de oligonucleótidos de DNA; y secuenciación de DNA en los servicios del IBGM (Valladolid) y el Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (Madrid).

1. LISTA DE PLASMIDOS

En esta Tesis se han empleado los siguientes vectores de expresión del sensor GAP (**Tabla 5**):

Plásmido	Modelo en el que empleó	Expresión	Antibiótico
pET28a.GAP2	*E. coli*	Procariota	Kanamicina
pET28a.GAP3			
pET28a.GAP^{A206I}			
pET28a.GFPuv			
pcDNA3.IgGAPwt	Células HeLa	Eucariota	Ampicilina
pcDNA3.IgGAP^{D119A}			
pcDNA3.erGAP1			
pcDNA3.IgGAP2			
pcDNA3.erGAP2			
pcDNA3.erGAP2			
pcDNA3.erGAP3.5			
pcDNA3.erGAP3			
pHSV.tgoGAP3			
pCAG.erGAP2	*Mus musculus*		
pCAG.erGAP3			
pUASTattB.erGAP3	*D. melanogaster*		

Tabla 5. Lista de los plásmidos empleados en esta Tesis.

2. GENERACION DE MUTANTES DE GAP

Las mutaciones sobre el gen de la aequorina se realizaron a partir de GAP dirigido al RE mediante su fusión al gen de la cadena pesada de la Ig-γ-2b, en el plásmido de expresión eucariota pcDNA3. Para las mutaciones sobre

el aspartato 119 (D119A) se usó el plásmido pcDNA3.IgGAPwt, y para las mutaciones dobles se partió del plásmido que ya contenía la mutación la mutación D119A, el pcDNA3.IgGAP^{D119A}. El ensayo de mutagénesis dirigida se realizó con el kit QuickChange II XL (Agilent Technologies, #200522-5), utilizando los oligonucleótidos 1 al 22 de la **Tabla 6**. Una vez obtenidas las mutaciones en el plásmido eucariota, éste se digirió con XhoI, obteniéndose un fragmento que contenía parte de la GFPuv, el péptido enlazante y la aequorina. A continuación, cada fragmento se ligó con el plásmido procariota pET28a.GAPwt, previamente digerido también con XhoI. Esto se realizó mediante técnicas básicas de biología molecular. Una vez seleccionada la versión mutante óptima de GAP, denominada GAP2, éste se clonó en el vector de expresión eucariota pcDNA3, con el gen de GAP dirigida al RE mediante su fusión con el péptido señal de la calreticulina y la secuencia de retención KDEL, en los extremos N y C terminal, respectivamente (pcDNA3.erGAP2).

Los ensayos de mutagénesis en los que se introdujeron simultáneamente varias mutaciones en la GFPuv, se realizaron con el kit QuickChange Lightning Multi Site Directed Mutagenesis (Agilent Technologies, #210515-5) y los oligonucleótidos 23 al 29 de la **Tabla 6**, sobre el plásmido pcDNA3.erGAP2.

3. INDUCCION Y EXTRACCION PROTEICA

Cada mutante de GAP se clonó en el plásmido de expresión bacteriana pET28a y se transformó en la cepa de *E. coli* BL21. Las bacterias se incubaron en minicultivos de 3 ml de medio Luria-Broth (LB) con kanamicina a 40 µg/ml durante 12 horas a 37°C, en agitación a 250 rpm. Al día siguiente los cultivos se diluyeron 50 veces en el mismo medio. Para pequeña escala, el volumen final fue de 12.5 ml, y para gran escala, de 200 ml de LB. A continuación los cultivos se incubaron otras 2 horas aproximadamente, hasta que la OD_{600} alcanzó valores de entre 0.6 y 1. La proteína se indujo añadiendo 0.5 mM de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) e incubando durante 6 horas, a 25°C y 250 rpm.

Nº	Mutación	Secuencia
1	D24H	GTTCAATTTCCTTCATGTCAACCACAATGG
2	D24N	GTTCAATTTCCTTAATGTCAACCACAATGG
3	D24V	GTTCAATTTCCTTGTTGTCAACCACAATGG
4	D25P	AATTTCCTTGATCCCAACCACAATGG
5	N28Q	TGTCAACCACCAAGGAAAAATCTC
6	N28V	TGTCAACCACGTCGGAAAAATCTC
7	E35Q	GGAAAAATCTCTCTTGACCAGATGGTCTACAAGGCATC
8	Y38S	ACGAGATGGTCTCCAAGGCATCTG
9	D117N	GTTTGACATCGTTAACAAAGCCCAAAATGG
10	D117V	GCTTTGTTTGACATCGTTGTCAAAGCCCAAAATGGAGC
11	D119K	ATCGTTGACAAAAAGCAAAATGGAGC
12	D119I	ATCGTTGACAAAATTCAAAATGGAGC
13	N121L	TGACAAAGCCCAACTTGGAGCTATTACAC
14	E128K	ATTACACTGGATAAATGGAAAGCATAC
15	E128R	ATTACACTGGATAGATGGAAAGCATAC
16	D153L	GAAACATTCAGAGTGTGCCTTATTGATGAAAGTGGACAACTCG
17	D155K	TTCAGAGTGTGCGATATTAAAGAAAGTGGACAACTCG
18	E156N	TGCGATATTGATAATAGTGGACAACTC
19	E156P	TGCGATATTGATCCAAGTGGACAACTC
20	S157Q	ATATTGATGAACAAGGACAACTCGATG
21	D161K	AGTGGACAACTCAAAGTTGATGAGATG
22	E164K	CTCGATGTTGATAAGATGACAAGAC
23	D175G	CAACATAGAAGACGGCGGCGTACAGCTGGC
24	D180Y	AGAAGACGGCGGCGTACAGCTGGCTTACCACTATCAGC
25	I167V	AAAGCTAATTTCAAGGTGAGGCACAACATAGAAG
26	T153K	ATAATGTGTACATAAAGGCCGACAAACAGAAGAACG
27	L15Q	GTGGTCCCTATCCAGGTGGAACTCGATGG
28	A206I	TCTGTCCACACAATCAATCCTGAGCAAGGACCC
29	A206K	TCTGTCCACACAATCAAAGCTGAGCAAGGACCC

Tabla 6. Lista de oligonucleótidos empleados en los ensayos de mutagénesis.

El cultivo bacteriano se centrifugó durante 10 minutos a 6000g y 4°C, se desechó el sobrenadante, y el precipitado se resuspendió en 1.25 ml o 20 ml (para pequeña o gran escala, respectivamente) de tampón de sonicación, compuesto de NaCl 250 mM, EDTA 50 mM, DTT 2 mM, PMSF

0.5 mM, DNAsa 20 μg/ml, Tris-HCl 50 mM a pH 8.8. Las células se lisaron mediante sonicación (sonicador Vibra cell 75115, Biolock Scientific), con cinco ciclos de 20 segundos separados 1 minuto entre ellos a una potencia del 30%. A continuación, el extracto bacteriano se centrifugó a 30000g y 4°C durante 10 minutos. La fracción soluble contenía una porción minoritaria de la proteína inducida, y además su fluorescencia era insensible a Ca^{2+}, así que se descartó. La fracción insoluble estaba formada por los cuerpos de inclusión bacterianos y contenía la mayoría de la proteína GAP. Se resuspendió en 0.5 ml o 8 ml (para pequeña y gran escala, respectivamente) de una solución de desnaturalización, compuesta de urea 8 M, DTT 5 mM y Tris-HCl 50 mM a pH 8.8, y durante 12 horas en agitación suave a 4°C.

La producción de las distintas mutantes de GAP se hizo a pequeña escala. En este caso, la renaturalización proteica se llevó a cabo por eliminación de la urea mediante dilución por lavados sucesivos con filtros 10K (Amicon, UFC501024 24Pk). De este modo, los extractos se concentraron y diluyeron tres veces en el medio de renaturalización, que contenía $CaCl_2$ 1 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8.8.

Para la producción a gran escala, la proteína se renaturalizó mediante diálisis usando una membrana de diálisis (SnakeSkin Pleaterd Dialysis Tubing 3500 MWCO Thermo Scientific, #68035) para eliminar la urea, contra una solución de renaturalización (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8.8) durante 24 horas. Al día siguiente la fracción dializada se centrifugó a 30000g durante 10 minutos a 4°C, para eliminar los restos insolubles, y al sobrenadante se le añadió DTT 5 mM para su conservación a 4°C.

La proteína extraída se cuantificó mediante el método de Bradford (reactivo de BioRad, 500-0006). La curva de calibración se realizó con un estándar de albúmina bovina (Thermo Scientific, #23209) disuelto en Tris-HCl 50 mM a pH 8.8, cuyo rango de concentración proteica va desde 0 a 2 mg/ml. La absorbancia se registró a 595 nm en el lector de placas VERSAmax Tuneable Microplate Reader (Molecular Devices). El rendimiento de la producción proteica en bacterias era de entre 0.08 y 0.48 mg de proteína por cada ml de cultivo bacteriano.

4. PURIFICACION PROTEICA

Con el fin de facilitar la purificación de la proteína GAP, se utilizó el plásmido pET28a, que fusiona la secuencia codificante para el hexapéptido de histidinas en fase con el extremo 5' del gen de GAP. La proteína extraída se purificó con las bolas de Ni^{2+} Sepharose High Performance (GE Healthcare, 17-5268-01). Antes del proceso de purificación, se lavaron 0.2 ml de bolas tres veces con agua para eliminar el etanol al 20% (v/v) en el que se conservan, y tres veces con tampón de unión (NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8.8). Se añadió 0.2 ml del extracto proteico de GAP2 y 0.5 ml de tampón de unión en exceso. Tras una incubación de una hora a 4°C en agitación, se lavaron las bolas dos veces con el tampón de unión y dos veces con el tampón de lavado (NaCl 300 mM, imidazol 40 mM, Tris-HCl 50 mM a pH 8.8), que eluye las proteínas unidas al Ni^{2+} de forma inespecífica. La proteína GAP2 se eluyó con el tampón de elución (NaCl 300 mM, imidazol 500 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8.8). La concentración proteica se midió mediante el método de Bradford.

5. TINCION COOMASSIE

En cada carril de un minigel de poliacrilamida al 12% v/v (BioRad, #161-0158) se cargó 2-10 μg del extracto proteico o de proteína purificada, junto con el marcador de peso molecular (BioRads, #161-0373). La electroforesis se realizó a 180 V y 50 mA, hasta que el frente llegó al final del gel (1.5 horas aproximadamente). El gel se tiñó durante 15 minutos con azul brillante de Coomassie (Coomassie Blue R-250 0.5 g, BioRad, #161-0400) disuelto en metanol al 50% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v). A continuación se lavó tres veces con una solución de metanol al 25% (v/v) y acetona al 10% (v/v) durante 15 minutos cada lavado. Las imágenes del gel se tomaron con el densitómetro GS-800 (BioRad).

6. ESPECTROS DE FLUORESCENCIA

Los espectros de fluorescencia de excitación y emisión de GAP se realizaron en un fluorímetro HITACHI 650-105, equipado con una lámpara de xenon. En una cubeta se añadió 1 ml de medio PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 10 mM y KH_2PO_4 2 mM a pH 7.4) o de un medio compuesto de KCl 150 mM, $MgCl_2$ 1 mM y MOPS 20 mM a pH 7.2 junto a 8.5 μg del extracto proteico no purificado que contenía GAP. Los espectros

de excitación se realizaron entre 380 m y 500 nm, con la emisión fijada a 520 nm, y los espectros de emisión se realizaron entre 480 y 600 nm, fijando la excitación en primer lugar a 405 nm, y en segundo lugar a 470 nm.

7. MEDICION DE FLUORESCENCIA EN EL LECTOR DE PLACAS

La caracterización de las mutantes de GAP se realizó en placas de 96 pocillos (Nunclon Surface, 167008) en diversas condiciones que se explican en los siguientes subapartados. La fluorescencia se registró en el lector de placas TECAN Genios Pro WO FP, fijando las longitudes de onda de excitación a 390 y 485 nm, y la de emisión a 535 nm. Aunque los filtros disponibles no coincidían exactamente con los máximos de los espectros de GAP, se eligieron por ser los filtros existentes en este equipo más cercanos a las longitudes de onda deseadas.

7.1. ANALISIS Y CARACTERIZACION DE LOS MUTANTES DE GAP

En una placa de 96 pocillos se añadió 200 µl de PBS junto a 1 µl del extracto proteico no purificado (3.5 µg aproximadamente) a tres concentraciones de $CaCl_2$: 0 (con EGTA 0.1 mM), 0.1 mM ó 1 mM. Esto se realizó por triplicado para cada uno de los mutantes de GAP, y se midió la fluorescencia en el lector de placas. Seguidamente, se calculó el cociente F_{485}/F_{390} (R) para cada concentración de calcio (0, 0.1 y 1 mM) y después, cada una de los R de $CaCl_2$ (R_{Ca}) se dividió entre la R_{EGTA}. Finalmente, el cociente obtenido para $CaCl_2$ 1 mM se dividió entre el de $CaCl_2$ 0.1 mM.

7.2. CALIBRACION DE GAP *IN VITRO*

Con la calibración *in vitro* se calculó la K_d. La K_d es la constante de disociación aparente, que indica la $[Ca^{2+}]$ en la que la mitad de las moléculas del sensor están unidas a Ca^{2+}. Para ello, en una placa de 96 pocillos se añadieron 200 µl del tampón compuesto por KCl 140 mM, $MgCl_2$ 1 mM, MOPS 20 mM a pH 7.2 junto con 3.5 µg de GAP no purificado (volumen aproximado de 1 µl de cada extracto). Se añadieron las distintas soluciones de calcio por triplicado: Ca^{2+} 0 (EGTA 0.1 mM), no adiciones (Ca^{2+} nominal, 0.02 mM aproximadamente), 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 y 50 mM. La fluorescencia se midió en el lector de placas. La señal de fondo se midió con el mismo medio en ausencia de proteína, y el valor resultante

se restó a cada medida. Se calculó el cociente R y se obtuvieron sus valores normalizados (Y) entre 0 y 1 mediante la siguiente fórmula:

$$Y = \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R_{min}} \quad \textbf{(1)}$$

Donde R es el cociente F_{485}/F_{395} a una determinada $[Ca^{2+}]$, R_{min} es dicho cociente cuando el sensor está en ausencia de Ca^{2+}, y R_{max} es el mismo cociente en $[Ca^{2+}]$ saturante. Se calcularon las medias y desviaciones estándar de los triplicados de las medidas de fluorescencia. Cada valor final se representó en una gráfica frente a la $[Ca^{2+}]$ correspondiente, y esta se ajustó a la ecuación de Hill usando el programa Origin:

$$Y = \frac{V_{max} \cdot [Ca^{2+}]^n}{K_d^n + [Ca^{2+}]^n} \quad \textbf{(2)}$$

Donde la V_{max} se ajustaba a 1, ya que era el valor normalizado de la R_{max}, y de la cual se obtuvo el valor de la K_d y el número de Hill (n).

7.3. EFECTO DEL pH

La sensibilidad de la proteína GAP al pH se analizó mediante un ensayo de fluorescencia en placa de multipocillo. Se utilizaron distintos tampones para los diferentes pH: acetato para el pH de 5.5; histidina para el pH de 6; MOPS para los pHs de 6.5, 7 y 7.5; y Tris-HCl para el pH de 8.5. Cada tampón (20 mM) contenía KCl 140 mM y $MgCl_2$ 1 mM. A cada pocillo se añadió 1 µl de la proteína GAP (3.5 µg aproximadamente) y las mismas $[Ca^{2+}]$ que en el apartado anterior, todo ello en un volumen final de 200 µl. La lectura de la fluorescencia y el análisis de los datos se realizaron como en el apartado anterior.

7.4. EFECTO DE LOS METALES DIVALENTES

La sensibilidad de de la proteína GAP2 al Mg^{2+} se ensayó de forma similar a la descrita anteriormente. En cada pocillo de una placa de 96 se distribuyeron 200 µl del tampón KCl 140 mM, MOPS 20 mM a pH 7.2, junto a 1 µl (3.5 µg aproximadamente) de la proteína GAP2. Se añadieron idénticas $[Ca^{2+}]$ que en los apartados 7.2 y 7.3, cada una de ellas a tres

concentraciones de $MgCl_2$: 0.1, 1 y 5 mM. La lectura de la fluorescencia y el análisis se realizó como en los apartados anteriores.

También se analizó la sensibilidad de GAP2 a otros iones divalentes menos abundantes en las células como el níquel, el cobalto o el manganeso. Se emplearon las sales cloruro de cada catión ($NiCl_2$, $CoCl_2$ y $MnCl_2$) a 1 mM de concentración, individualmente o junto a $CaCl_2$ 1 mM.

8. EXPRESION EN CELULAS DE MAMIFERO

Las células HeLa (ATCC: CCL-2) y HEK293T (ATCC: CRL-1573) se mantuvieron en el medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Lonza. Biowhitaker. BE 12-604F) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Hyclone, Thermo Scientific. SV 30160.03), estreptomicina 100 µg/ml, penicilina 100 U/ml (Lonza, DE17-602E) y L-glutamina 2 mM (Lonza, BE17-605E). Los experimentos preliminares de imagen de fluorescencia se realizaron en células HeLa o HEK transfectadas de forma transitoria con Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Gibco. 11668-019) según las especificaciones comerciales. Una vez comprobada la funcionalidad de la proteína GAP se generó un clon estable, con el que se hicieron los experimentos posteriores.

La direccionalidad al RE se realizó mediante la fusión del péptido señal de la calreticulina al extremo N-terminal de GAP2 o GAP3, y la secuencia de retención en el RE, el tetrapéptido KDEL, a su extremo C-terminal (Kendall y cols., 1992a). Esta construcción se llamó erGAP. La direccionalidad al aparato de Golgi se obtuvo mediante la fusión del péptido señal de la proteína galactosiltransferasa humana II (Llopis y cols., 1998) en el extremo N-terminal de GAP3. La construcción fue llamada tgoGAP3.

Las líneas estables de HeLa que expresaban erGAP2 o erGAP3 (una variante de erGAP2 con mutaciones para aumentar el brillo) se generaron por transfección con el plásmido pcDNA3.erGAP2 o con el pcDNA3.erGAP3, respectivamente. Las células que integraron el plásmido en su genoma se seleccionaron con 0.8 mg/ml de G-418 (Gibco, 11811-023). Tras 2 ó 3 días de selección, las células resistentes se tripsinizaron y se pasaron por el separador celular FACSAria (BD Biosciences). Las células fluorescentes verdes se seleccionaron a 403 nm de excitación y a 520 nm de emisión. Posteriormente, las células positivas se amplificaron y se

seleccionaron clones estables procedentes de célula única por dilución limitada, que se mantuvieron en cultivo con 0.1 mg/ml de G-418.

Los extractos de celulares de los clones estables de HeLa se realizaron a partir de una placa de 10 cm, recogiéndolas con una espátula, en PBS frío. A continuación, se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 rpm a 4°C, y se resuspendieron en NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8.8. Las células se lisaron sometiéndolas a tres ciclos de congelación/descongelación, sumergiéndolas en un baño de hielo seco con etanol durante 10 minutos, e inmediatamente en un baño a 37°C hasta que se descongelaron. Se centrifugaron a velocidad máxima durante 5 minutos a 4°C, y se cuantificó la concentración proteica del sobrenadante mediante el método de Bradford. El extracto se almacenó a -20°C.

9. WESTERN BLOT

Los extractos totales se diluyeron con tampón Laemli 5X, compuesto de glicerol 50% (v/v), SDS 10 mM, azul de bromofenol, DTT 100 mM y Tris-HCl 0.3 M a pH 6.8. Se cargaron entre 10 y 50 μg de proteína en un minigel de poliacrilamida al 12% (v/v) junto con el marcador de peso molecular (BioRads, #161-0373), y se realizó una electroforesis a 180 V y 50 mA hasta que el frente llegó al final del gel (1.5 horas aproximadamente). Posteriormente se realizó la transferencia húmeda a una membrana de nitrocelulosa durante una hora a 100 V y 400 mA, que se bloqueó con leche al 4% (p/v) en tampón TTBS, compuesto de NaCl 100 mM, Tween 0.05% (v/v) y Tris-HCl 20 mM a pH 7.6, y se incubó toda la noche a 4°C con el anticuerpo de ratón primario anti-GFP (Millipore, MAB3538) diluido al 1:1000 en leche al 4% (p/v) en tampón TTBS. Al día siguiente, la membrana se lavó tres veces durante 5 minutos cada lavado con TTBS, y se incubó durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario de cabra anti-ratón IgG (H+L) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP), (BioRad, #170-6516) diluido al 1:1000 en leche al 4% en tampón TTBS. Se repitieron los lavados y se reveló incubándola durante 1 minuto en 5 ml del medio ECL (luminol 1.25 mM (Sigma, A-8511), ácido p-cumárico 2.9 mM (Sigma, C-90008), H_2O_2 0.1%, Tris-HCl 100 mM, pH 8.5), en oscuridad a temperatura ambiente. Se reveló en una película (GE Healthcare, 28906837) y la digitalización se realizó en un densitómetro GS-800 (BioRad) con el programa Quantity One 4.5.2.

10. GENERACION DE RATONES TRANSGENICOS

El gen de erGAP2 se clonó en el plásmido de expresión pCAG (Tian y cols., 2009), generando el plásmido pCAG.erGAP2. Este se envió a la compañía ATG:biosynthetics GmbH (Alemania), para optimizar el uso de los codones del gen, y así mejorar su expresión en mamíferos.

El vector de expresión, de 5 kb, contiene todos los elementos necesarios para la óptima expresión del transgén (**Figura 15**) y se digirió con SspI/BsaBI para eliminar todos los elementos procariotas y se purificó en un gel de agarosa a una concentración del 0.7% (p/v) disuelto en TAE. El DNA de erGAP2 se microinyectó en oocitos de la cepa de ratón C57BL/6JCrl, y el de erGAP3 en oocitos de la cepa B6CBAF2/OlaHsd en la Unidad de Trangénesis del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (Madrid).

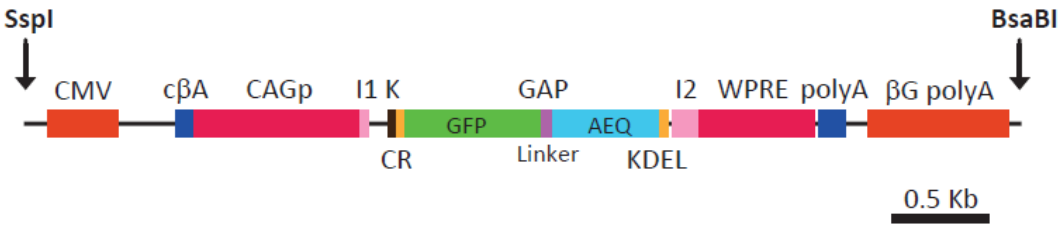

Figura 15. Casete de expresión de erGAPs empleado para la creación de ratones transgénicos. Este transgén contiene, en este orden: el potenciador de expresión de citomegalovirus (CMV); el 5'-UTR de la β-actina de pollo (cβA); el promotor CAG (CAGp); el intrón de la β-actina de pollo (I); la secuencia Kozak (K); el gen de erGAP2 o erGAP3, formado por la secuencia de direccionalidad de la calreticulina (CR), la GFP, el péptido enlazante o linker, la aequorina y la secuencia de retención KDEL; el intrón de la β-actina de pollo (I); el elemento de regulación post-transcripcional del virus de marmota (WPRE); la secuencia poliA de la hormona de crecimiento bovina (polyA); la secuencia poliA de β-globina(bG polyA).

El genotipaje de los ratones transgénicos se realizó a partir del DNA genómico procedente de la biopsia de la cola. Se partió de unos 3 mm de cola de ratón (de más de 3 semanas) disuelto en 750 µl de un tampón compuesto de NaCl 100 mM, EDTA 100 mM, SDS 1%, proteinasa K a 0.6 µg/ml y Tris-HCl 50 mM a pH 8. Las muestras se incubaron durante toda la noche en agitación a 55°C para degradar el tejido. El DNA se precipitó en NaCl 5 M e isopropanol, y se resuspendió en buffer TE.

El genotipaje de los ratones se realizó mediante una PCR a partir del DNA genómico extraído, optimizada previamente para detectar la presencia del transgén. Cada muestra de DNA se sometió a una reacción doble con dos parejas de oligonucleótidos (**Tabla 7**): #30 y #31, que amplifican un fragmento de GAP de 234 pb (correspondientes a los nucleótidos 454 al 687 del gen erGAP), y #32 y #33, que amplifican un fragmento de 350 pb del gen constitutivo gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH), como control interno positivo de la PCR.

Nº	Gen	Secuencia
30	mGFPuv	GATGGCAACATCCTCGGACA
31	mGFPuv	GTCCTTGCTCAGGGCTGATT
32	GADPH	GTCTTCTGGGTGGCAGTGATGG
33	GADPH	CATCACCATCTTCCAGGAGCGA

Tabla 7. Lista de oligonucleótidos empleados en los ensayos de genotipaje de los ratones transgénicos.

Los productos de la reacción de PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2%. En la **Figura 16** se muestra un resultado representativo donde se analizaron 9 ratones. La banda de GADPH aparece en todas las muestras, mientras que la banda específica de GAP aparece solo en las muestras positivas, que han sido todas excepto la número 7.

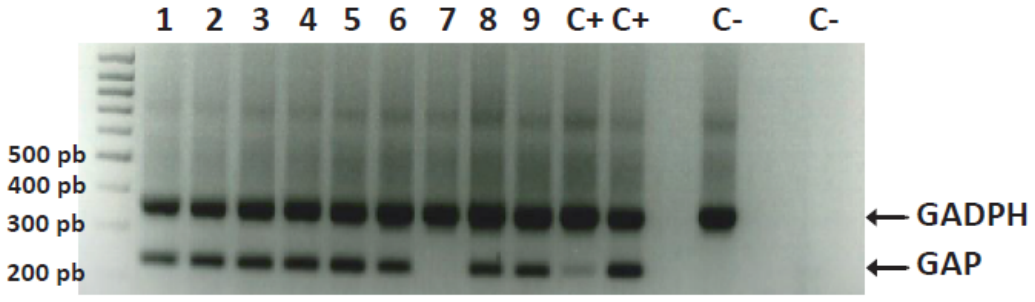

Figura 16. Resultado tipo de un genotipaje. De los carriles 1 al 9 están las PCR para nueve ratones, de los cuales todos son transgénicos, excepto el número 7 (al que le falta la banda a 234 pb). Los dos carriles C+ son controles positivos, y los carriles C- los controles negativos: el de la izquierda de un ratón no transgénico, y el de la derecha de una PCR sin ADN.

En el caso de erGAP2, se obtuvieron 3 ratones negativos y 2 ratones positivos en cuatro sesiones de microinyección por análisis de genotipaje. Sólo uno expresaba el sensor, dando lugar a la Línea 3. En el caso de erGAP3, se obtuvieron 6 fundadores en dos sesiones de microinyección analizados por genotipaje. Al cruzar estos ratones con otros ratones de tipo salvaje, se comprobó que uno de ellos no transmitía el transgén, dos no expresaban el sensor, y otro se descartó. Los dos fundadores restantes expresaban y transmitían el sensor, y dieron lugar a las Líneas 1 y 10.

11. HISTOLOGIA

La expresión de los sensores erGAP en los ratones transgénicos se analizó en secciones histológicas. Los ratones se anestesiaron mediante una inyección intraperitoneal con ketamina y xilacina (10 y 100 mg/kg, respectivamente) y los tejidos se fijaron por perfusión intracardiaca con paraformaldehido (PFA) al 4% (v/v), y se extrajeron y post-fijaron en PFA al 4% durante toda la noche. Posteriormente, los órganos se sumergieron en una solución de PBS:sacarosa al 30%, y a continuación se transfirieron a un medio de sacarosa al 30%:Tissue-Tek (1:1) (Sakura Finetek USA), manteniéndolos siempre a 4°C. Finalmente, las muestras se colocaron en un molde, se embebieron en Tissue-Tek y se guardaron a -80°C. Las secciones se realizaron con un microtomo Microm HM 550 (Thermo Scientific), con un grosor de 30 μm, y se montaron en portaobjetos.

En general, para la caracterización de los ratones transgénicos, las secciones se protegieron con un cubreobjetos y se analizaron mediante microscopía de fluorescencia. Las imágenes se tomaron con un microscopio Nikon Eclipse 80i equipado con los objetivos Nikon PlanApo 4X/0.2 y 20X/0.75. La fluorescencia verde se recogió usando el filtro de excitación de 450–490. Algunas secciones de tejidos concretos como el páncreas se procesaron para hacer inmunofluorescencia.

12. INMUNOFLUORESCENCIA

Los experimentos de colocalización en el RE se llevaron a cabo por inmunofluorescencia. Los clones estables de HeLa que expresan las proteínas erGAP2 o erGAP3 se sembraron el día anterior al 70-80% de confluencia en cubreobjetos de 12 mm de diámetro tratados con poli-L-lisina 0.1 mg/ml (Sigma, P1274). Tras lavar 3 veces con PBS, se fijaron con

PFA al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente, seguido de 3 lavados con PBS para eliminar los restos de PFA. La permeabilización y el bloqueo se hicieron en PBS con Tritón-X-100 al 0.2% (v/v) y suero de cabra al 10% (v/v) (PBS-TS), seguidos de 3 lavados de 5 minutos con PBS con suero de cabra al 10% (v/v) (PBS-S), y se incubaron toda la noche a 4°C en oscuridad y con agitación con PBS-S y el anticuerpo primario (**Tabla 8**) diluido 1:200. Al día siguiente se lavaron con PBS-S 3 veces durante 5 minutos y se incubaron con PBS-S y el anticuerpo secundario (**Tabla 9**) diluido 1:200 durante 1 hora a temperatura ambiente, con agitación y en oscuridad. Se lavaron tres veces 5 minutos con PBS, se incubaron 5-10 minutos con DAPI diluido a 100 ng/ml en PBS, se lavaron con PBS, y por último con agua destilada para lavar las sales. Los cubreobjetos se montaron en líquido de montaje Vectashield (H-1000), y se sellaron con laca de uñas transparente.

Las secciones histológicas de los ratones transgénicos preparadas como se ha descrito en el apartado anterior se procesaron de forma similar, con la salvedad de que el Tritón-X-100 estaba al 0.1%, y las diluciones de los anticuerpos primarios y secundarios fueron de 1:1000 y 1:500 respectivamente.

Anticuerpo primario	**Marcaje**	**Especie**	**Casa comercial**
SERCA2 (IID8)	RE	Ratón	Santa Cruz Biotechnology, sc-53010
TGN46	Trans Golgi	Oveja	abD Serotec, AHP500G
Insulina	Células β de los islotes de Langerhans	Ratón	Sigma Aldrich, I2018
Glucagón	Células α de los islotes de Langerhans	Conejo	Monosan, PS087
Somatostatina	Células δ de los islotes de Langerhans	Ratón	Gen tex, SOM-018

Tabla 8. Tabla de anticuerpos primarios empleados en inmunofluorescencia.

Anticuerpo secundario	Especie	Casa comercial
Alexa Fluor 568, IgG (H + L)	Cabra-anti-ratón	Molecular Probes, A-11031
Alexa Fluor 568, IgG (H + L)	Burro-anti-oveja	Molecular Probes, A-21099
Alexa Fluor 568, IgG (H + L)	Cabra-anti-conejo	Molecular Probes, A-11011

Tabla 9. Tabla de anticuerpos secundarios empleados en inmunofluorescencia.

Las imágenes de fluorescencia en células en monocapa se tomaron en un microscopio confocal SP5 Leica con un objetivo de inmersión en aceite 63×Plan-Apochromat (1.4 de NA) equipado con un láser blanco, y se analizaron con el programa ImageJ.

Las imágenes de las secciones de los ratones transgénicos se tomaron en el microscopio de Fluorescencia NIKON Eclipse 90i, con cámara CCD (NIKON, modelo DS-Ri1), objetivo 40x/0.75, con los filtros B-2A (Ex. 450-490) y G-2A (Ex. 510-560).

13. EXTRACCION DE LAS CELULAS INMUNITARIAS DE BAZO DE RATON

Las células inmunitarias se obtuvieron del bazo de ratones de tres meses de edad, de tipo C57BL6 salvaje y de las líneas transgénicas de erGAP3 (Líneas 1 y 10), siguiendo el protocolo de (Martin y cols., 2014). Se sacrificaron mediante por dislocación cervical, y se extrajeron los bazos, que se disgregaron presionándolos suavemente con el émbolo de una jeringa de 5 ml, colocado sobre un filtro de 40 μm en PBS con suero fetal bovino (FBS) al 2% (v/v). Posteriormente las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 300g y 4°C y el precipitado se resuspendió en tampón de lisis de eritrocitos (NH_4Cl 150 mM, $KHCO_3$ 10 mM, Na_2EDTA 0.1 mM, pH 7.3). Se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos, y se detuvo el proceso de lisis celular con 20 ml de PBS. Las muestras se lavaron durante 8 minutos a 300g y 4°C, el sedimento se resuspendió en PBS. Esto se repitió dos veces y el precipitado final se resuspendió en 5 ml de PBS para la citometría de flujo, o en medio DMEM sin rojo fenol, con FBS al 10% (v/v) y glutamax al 1% (v/v), estreptomicina y penicilina al 1% (v/v) para mantenerlas en cultivo, a una densidad de 10^6 células/ml. Se sembraron 10^5 células por pocillo en cubreobjetos de 12 mm de diámetro

tratados con poli-L-lisina 0.1 mg/ml. Los experimentos de imagen se realizaron a los 2-3 días.

14. CITOMETRIA DE FLUJO

Las células de bazo se resuspendieron en 10 ml de PBS, se contaron con una cámara de Neubauer, y se partió de $5 \cdot 10^5$ células, que se incubaron con anticuerpos primarios conjugados frente a marcadores de superficie, diluidos 1:1000 (**Tabla 10**). La incubación se realizó durante al menos 20 minutos en hielo y en oscuridad. Se centrifugaron las células a 300g y 4°C durante 10 minutos, y se resuspendieron en 500 μl de PBS que contenía FBS al 2% (v/v). Las células se analizaron en el citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter), y se detectaron las células marcadas con el detector FL1 (525/40 nm, para el verde de la GFPuv), FL2 (575/30 nm, para el amarillo de la ficoeritrina o PE) y FL6 (660/20 nm, para el rojo de la aloficocianina o APC).

Antígeno (tipo celular)	Fluoróforo	Casa comercial
CD11b (monocitos y macrófagos)	APC	eBioscience, clon M1/70, #17-0112-81
CD11c (células dendríticas)	PE	IntegrIn p150/op, clon N418, #12-0114-81
CD3 (linfocitos T)	APC	BD Bioscience, BD Pharmingen, clon 145-2C11, 553066
CD4 (linfocitos T helper)	APC	InmunoStep, clon HP2/6, 4PE-100T
CD19 (linfocitos B)	PE	Biolegend, 6D5 115508, lot B153661
F4:80 (monocitos)	APC	EBioscience, clon BM8, 17-4801-80
F4:80 (control APC)	APC	EBioscience, Rat IgG2a Kiso, clon eBR2a

Tabla 10. Anticuerpos empleados en la citometría de flujo.

15. CULTIVOS MIXTOS DE HIPOCAMPO

En primer lugar, se prepararon los diferentes medios de cultivo: neurobasal (ThermoFisher, Z1103049), B27 al 2% (v/v), penicilina y

estreptomicina al 1% (v/v), glutamina dipéptido 2 mM y FBS al 2.5% (v/v). Para la disección se emplea medio HBSS (*Hank´s balanced salt solution*, sin rojo fenol, Ca^{2+} o Mg^{2+}, Gibco, 14175-053), glucosa 10 mM y BSA al 0.05% (p/v). Ambos medios debían estar estériles y filtrados. Para la digestión del tejido se utilizó este último medio suplementado con papaína 0.42 mg/ml (Worthington Biochemical Corporation, LS003119) y DNAsa 0.06 mg/ml (Roche, 10104159001).

Los ratones neonatos (P0-P2) se decapitaron con tijeras y las cabezas se colocaron en medio Hank's completo (con glucosa y BSA) frío. Los dos hemisferios del cerebro se diseccionaron bajo la lupa (Zeiss, Stemi DV4), retirando cuidadosamente las meninges, y se separaron los hipocampos del resto del hemisferio, colocándolos en una placa de Petri con medio Hank´s completo. A continuación, con ayuda de una pipeta Pasteur, se transfirieron a un tubo para su digestión enzimática y se incubaron a 37°C durante 20 minutos. Seguidamente, se lavaron 3 veces con medio Hank´s y se añadió medio neurobasal suplementado con DNAsa 0.06 mg/ml y FBS al 10% (v/v) para inactivar la papaína, y se disgregaron mecánicamente, mediante resuspensión suave con pipeta. Las células se contaron en una cámara Neubauer. Se sembraron a una densidad de 10^5 células/pocillo sobre un portaobjetos de 12 mm de diámetro tratado previamente con poli-L-lisina (40 μg/ml). Los cultivos se mantuvieron en el incubador a 37°C y 5% CO_2, durante 2 horas para permitir la adhesión de las células. Finalmente se lavaron 2 veces con medio Hank's completo para retirar los restos celulares y de tejido, y se añadieron 400 μl de medio neurobasal completo. Las células se mantuvieron en cultivo una semana antes de realizar los experimentos de medidas de $[Ca^{2+}]$.

16. AISLAMIENTO DE LOS ISLOTES DE LANGERHANS

Los ratones transgénicos de erGAP3 (Líneas 1 y 10), de tres meses de edad, se sacrificaron mediante dislocación cervical. Tras una incisión abdominal, se bloqueó la unión del conducto biliar con el intestino delgado mediante unas pinzas de clampaje, y se inyectó a través de dicho conducto, hasta que el páncreas se hinchó, una solución con colagenasa tipo V (Sigma) preparada en el siguiente medio: NaCl 115 mM, KCl 5 mM, $NaHCO_3$ 10 mM, $MgCl_2$ 1.1 mM, NaH_2CO_4 1.2 mM, $CaCl_2$ 2.5 mM, BSA 1%, Glucosa 5 mM, HEPES 25 mM, pH 7.4. Después, se transfirió el órgano a un tubo y se incubó durante 10 minutos a 37°C para digerir el tejido exocrino.

Posteriormente, el tubo se colocó en hielo durante 10 minutos, el tiempo suficiente para que precipitaran los fragmentos no digeridos, mientras que los islotes aislados permanecían en el sobrenadante. El sobrenadante se transfirió a una placa Petri, de donde se recogieron los islotes individuales con una pipeta bajo una lupa (Stemi DV4, Zeiss). Los islotes se mantuvieron durante 2-3 horas en un incubador a 37°C y atmósfera húmeda, antes de ser utilizados en los experimentos.

17. EXTRACCION DE HIPOFISIS

Los ratones transgénicos erGAP3 de las Líneas 1 y 10 de entre 7 días y 2.5 meses se sacrificaron mediante inhalación de CO_2, seguido de decapitación. Se les retiró la piel de la cabeza, se les cortó el cráneo con tijeras, y con la parte posterior de unas pinzas se les retiró el cerebro y el cerebelo, dejando visibles los huesos de la base del cráneo. La glándula hipofisaria de ratón está formada por la adenohipófisis, que tiene forma rectangular de 1 x 2 mm aproximadamente, y la neurohipófisis, de forma circular y que se sitúa sobre la adenohipófisis. La hipófisis se extrajo del hueco conocido como “silla turca”, y se colocó en una gota de medio extracelular (MEC), compuesto de NaCl 145 mM, KCl 5 mM, glucosa 10 mM, $MgCl_2$ 1 mM y HEPES 10 mM a pH 7.6, sobre el tapón de un tubo eppendorf oscuro, con la neurohipófisis hacia arriba para prepararla para las medidas de imagen.

18. RODAJAS DE HIPOCAMPO

Las rodajas de hipocampo se realizaron con un protocolo basado en el de (Liao y Lien, 2009). Los ratones transgénicos para erGAP2 en estadío P4-P9 se sacrificaron mediante decapitación. Los cerebros se extrajeron rápidamente y se colocaron en una placa de Petri con fluido cerebroespinal artificial I (ACSF I), compuesto de: KCl 4 mM, glucosa 10 mM, sacarosa 248 mM, $CaCl_2$ 1 mM, $MgCl_2$ 5 mM, $NaHCO_3$ 26 mM, gaseado con carbógeno (mezcla de 95% de O_2 + 5% de CO_2) resultando en un pH de 7.4. Bajo la lupa se separó el hipocampo, y se cortó en rodajas de 350 μm de grosor con un cortador McIlwain Tissue Chopper (Ted Pella, INC.). Las rodajas se mantuvieron durante un periodo mínimo de una hora a temperatura ambiente en el medio ACSF II, compuesto de: NaCl 125 mM, KCl 2.5 mM, $NaHCO_3$ 26 mM, NaH_2PO_4 1.25 mM, glucosa 10 mM, $CaCl_2$ 1 mM y $MgCl_2$ 1 mM, gaseado con carbógeno al 5% (pH 7.4).

19. MEDIDAS DE Ca^{2+} MEDIANTE IMAGEN DE CELULA UNICA

Los experimentos de imagen se realizaron en dos equipos diferentes. El primero es un microscopio invertido Nikon Diaphot equipado con un objetivo 20X PlanApoUV (Olympus, 0.7 de apertura numérica, NA), y una lámpara de xenon de 75 W. La fluorescencia de GAP se monitorizó a dos longitudes de onda, usando los filtros 403/12DF y 470/25DF controlados por una rueda de filtros, y un espejo dicroico DM500 con un filtro LP520. La fluorescencia emitida se registró usando una cámara C4742-98 (Hamamatsu). En los experimentos en los que se combinó la medida de fluorescencia de GAP con la del Fura-2, los filtros utilizados fueron 340/10 y 380/10 para el Fura-2 y 470/25DF para GAP. La captura de imágenes se realizó con el software Simple PCI 6 (Hamamatsu).

El segundo equipo es un microscopio directo Zeiss Axioplan 2, equipado con un objetivo 20X Achroplan (Zeiss, 0.5 de NA) de inmersión en agua, un objetivo 5X Plan-Neofluor (Zeiss, 0.15 de NA), y una lámpara de xenon de 75 W. La fluorescencia de GAP se monitorizó a dos longitudes de onda de excitación usando los filtros 405/25DF y 470/35DF, controlados por una rueda de filtros, y un filtro de emisión 540/50 BP. El Rhod-3 se excitó a usando un filtro de 545/12 nm y la emisión se registró con un filtro LP590. La fluorescencia se recogió con una cámara AxioCam (Zeiss) y la captura de imágenes se realizó con el software AxioVision (Zeiss).

Las soluciones se aplicaron por un sistema de perfusión continua por gravedad, a 5-6 ml/min. Salvo que se indique lo contrario, los experimentos se realizaron a temperatura ambiente, y se utilizó la solución de perfusión MEC, con 1 mM de $CaCl_2$, o bien con 0.5 mM de EGTA, suplementado con los estímulos especificados en el apartado 23. Las calibraciones *in situ* de GAP2 y GAP3 se realizaron en células permeabilizadas. Primero, las células se trataron con tapsigargina 1 μM en medio MEC con EGTA 0.5 mM para vaciar el RE de Ca^{2+}. Posteriormente, durante el experimento de imagen, se perfundieron las células con un medio compuesto por KCl 140 mM, ATP 1 mM, succinato-Na 2 mM, piruvato-Na 1 mM, $MgCl_2$ 1 mM, EGTA 2 mM, digitonina 60 μM, HEPES 20 mM a pH 7.2 durante 1 minuto. Una vez permeabilizadas, se añadió a la cámara de perfusión el mismo medio sin digitonina, suplementado con los ionóforos nigericina 10 μM (un ionóforo de K^+ y H^+), gramicidina 1 μM (un ionóforo de cationes monovalentes), CCCP 1 μM (un ionóforo de H^+),

monensina 20 μM (un ionóforo de cationes monovalentes) y 4BrA23187 10 μM (un ionóforo de Ca^{2+}, Mg^{2+} y H^{+}), y con [Ca^{2+}] que varían entre 0 (obtenido con EGTA 2 mM) y 10 mM.

Las células HeLa y los monocitos se sembraron a una densidad de $5 \cdot 10^4$ células en cubreobjetos de 12 mm de diámetro, tratados con poli-L-lisina 0.1 mg/ml, y los cultivos mixtos se sembraron a 10^5 células en los mismos cubreobjetos tratados con poli-L-lisina 0.1 mg/ml.

La medida del calcio citosólico se realizó con los indicadores sintéticos Fura-2-AM o bien Rhod-3-AM. Las células se cargaron mediante su incubación en medio externo con el indicador, en tiempo de carga en torno a una hora, a temperatura ambiente, en oscuridad y en agitación. Los indicadores se diluyeron a 2 ó 4 μM para cargar las células sembradas, y a 16 μM para cargar las rodajas de hipocampo.

Los islotes de Langerhans se cargaron en suspensión con Fura-2-AM 2 μM durante una hora, y se situaron en cristales de 12 mm tratados con poli-L-lisina 0.1 mg/ml durante 10 minutos, o mediante un coágulo de fibrina y trombina, en el que se embeben parcialmente los islotes. Los experimentos se realizaron a 37°C con medio extracelular compuesto por NaCl 120 mM, KCl 5 mM, tampón de $NaHCO_3$ 25 mM, pH 7.2, $MgCl_2$ x H_2O 1.2 mM, $CaCl_2$ x H_2O 1.2 mM y glucosa, gaseados con carbógeno 95% O_2 y 5% CO_2. La concentración de la glucosa variaba a lo largo de los experimentos para estimular los islotes.

Las rodajas de hipocampo se montaron en la cámara de perfusión del equipo de imagen pegándolas mediante un coágulo hecho con fibrina y trombina, sobre un papel de celulosa. Se perfundieron a temperatura ambiente con el medio ACSF II, en el que se disolvieron los estímulos siguientes: ATP 0.1 mM, glutamato 20 μM, KCl 80 mM y cafeína 20 mM ó 50 mM.

Al igual que las rodajas, la hipófisis se montó en la cámara de perfusión mediante coágulo de trombina y fibrina formado en un papel de celulosa, con la neurohipófisis mirando hacia el papel. De esta forma, la adenohipófisis queda accesible a los medios con los que se realizaron los experimentos de imagen.

El tratamiento de las imágenes se realizó con el programa Image J, con el que se substrajo el fondo y se calculó el cociente entre las dos

fluorescencias píxel a píxel. Los registros se representan como R/R_0 (para los indicadores ratiométricos) o F/F_0 (para los indicadores intensiométricos), siendo R_0 el cociente de las longitudes de onda en estado basal (para GAP o Fura-2), y F_0 la intensidad de fluorescencia en estado basal (para Rhod-3).

La calibración de la señal fluorescente en $[Ca^{2+}]$ se basó en la normalización de la fluorescencia entre 0 y 1, y la ecuación de Hill. Para la normalización se usó la fórmula:

$$Y = \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R_{min}} \quad \textbf{(1)}$$

Donde "Y" es la señal fluorescente normalizada; R es el cociente F_{470}/F_{403} en un determinado momento del experimento; R_{min} es dicho cociente cuando el sensor está en ausencia de Ca^{2+}, lo cual se obtiene vaciando completamente el RE al perfundir las células con MEC con EGTA 0.5 mM, suplementado con TBH 10 μM, ATP 100 μM y/o histamina 100 μM; y R_{max} = rango dinámico · R_{min}. Una vez obtenido el valor "Y", se puede calcular la $[Ca^{2+}]$ con la fórmula de Hill:

$$Y = \frac{V_{max} \cdot [Ca^{2+}]^n}{K_d^n + [Ca^{2+}]^n} \quad \textbf{(2)}$$

Al normalizarse la señal fluorescente entre 0 y 1, se asume que $V_{max} = 1$. Igualando las fórmulas 1 y 2, sustituyendo V_{max} por 1 y despejando $[Ca^{2+}]$ se obtiene:

$$[Ca^{2+}] = \frac{K_d}{\left(\frac{R_{max} - R}{R - R_{min}}\right)^{1/n}} \quad \textbf{(3)}$$

Tanto en las calibraciones *in vitro* como *in situ* de GAP2 y GAP3, el valor de n es igual a 1, por lo que se sustituye este valor en la fórmula (ver en Resultados, en los apartados 2.3, 3.1 y 5.2), y quedaría la fórmula calculada previamente para el Fura (Grynkiewicz y cols., 1985):

$$[Ca^{2+}] = \frac{K_d \cdot (R - R_{min})}{R_{max} - R} \quad \textbf{(4)}$$

20. GENERACION DE MOSCAS TRANSGENICAS

El gen de erGAP3 se clonó en el vector pUASTattB (**Figura 17**). Este vector contiene los siguientes elementos génicos: el gen de selección white (que da color rojo a los ojos de las moscas); la secuencia de recombinación loxP; el promotor UAS, que es inducible y se controla por el factor de transcripción GAL4; un sitio de clonación múltiple donde se insertó el gen de erGAP3; la secuencia de poliadenilación del virus SV40; y, la secuencia de integración attB. Este plásmido fue enviado a Best Gene Inc., donde se microinyectó en embriones de una línea de *Drosophila* que contiene la secuencia attP en un locus específico de su genoma (**Figura 18**), y que no posee un gen funcional de coloración de los ojos. Este locus es el 86F, situado en el brazo largo del cromosoma 3, que se eligió por ser uno de los sitios con menor letalidad en homocigosis (ver página web de Best Gene Inc.). Dicho locus también contiene el promotor 3xP3, que controla la expresión del marcador dsRFP; todo esto está flanqueado por dos sitios LoxP, y por último está el sitio de integración attP. Todo este casete está flanqueado por repeticiones invertidas mariner (los triángulos blancos). El plásmido pUASattB.erGAP3 se microinyectó en embriones de *Drosophila* junto con el mRNA de la integrasa ΦC31, que permite la recombinación y la integración del casete de expresión en el genoma de la mosca. Una vez integrado, el casete del gen de la dsRFP y el gen white se eliminaron microinyectando el mRNA de la recombinasa Cre, que escindió todo el DNA contenido entre los dos sitios loxP más distantes (Bischof y cols., 2007). Mediante este procedimiento se obtuvieron 5 líneas de moscas transgénicas, de las cuales se conservaron dos que poseen el transgén erGAP3 bajo el control del promotor UAS y tienen los ojos blancos, debido a que el gen white se eliminó del genoma de la mosca.

La expresión de erGAP3 en un tejido específico se realizó mediante el sistema GAL4:UAS (Brand y Perrimon, 1993), que consiste en el cruce entre moscas transgénicas para erGAP3 con otras líneas de moscas transgénicas para GAL4 (el inductor del promotor UAS), cuya expresión está controlada por un promotor específico de tejido. De esta forma, la descendencia de estos cruces (la F1) expresa erGAP3 en un tejido concreto, gracias a que el promotor UAS es activado por GAL4, inducido a su vez por el promotor específico. Según esto, la expresión de erGAP3 en músculo estriado se realizó con moscas transgénicas portadoras del gen del inductor GAL4 bajo el control del promotor de la cadena pesada de la

miosina (Mhc) (Mitra y cols., 1996). De forma similar, se generaron otras dos líneas de moscas transgénicas específicas de músculo, una para GCaMP3 citosólico (Tian y cols., 2009), para usarlas como control positivo de las mediciones en el RE, y otra para la GFP dirigida a la membrana plasmática (pmGFP) (Mohseni y cols., 2009), para utilizarlas como control negativo.

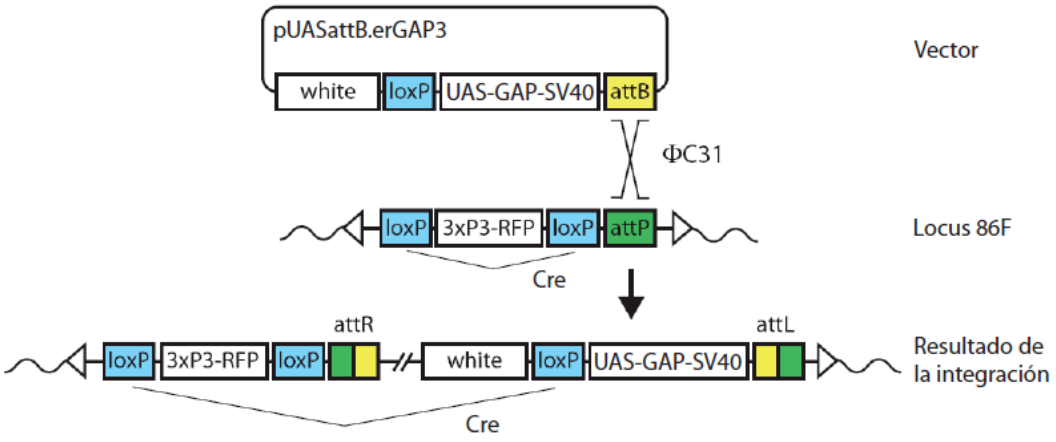

Figura 17. Mecanismo de inserción del vector pUASTattB en el sitio attP del cromosoma de *Drosophila*. La integrasa ΦC31 media la recombinación entre attB y attP, que integra el vector en el genoma, creando los sitios attL y attR. Los sitios loxP permiten la eliminación del gen de la dsRFP, o dsRFP y white (como indican las cabezas de flecha) con la recombinasa Cre. (Figura basada en la Figura 1 de (Bischof y cols., 2007)).

21. MEDICION DE LA $[Ca^{2+}]_{RE}$ EN MUSCULO DE *DROSOPHILA IN VIVO*

Las moscas adultas de la línea Mhc_erGAP3 se anestesiaron con CO_2 e inmediatamente se montaron embebiéndolas en una gota de agarosa de bajo punto de fusión (Sigma, A6560) al 3% (p/v), dejando el tórax por encima de la superficie de la agarosa (**Figura 18A**). Las imágenes se obtuvieron con un microscopio estereoscópico de fluorescencia (Leica MZ 16FA) equipado con un objetivo PLANAPO 1x (NA 0.14), y una lámpara de mercurio de 100 W. La fluorescencia de GAP se registró, primero a 470 nm (filtro 470/40), y después a 405 nm (filtro 405/40). La fluorescencia de GCaMP3 y pmGFP se registró sólo a 470 nm. La emisión se fijó en todos los casos a 525 nm (filtro 525/50). Los parámetros utilizados fueron: zoom 6.5x, 12 bits, binning 4x4, y ganancia de 1. Las medidas se tomaron en los músculos dorsolongitudinales del tórax de la mosca que se estimularon mediante el sistema de la fibra gigante (**Figura 18B**). Este consiste en el

empalamiento de dos electrodos de tungsteno en los ojos de la mosca, y la activación indirecta de los motoneuronas a través de impulsos eléctricos.

Cada experimento comenzó con una comprobación visual del movimiento de las alas tras una estimulación. La fluorescencia de erGAP3 se registró primero a 470 nm de excitación y, posteriormente, se repitió el protocolo a 405 nm. Los tiempos de exposición para 470 nm fueron de 25 ms, y para 405 de 35 ms. El protocolo de estimulación se hizo a 6 voltios durante 30 ms con frecuencias de entre 0.25 y 16 Hz, se tomaron imágenes cada 100 ms. El tratamiento de las imágenes se realizó con el programa Image J, con el que se substrajo el fondo y se calculó el cociente entre las dos fluorescencias píxel a píxel.

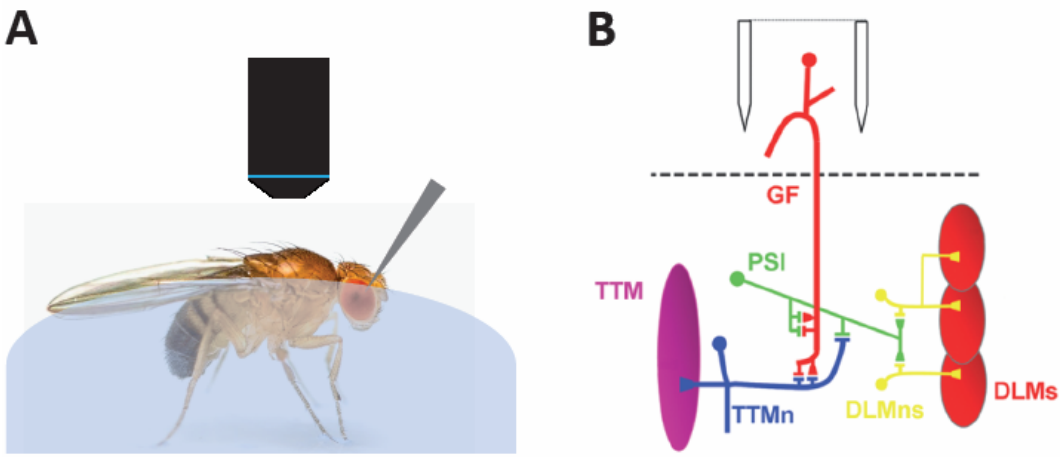

Figura 18. Esquema del montaje de las moscas para la medición *in vivo*. (A) Las moscas están embebidas en agarosa, en las que quedan atrapadas las alas. Los electrodos se clavan en los ojos de las moscas, cuyo tórax, donde se va a registrar, se sitúa debajo del objetivo. (B) Esquema del sistema de la fibra gigante, del que se muestra solo una mitad. La fibra gigante (GF, en rojo) transmite impulsos nerviosos desde el cerebro hasta el ganglio de la caja torácica, donde hace sinapsis con la motoneurona tergotrochanteral (TTMn, en azul), la cual inerva el músculo tergotrochanteral (TTM) y la interneurona sináptica periférica (PSI, en verde). Esta a su vez hace sinapsis con las motoneuronas dorsolongitudinales (DLMns, en amarillo), que inerva los músculos dorsolongitudinales (DLMs). En blanco se representan la posición relativa de los electrodos empalados (figura tomada de (Allen y Godenschwege, 2010)).

22. ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados se expresaron en medias ± desviación o error estándar de la media (DSM y ESM, respectivamente). La significación se calculó, según el caso, con el test de Kruskal-Wallis, el de Mann-Whitney o el de Student-Newman-Keuls, mediante el programa GraphPad InStat3.

23. LISTA DE MATERIALES

COMPUESTO	[STOCK]	[Soluciones]	REFERENCIA
Fura-2	2 mM	2 - 4 μM	Molecular Probes, F1201
Rhod-3	2 mM	2 - 16 μM	Molecular Probes, R10145
ATP	100 mM	100 μM	Sigma-Aldrich, A3377
Histamina	100 mM	100 μM	Sigma-Aldrich, H7250
Carbacol	10 mM	10 μM	Sigma-Aldrich, C4382
Cafeína	-	20 - 50 mM	Sigma-Aldrich, C0750
Lipopolisacáridos	5 mg/ml	10 μg/ml	Sigma-Aldrich, L2880
Acetilcolina	10 mM	10 μM	Sigma-Aldrich, A2661
Glutamato	100 mM	20 μM	Sigma-Aldrich, 49621
TRH	0.1 mM	10 nM	Sigma-Aldrich, P1319
LHRH	1 mM	10 nM	Sigma-Aldrich, L1898
GHRH	1 mM	10 nM	Sigma-Aldrich, SPC0160
Tapsigargina	2 mM	1 μM	Calbiochem, 586005
TBH	10 mM	10 μM	Sigma-Aldrich, 112976
Digitonina	100 mM	60 μM	Sigma-Aldrich, D141
Nigericina	5 mM	10 μM	Sigma-Aldrich, N5509
Gramicidina	5 mM	1 μM	Sigma-Aldrich, G5002
CCCP	1 mM	1 μM	Sigma-Aldrich, C2759
Monensina	20 mM	20 μM	Calbiochem, 475895
4BrA23187	10 mM	10 μM	Molecular Probes, B1494

Tabla 11. Lista de materiales empleados en esta tesis.

RESULTADOS

El modo de dar una vez en el clavo, es dar cien veces en la herradura.

Miguel de Unamuno

1. DISEÑO Y ANALISIS DE LOS MUTANTES DE GAP

Con objeto de construir una aequorina de baja afinidad más adecuada para las concentraciones de Ca^{2+} que se dan en el RE y en el aparato de Golgi se diseñó, en primer lugar, una librería de 22 mutaciones puntuales de GAP partiendo de la mutación D119A (que ya disminuye la afinidad de la aequorina por el Ca^{2+} unas 20 veces) con el objetivo de disminuir la afinidad por Ca^{2+} en un orden de magnitud más. En la **Tabla 12** se muestra la secuencia aminoacídica de los bucles de las tres manos EF funcionales de la aequorina, que son la I, la III y la IV, manteniendo la homología con las de la proteína de referencia calmodulina, y donde se ha resaltado en rojo el residuo D119 y en azul los residuos que se han mutado. En general, se han seleccionado residuos que participan directamente en el enlace de coordinación del Ca^{2+}, es decir, las posiciones designadas como X, Y, Z, -Y, -X y -Z del motivo consenso de las manos EF (**Figura 2**), aunque también se ha sustituido algún residuo no directamente implicado en la unión a Ca^{2+}, o que incluso no pertenece al dominio mano EF.

En primer lugar, se eligió mutar la posición X, que son los aspartatos 24 (mutaciones 1, 2 y 3), 117 (mutaciones 9 y 10) y 153 (mutación 16). De forma análoga, la posición –Z está muy conservada en glutamato en las tres manos EF y, por ello, se seleccionó para una segunda serie de mutaciones (mutaciones 7, 14, 15 y 22). La posición Z también se incluyó en el estudio, ya que, a pesar de que no la ocupan aminoácidos de naturaleza acídica, forma parte de la pirámide doble (mutaciones 5, 6, 13 y 20). A continuación, se mutaron otros residuos acídicos menos consensuados en las tres manos EF de la aequorina, como son los aspartatos 155 y 161 de la cuarta mano EF, que ocupan las posiciones Y y –X, respectivamente (mutaciones 17 y 21), y el glutamato 156, que no forma directamente un enlace con el Ca^{2+} (mutaciones 18 y 19). Además, se incluyeron en el estudio dos mutaciones en las que el aspartato 119 se sustituyó por otros residuos distintos de alanina, concretamente por lisina o isoleucina (mutaciones 11 y 12, respectivamente). Por último, se mutó la valina en la posición 25 a pesar de no ser acídico y no formar parte del sitio de unión a Ca^{2+} (mutación 5), y aunque la tirosina 38 no pertenece estrictamente al bucle de la mano EF, forma parte de la hélice α colindante, y por ello se incluyó también como residuo a mutar.

En el estudio se favorecieron las sustituciones conservativas, donde los residuos acídicos aspartato y glutamato se mutaron a sus correspondientes amidas, asparragina y glutamina, de tal modo que se altera la carga, pero se conserva el tamaño global del residuo. Además se incluyeron algunas sustituciones menos conservativas a aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina, valina y prolina), básicos (histidina, arginina y lisina) o polares sin carga (serina).

	X		Y		Z		-Y		-X			-Z
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
EF1:	D	V	N	H	N	G	K	I	S	L	D	E
	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128
EF3:	D	K	D	Q	N	G	A	I	T	L	D	E
	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164
EF4:	D	I	D	E	S	G	Q	L	D	V	D	E

Tabla 12. Secuencias aminoacídicas de los bucles de las tres manos EF funcionales de la aequorina. Los números representan las posiciones en la secuencia primaria. En rojo se indica el aspartato 119, y en azul los residuos adicionales que se han mutado.

Las reacciones de mutagénesis dirigida originalmente se realizaron en el plásmido de expresión eucariota pcDNA3 y, posteriormente, se verificaron por secuenciación. Las mutantes positivas se subclonaron en el vector de expresión bacteriano pET28a, que contiene la secuencia codificante para seis histidinas en fase con el extremo N-terminal de la proteína (**Figura 19**). Esta estrategia se usará para la purificación proteica mediante afinidad con Ni^{2+}.

Figura 19. Esquema de la construcción de GAP utilizado para su expresión en procariotas. El gen de GAP está clonado en fase detrás del péptido de seis histidinas (His_6) del vector de expresión bacteriano (pET28a).

El ensayo de análisis de los mutantes se realizó con las proteínas recombinantes extraídas de bacterias. Para ello se adaptaron los protocolos de inducción y extracción proteica, y se pusieron a punto a mini-escala en el laboratorio para poder procesar simultáneamente todas las mutantes. La inducción con IPTG hizo que las proteínas se expresaran en grandes cantidades que se acumularon mayoritariamente de forma insoluble en los cuerpos de inclusión bacterianos, y en menor medida, de forma soluble en el citosol. El hecho de que las proteínas recombinantes se localicen en los cuerpos de inclusión facilita la purificación. Se hicieron experimentos para comprobar si la proteína soluble era funcional, y como resultó no serlo, hubo que extraer la proteína insoluble de los cuerpos de inclusión mediante desnaturalización con urea, y posteriormente renaturalizarla. La concentración de la proteína en los extractos se cuantificó por el método de Bradford y se ajustó a 3-6 mg/ml para realizar los distintos ensayos de caracterización de GAP.

El ensayo de placa se diseñó para detectar selectivamente las variantes de baja afinidad por un aumento de la fluorescencia al incrementar la concentración de Ca^{2+} desde 0.1 a 1 mM. En estas condiciones, solamente las mutantes con una K_d superior a 100 µM tendrían un aumento de fluorescencia considerable (véase más adelante). La fluorescencia se midió en el lector de placas de 96 pocillos, leyendo para cada uno de los mutantes a 390 y 485 nm de excitación, y 535 nm de emisión. Estas longitudes de onda se escogieron entre los filtros disponibles en el lector de placas con longitudes de onda más cercanas a los máximos de GAP (405 nm y 470 nm de excitación y 520 nm de emisión respectivamente). Los cocientes 485/390 cambiaron con el Ca^{2+} en las muestras de GAP de forma muy similar a los cocientes 470/405. Las lecturas se hicieron a tres concentraciones de Ca^{2+}: 0 (con EGTA 0.1 mM), 0.1 mM y 1 mM de $CaCl_2$. En la **Tabla 13** se muestran los valores obtenidos a las distintas longitudes de onda y concentraciones de Ca^{2+}. Para cada mutante, se calcularon los cocientes F_{485}/F_{390} (o cociente R) para cada una de las tres [Ca^{2+}], y en las 3 últimas columnas se muestran las razones R_{Ca}/R_{EGTA} a 0.1 y 1 mM Ca^{2+} y el cociente entre estos dos valores ($R_{1Ca}/R_{0.1Ca}$). Cuando esta relación tiene un valor próximo a 1, quiere decir que la fluorescencia es independiente de la concentración de Ca^{2+} en el rango estudiado y la sonda es de alta afinidad (K_d << 0.1 mM). Por el contrario, si el valor es > 1 revela menor afinidad. En

concreto una K_d > 100 µM nos dará un cociente $R_{1Ca}/R_{0.1Ca}$ > 1.8 (ver leyenda de la **Tabla 13**).

Es destacable que algunas mutaciones eliminaron completamente la fluorescencia de la sonda, como la mutante 21 (D117N/D119A), o la redujeron enormemente como las mutantes 9 (D119A/D161K) y 19 (D119A/E156P). Teniendo en cuenta que las mutaciones se realizaron sobre la aequorina, esto podría indicar que estas mutaciones provocan cambios conformacionales que impiden la formación del cromóforo de la GFP o de la estructura del barril que lo protege.

MUTACIONES		EGTA 0.1 mM		$CaCl_2$ 0.1 mM		$CaCl_2$ 1 mM		R_{CaCl2} / R_{EGTA}		RATIO
Número	Aminoácidos	390 nm	485 nm	390 nm	485 nm	390 nm	485 nm	0.1 mM	1 mM	1 mM / 0.1 mM
1	D24H,D119A	10382	3887	10843	4136	11188	4357	1,02	1,04	1,02
2	D24N,D119A	17789	7290	23981	11455	20696	17508	1,18	2,08	1,77
3	D24V,D119A	18570	7680	17465	18227	14628	15699	2,53	2,60	1,03
4	V25P,D119A	7137	3060	6079	8623	6091	8391	3,31	3,21	0,97
5	N28Q,D119A	8520	3642	8310	3551	9365	4167	1,00	1,05	1,04
6	N28V,D119A	7188	2813	7930	3095	7215	2863	1,00	1,01	1,02
7	D35Q,D119A	17963	7834	16269	15565	15630	16485	2,20	2,41	1,10
8	Y38S,D119A	17191	7411	14349	14871	16683	16462	2,40	2,29	0,95
9	D117N,D119A	885	264	689	206	702	216	1,00	1,02	1,03
10	D117V,D119A	19002	8361	13617	14256	13619	14435	2,39	2,42	1,01
11	D119K	18577	7816	15637	13539	17171	16403	2,06	2,27	1,10
12	D119I	12583	5335	10826	6541	9298	6227	1,43	1,51	1,06
13	D119A,N121L	24245	9623	18923	21864	16280	21761	2,93	3,37	1,15
14	D119A,E128K	15744	6274	12779	12776	14271	14828	2,51	2,61	1,04
15	D119A,E128R	7710	2989	6730	6847	6404	7233	2,63	2,91	1,11
16	D119A,D153L	18914	7678	13713	13250	12535	11947	2,37	2,34	0,99
17	D119A,D155K	17088	7203	16549	15719	14885	15221	2,26	2,44	1,08
18	D119A,E156N	13448	5376	10663	10583	11132	11333	2,48	2,55	1,03
19	D119A,E156P	724	270	876	321	810	283	0,98	0,94	0,96
20	D119A,S157Q	38016	17775	34042	31463	6601	7838	1,99	2,55	1,29
21	D119A,D161K	128	66	114	63	136	76	1,07	1,11	1,05
22	D119A,E164K	8137	3597	6144	6053	6015	6453	2,24	2,43	1,09

Tabla 13. Sensibilidad a Ca^{2+} de los mutantes de GAP. Las medidas de fluorescencia a 390 y 485 nm de excitación se realizaron con 1 µl de proteína (aproximadamente 3.5 µg para cada variante) en 200 µl de PBS a tres concentraciones de calcio: 0 (con EGTA 0.1 mM), 0.1 mM y 1 mM para cada una de las 22 proteínas mutadas. Los residuos mutados tienen la nomenclatura de la secuencia primaria de la proteína de la aequorina (no del gen completo de GAP). Cada valor es la media de 3 medidas independientes. *RATIO: suponiendo un modelo de cinética de Michaelis, $v/V_{max} = [Ca^{2+}] / (K_m + [Ca^{2+}])$, R es < 1.1 para K_m < 10 µM y R > 1.8 para K_m > 100 µM.

Únicamente dos variantes exhibieron un cociente significativamente mayor que 1: las mutantes número 2 (D24N/D119A) y 20 (D119A/S157Q). Estos resultados se verificaron repitiendo de nuevo todo el proceso, desde

la inducción proteica, obteniéndose resultados muy similares. Se eligió la mutante 2 para su posterior caracterización por tener el mayor valor de cociente (1.77, columna "RATIO"). A esta variante se la llamó GAP2, en referencia a su predecesora GAP1, de mayor afinidad (K_d = 16 μM).

2. CARACTERIZACION DE GAP2 *IN VITRO*

Una vez obtenida una mutante que superaba la prueba del cribado, se procedió a su caracterización *in vitro*.

2.1. PURIFICACION DE GAP2

La producción de la proteína GAP2 se realizó con el protocolo adaptado para producir proteína a mayor escala, en el que se incluyó algunos pasos de purificación adicionales. A pesar de que el extracto proteico obtenido en *E.coli* estaba muy enriquecido en GAP2, debido a su localización en los cuerpos de inclusión, se purificó la proteína mediante afinidad, utilizando una resina de níquel. Al estar la proteína expresada como una fusión con un péptido de 6 histidinas se unen selectivamente a esta resina.

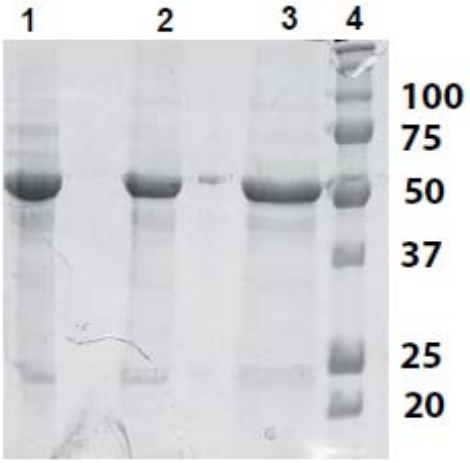

Figura 20. Purificación de la proteína GAP2. La proteína se indujo en bacterias, se extrajo según lo descrito en Materiales y Métodos y se sometió a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras (SDS-PAGE). En los carriles 1-3 se añadió 8 mg de proteína: carril 1, extracto bacteriano crudo; carril 2, primera elución tras la incubación con las bolas de Ni; carril 3, segunda elución tras la incubación con las bolas de Ni; el último carril es el marcador de peso molecular, indicando los pesos en kDa (10 μl, Bio-Rad).

El extracto proteico crudo, directamente extraído de *E.coli* (carril 1) y sometido a electroforesis PAGE en condiciones reductoras (con SDS) resultó en una banda mayoritaria de unos 50 kDa (**Figura 20**); este peso molecular es concordante con el peso teórico para una proteína de 482 aminoácidos (53 kDa). Este extracto también contenía otras bandas minoritarias de peso molecular mayor que GAP2 (carril 1), que se eliminaron tras su purificación por afinidad con las bolas de níquel (carriles 2 y 3). Además de confirmar el tamaño de 50 kDa, nuestros resultados indican que, debido a su acumulación en los cuerpos de inclusión, GAP2 se extrae muy purificada de las bacterias. La cantidad es suficiente, tanto para medir los espectros de fluorescencia en diluciones de este extracto crudo como para determinar la K_d, y la sensibilidad al pH y a otros iones divalentes.

2.2. ESPECTROS DE FLUORESCENCIA

El espectro de fluorescencia de la proteína GAP2 purificada era similar al de la proteína GAP original, con dos máximos de excitación, uno a 405 y otro a 470 nm, y un único máximo de emisión a 510 nm (**Figura 21**). La adición de Ca^{2+} disminuye la intensidad de fluorescencia excitada a 405 y aumenta la excitada a 470 nm. Aunque el máximo de fluorescencia a 405 nm es mayor que el de 470 nm, la variación de fluorescencia dependiente de Ca^{2+} es mayor a esta segunda longitud de onda (**Figura 21A**). Con respecto al espectro de emisión, la posición del pico máximo no se desplaza con el Ca^{2+} (**Figura 21B**), y el máximo de emisión está a 505-510 nm. Para las medidas rutinarias, se escogió 520 nm para separar más la excitación y la emisión y así evitar interferencias por luz reflejada debida a turbidez de las soluciones.

El cociente R_{max}/R_{min} (el parámetro indicativo del rango dinámico, siendo R el cociente F_{470}/F_{405}) se calculó a partir de los espectros de fluorescencia, obteniendo la R máxima (R_{max}) con Ca^{2+} saturante (10 mM), y la R mínima (R_{min}) en ausencia de Ca^{2+} (con EGTA 0.1 mM). En estas condiciones, el rango dinámico de GAP2 tiene un valor de 2.6 a 3, muy similar a los descritos previamente para GAP y GAP1 (Rodriguez-Garcia y cols., 2014).

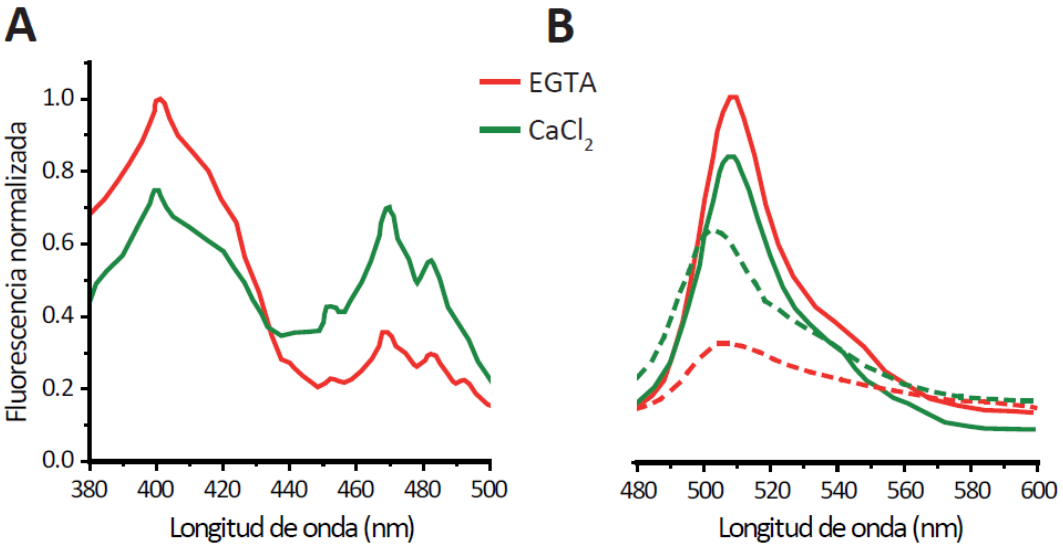

Figura 21. Espectros de fluorescencia de GAP2. Las medidas se realizaron con 20 μg/ml de la proteína diluida en 1 ml de una solución que contiene KCl 140 mM, $MgCl_2$ 1 mM y MOPS 20 mM, pH 7.2, en presencia de $CaCl_2$ 10 mM (trazo verde) o de EGTA 0.1 mM (trazo rojo). (A) Espectro de excitación, con la emisión fijada a 520 nm. (B) Espectros de emisión fijando la excitación a 405 nm (líneas continuas) o a 470 nm (líneas discontinuas).

2.3. CALIBRACION DE GAP2 *IN VITRO*

El siguiente paso consistió en medir la afinidad por Ca^{2+} de GAP2 *in vitro*. Estas medidas se realizaron utilizando el lector de placas de fluorescencia de 96 pocillos. Se añadieron 3 μg de proteína GAP2 en 200 μl de un medio que contenía KCl 140 mM, $MgCl_2$ 1 mM, y MOPS 20 mM a pH 7.2. A muestras sucesivas de este medio se añadieron las siguientes concentraciones de Ca^{2+}: EGTA 0.1 mM (Ca^{2+} 0), no adiciones (Ca^{2+} nominal, aproximadamente 0.01 mM), 0.05 mM, 0.1 mM, 0.2 mM, 0.5 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM y 50 mM Ca^{2+}. En todas las condiciones la fluorescencia se monitorizó a las dos longitudes de onda de excitación, 390 nm (equivalente a 405 en el espectrofluorímetro) y 485 nm (equivalente a 470 nm en el espectrofluorímetro) con 535 nm de emisión (equivalente a 520 en el espectrofluorímetro). Los resultados obtenidos están representados en la **Figura 22** y se expresaron según la siguiente fórmula:

$$Y = \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R_{min}} \quad \textbf{(1)}$$

Donde R_{min} es el valor del cociente de fluorescencias obtenido en ausencia de Ca^{2+} y R_{max} es el valor del cociente de fluorescencias obtenido en presencia de Ca^{2+} saturante (50 mM). Los valores se ajustan muy bien a la curva sigmoide correspondiente a la ecuación de Hill:

$$Y = \frac{V_{max} \cdot [Ca^{2+}]^n}{K_d^n + [Ca^{2+}]^n} \quad \textbf{(2)}$$

Donde el mejor ajuste se obtuvo para los siguientes valores de las constantes (media ± desviación estándar): V_{max} = 1; K_d = 410 ± 37 μM y n = 0.95 ± 0.08.

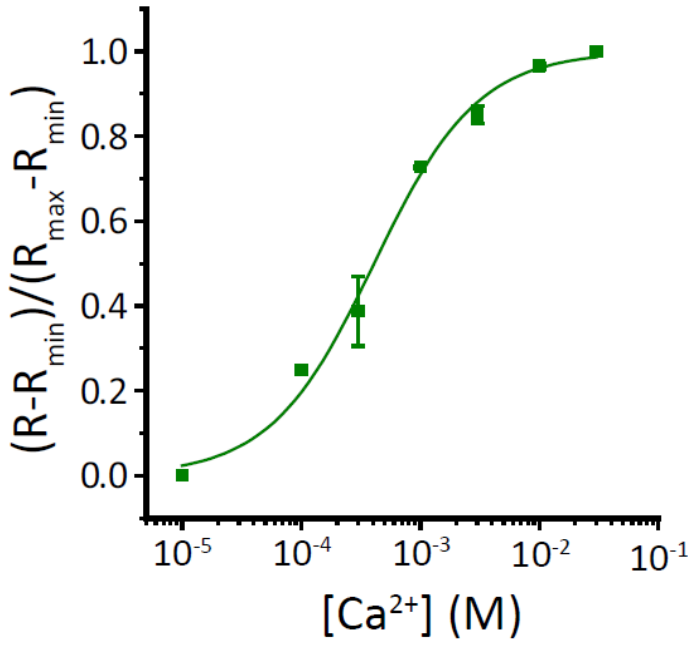

Figura 22. Curva de titulación de GAP2 con Ca^{2+}. Cada punto representa la media ± DSM de tres valores independientes. Para más detalles, consultar texto.

El valor obtenido para la K_d, 407 μM, indica que la proteína GAP2 es muy adecuada para registrar Ca^{2+} en el RE, donde las concentraciones obtenidas con aequorina en distintos tipos celulares estaban entre 0.4 y 1 mM (Alonso y cols., 1998). Parece que con las mutaciones D24N y D119A se anularían la primera y tercera manos EF de la aequorina, ambas de alta afinidad por Ca^{2+}. Únicamente permanecería funcional, entonces, la cuarta mano EF, de baja afinidad; esto podría explicar los valores obtenidos para la K_d (muy alta) y la n (cercana a 1).

2.4. SENSIBILIDAD DE GAP2 AL pH

Como se ha mencionado en la introducción, la proteína GFP, en general, es relativamente sensible a pH, y los sensores de Ca^{2+} derivados de ella requieren, para ser fiables, una optimización de este parámetro disminuyendo la sensibilidad a pH. Al estar la sonda GAP basada en la GFP, se comprobó cómo afectaban las variaciones moderadas de pH a su afinidad por el Ca^{2+} (**Figura 24**).

En las medidas llevadas a cabo a pH 6.5, 7 y 7.5, las tres curvas sigmoides prácticamente se superponen, indicando que la afinidad por el Ca^{2+} de la GAP2 no se ve modifica en este rango de pHs. En un segundo experimento, se amplió el rango de pH desde moderadamente ácido (pH 5.5 – 6.5) hasta moderadamente básico (pH 8.5), usando diferentes tampones según los rangos de pH: acetato para pH 5.5; histidina para pH 6; MOPS para 6.5, 7 y 7.5; y, por último, Tris-HCl para pH 8.5 (**Figura 23**).

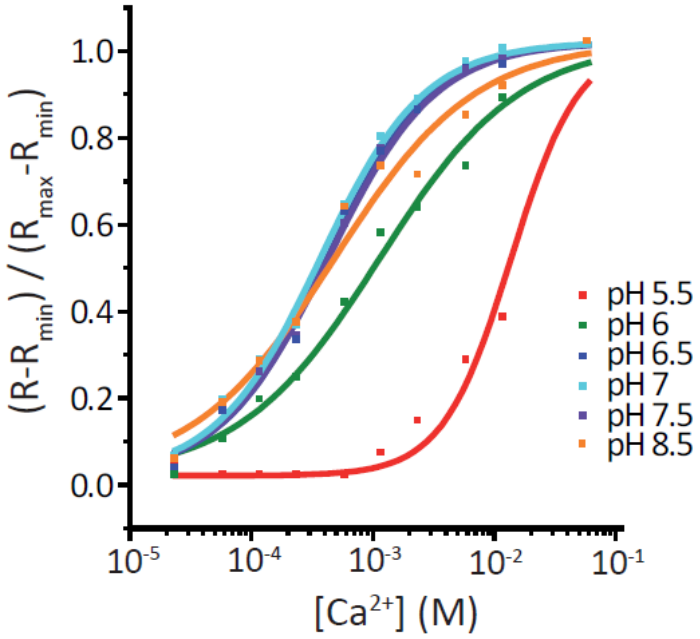

Figura 23. Sensibilidad de GAP2 al pH. Calibración de GAP2 a distintas [Ca^{2+}] realizadas a pH básico, neutro y ácido (5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8.5). Cada punto representa la media ± DSM de tres valores independientes. Otros detalles metodológicos como en la **Figura 22**.

Entre los pHs 6.5 y 8.5 los cambios fueron muy escasos, pero a pH 6, la curva se desplaza ligeramente hacia la derecha, indicando una disminución de la afinidad por el Ca^{2+} (K_d = 950 μM). Por debajo, la afinidad se reduce

drásticamente, por ejemplo, a pH 6 la afinidad se reduce más de 100 veces (K_{50} aproximadamente 10 mM) y los datos de dependencia de Ca^{2+} se hacen muy variables de experimento a experimento.

En resumen, el sensor GAP2 es adecuado para medir altas concentraciones de Ca^{2+} en el rango de pHs de 6 a 8.5, por lo que podría dirigirse al RE, al aparato de Golgi o a las mitocondrias, orgánulos cuyo pH interno está comprendido en este rango. En el caso de los lisosomas, cuyo lumen está a pH 4.5-5, el uso de GAP2 sería muy problemático.

2.5. EFECTOS DE OTROS CATIONES DIVALENTES

Los dominios mano EF también pueden reconocer y ligar otros cationes divalentes aparte del Ca^{2+}. La concentración intracelular del Mg^{2+} es próxima a 1 mM (Szanda y cols., 2009), una concentración diez mil veces mayor que $[Ca^{2+}]_C$. En estas condiciones, si el Mg^{2+} compitiera con Ca^{2+} por la unión a GAP2 ocasionaría un grave problema. Para investigar este punto se realizó una calibración como la de la **Figura 22** a tres concentraciones de $MgCl_2$: 0.1, 1 y 5 mM. La **Figura 24A** muestra cómo las curvas de afinidad de GAP2 por el Ca^{2+} se superponen para las tres concentraciones de Mg^{2+}. Este resultado indica que el Mg^{2+} no compite en absoluto con el Ca^{2+} por sus sitios de unión en la GAP. El sensor puede usarse, por tanto, en el citosol o en orgánulos con distintos contenidos de Mg^{2+} sin temor a interferencias en la señal fluorescente.

A continuación se estudió si la respuesta de GAP2 al Ca^{2+} se ve afectada por otros cationes divalentes, como el Ni^{2+}, el Co^{2+} o el Mn^{2+}. En este caso se calculó el cociente $(R–R_{min})/(R_{max}–R_{min})$, y a su vez estos valores se normalizaron con respecto al valor obtenido en EGTA mediante la operación $(R\text{-}R_{EGTA})/R_{EGTA}$. Como se muestra en la **Figura 24B**, se realizaron medidas en presencia de calcio nominal (10 μM aproximadamente) y añadiendo 1 mM de $CaCl_2$ o 1 mM de $NiCl_2$, de $CoCl_2$ o de $MnCl_2$. En el caso de los tres últimos se realizó además una medida en presencia de $CaCl_2$ 1 mM (**Figura 24B**).

Al ser GAP2 un sensor de baja afinidad, la contribución del calcio nominal a la señal de fluorescencia es prácticamente nula (primera barra de la **Figura 24B**). Por tanto, la aportación que pueda hacer el Ca^{2+} nominal a las medidas $NiCl_2$, $CoCl_2$ o $MnCl_2$ es despreciable. El Ni^{2+} aumentó la fluorescencia de GAP2 a 390 nm mientras que la disminuyó a 485 nm, lo

que explica que el cociente $(R-R_{EGTA})/R_{EGTA}$ sea menor que 1, aproximadamente un 20% menor con Ni^{2+} que en Ca^{2+} nominal. El cociente de fluorescencia de GAP2 de Ni + Ca no aumentó respecto a Ni^{2+} solo, lo cual indica que el Ni^{2+} compite con mayor afinidad que el Ca^{2+} por los sitios de unión de la aequorina y bloquea sus sitios unión. El Co^{2+} se comporta de forma similar al Ni^{2+}, ya que también produce un aumento de la fluorescencia a 390 nm y la disminuye a 485 nm (en este caso el cociente disminuye algo más de un 10%). En presencia de Co^{2+} + Ca^{2+} el cociente aumenta, aunque no tanto como en presencia de Ca^{2+} únicamente. Esto indica que el Co^{2+} compite por los sitios de unión de las manos EF, pero no con tanta afinidad como el Ni^{2+}. Por último, el catión Mn^{2+} no tuvo efecto alguno sobre la señal de GAP2, como se observa al comparar las barras de Mn^{2+} en Ca^{2+} nominal (Mn) y en 1 mM de Ca^{2+} (Mn + Ca) con sus respectivos controles (Ca^{2+} nominal y Ca^{2+} 1 mM). Estos resultados indican que el Mn^{2+} no se une a GAP2.

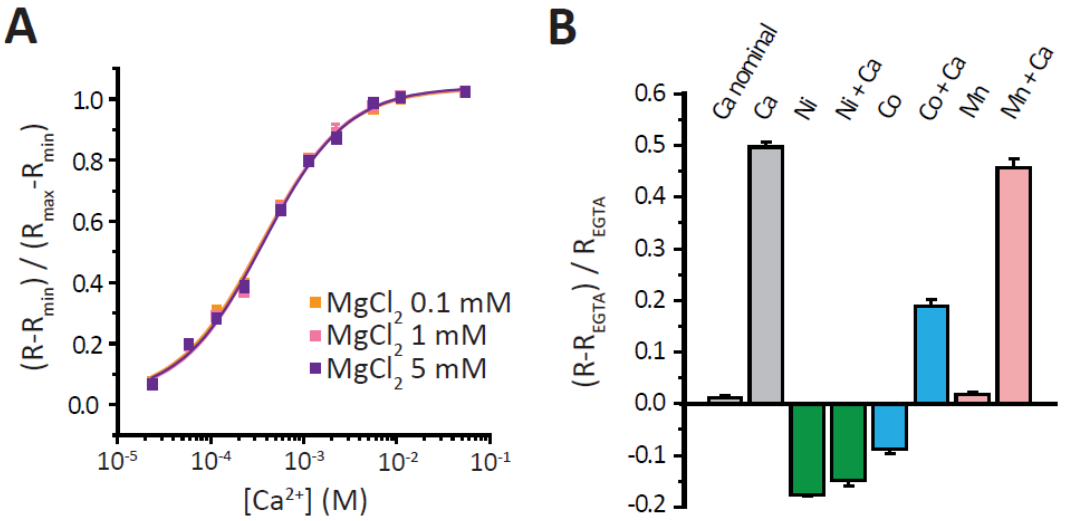

Figura 24. Efecto de los cationes divalentes sobre la fluorescencia de GAP2. Valores obtenidos en medio con KCl 140 mM, MOPS 20 mM pH 7. (A) Efecto de las tres concentraciones de Mg^{2+} que se indican. Las curvas están calculadas con la ecuación de Hill. Cada punto representa la media ± la DSM de tres valores independientes. Otros detalles metodológicos como en la **Figura 22**. (B) Efecto de otros cationes divalentes minoritarios sobre la fluorescencia de GAP2. El Ca^{2+} nominal apenas altera el cociente de fluorescencias de GAP2 respecto a la ausencia de Ca^{2+} (EGTA 0.1 mM), por lo que su aportación a las medidas del cociente con los metales divalentes en ausencia de $CaCl_2$ es despreciable. Cada punto representa la media ± DSM de tres valores independientes.

3. EXPRESION DE GAP2 EN CELULAS DE MAMIFERO

El siguiente paso fue estudiar el funcionamiento de GAP2 en el RE de células de mamífero. La expresión se obtuvo mediante la fusión en el extremo N-terminal de GAP2 del péptido señal de la calreticulina, y en su extremo C-terminal la secuencia de retención del tetrapéptido KDEL (**Figura 25**), que favorece el retorno desde el aparato de Golgi al RE de las proteínas que hayan continuado por la vía de secreción (Kendall y cols., 1992b). Con esta fusión construimos el plásmido pcDNA3.erGAP2.

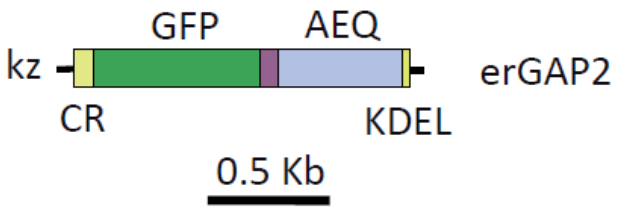

Figura 25. Esquema de la construcción de GAP2 dirigida al RE. La construcción consta de la secuencia consenso Kozak (kz), que facilita su expresión; la direccionalidad al RE, mediante la fusión del péptido señal de la calreticulina, y el péptido de retención en el RE, KDEL, en los extremos 5' y 3', respectivamente. Este gen fue denominado erGAP2.

Este plásmido se transfectó de forma transitoria en células HeLa, en las cuales la fluorescencia verde de la GFP tenía el patrón característico del RE. El marcaje rellena toda la célula, siendo de mayor intensidad alrededor del núcleo, y de menor intensidad conforme se acerca a la membrana plasmática. El núcleo queda excluido, y se ve como un círculo oscuro en mitad de una fluorescencia.

Para realizar los experimentos de forma más fácil y reproductible, se generó un clon estable en células HeLa conteniendo el gen de erGAP2, llamado HeLa-erGAP2. Las células de este clon también expresaban la sonda correctamente en el RE, con la característica exclusión nuclear, como sucedía también en las transfecciones (**Figura 26A**). Para estudiar posibles modificaciones de la proteína, como truncación, o la formación de dímeros o de agregados, se realizó un western blot de un extracto total de las células del clon. La **Figura 26B** muestra el resultado obtenido de una película revelada con anticuerpo específico anti-GFP, en la que sólo aparece una banda, indicando que la proteína se expresa correctamente, y que tiene el tamaño teórico esperado de 53 kDa (**Figura 26B**). Todos los

experimentos realizados con erGAP2 en células HeLa mostrados en este trabajo se han realizado con este clon estable.

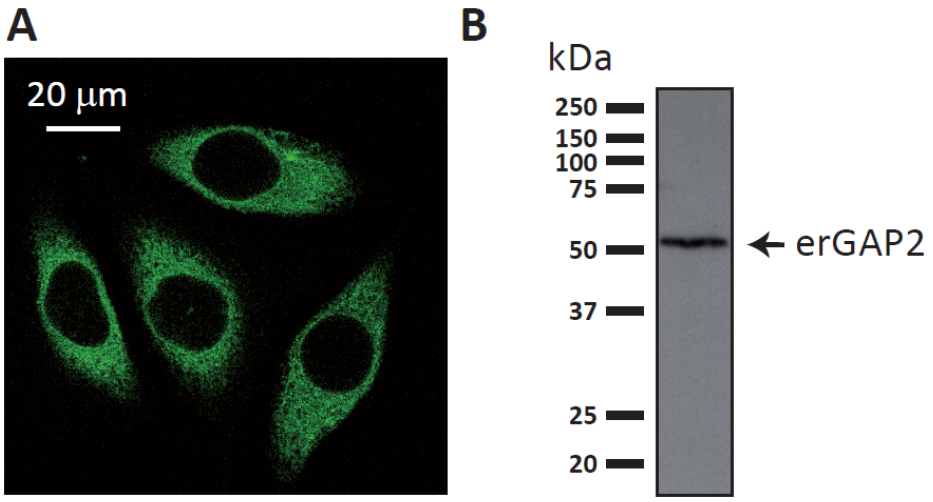

Figura 26. Caracterización del clon estable HeLa-erGAP2. (A) Imagen de fluorescencia de células fijadas que expresan erGAP2 tomada en un microscopio confocal. (B) Western blot del extracto obtenido a partir del clon estable y revelado con un anticuerpo anti-GFP.

La fotoestabilidad es un parámetro importante en un sensor fluorescente. Para tener una indicación de la fotoestabilidad se monitorizó la fluorescencia de células HEK293T que expresaban de forma transitoria erGAP2 a 403 y 470 nm durante 20 minutos, a 22°C, mientras se perfundían las células con MEC con $CaCl_2$ 1 mM (**Figura 27**). Los valores de las fluorescencias a cada longitud de onda se normalizaron como F/F_0, para poder apreciar mejor los cambios de intensidad. A 403 nm, la fluorescencia disminuyó progresivamente, aproximadamente un 10% a lo largo de los 5 primeros minutos, recuperándose luego lentamente hasta el nivel inicial. A 470 nm, la fluorescencia se mantuvo muy estable a lo largo de los 20 minutos de observación. Teniendo en cuenta el carácter ratiométrico de la sonda y que ambas longitudes de onda se comportan de forma muy similar, estas pequeñas variaciones se ven corregidas cuando se realiza el cociente F_{470}/F_{403}.

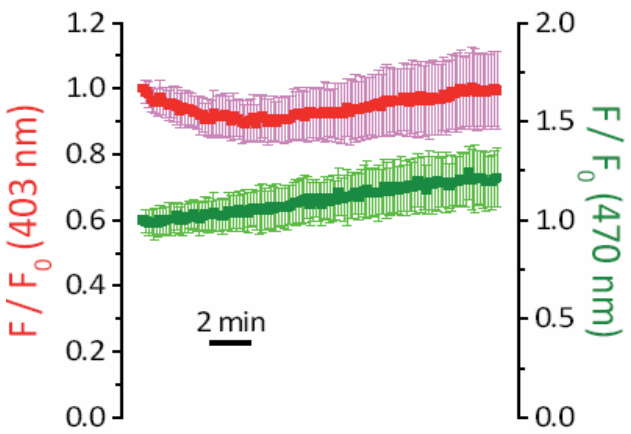

Figura 27. Fotoestabilidad de erGAP2. Representación de un experimento en células HEK293T que expresan de forma estable erGAP2. En rojo se representa la fluorescencia a 403 nm (media de 21 células) y en verde la media de la fluorescencia de las mismas a 470 nm. Ambas fluorescencias están normalizadas dividiendo por F_0 a 403 nm (media de las 10 primeras imágenes).

3.1. CALIBRACION DE erGAP2 *IN SITU*

Con objeto de investigar si el microambiente del interior del RE modifica la afinidad de GAP2 por el Ca^{2+}, se realizó una calibración *in situ* y se comparó con la calibración *in vitro*. El protocolo desarrollado para tal fin fue el siguiente: antes de la calibración las células del clon estable se sometieron a un pretratamiento para vaciar el RE de calcio. Primero las células HeLa-erGAP2 (adheridas en cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro) se incubaron en MEC sin Ca^{2+} (con EGTA 0.5 mM) y el inhibidor reversible de la bomba SERCA, la TBH, a una concentración de 10 µM durante 10 minutos. Después los cubreobjetos se montaron en la cámara del equipo de imagen de célula única y se comenzaron los registros con la perfusión de MEC sin Ca^{2+} (con EGTA 0.1 mM) para lavar la TBH. Posteriormente, las células se permeabilizaron con medio intracelular con digitonina (60 µM) y EGTA (0.1 mM). A continuación, se detuvo la perfusión y se añadió medio intracelular con la siguiente composición de ionóforos: 10 µM de nigericina, 1 µM de gramicidina, 1 µM de CCCP, 20 µM de monensina y 10 µM de 4BrA23187. Los ionóforos se utilizaron para asegurar la disipación completa de los gradientes electroquímicos de los iones monovalentes y divalentes y así colapsar el potencial de membrana, de modo que el Ca^{2+} esté en equilibrio a través de la membrana del RE.

En la **Figura 28A** se ilustra un experimento típico. Se hicieron primero varias adiciones de medio interno con concentraciones de Ca^{2+} crecientes: 0 (EGTA 0.1 mM), 0.1, 0.3, 1, 3, y 10 mM, y después se añadieron las mismas soluciones añadidas en orden decreciente de concentración (**Figura 28A**). Se registró la fluorescencia a 403 nm y 470 nm; posteriormente se calculó el cociente R entre ellas (**Figura 28B**). Cada valor se normalizó entre 0 y 1 (R_{min} y R_{max}), y se representó frente a la $[Ca^{2+}]$ correspondiente. A partir de esta función se calculó la K_d *in situ* de erGAP2 por Ca^{2+}, que resultó ser de 490 ± 70 μM, con V_{MAX} = 1 y n = 0.93 ± 0.12 (media ± SEM). A partir de estos datos se concluye que la K_d de GAP2 calibrada *in vitro* con la proteína extraída de bacterias (410 μM, **Figura 23**) y calibrado *in situ* en el RE de células eucariotas (490 μM, **Figura 28B**) son muy similares.

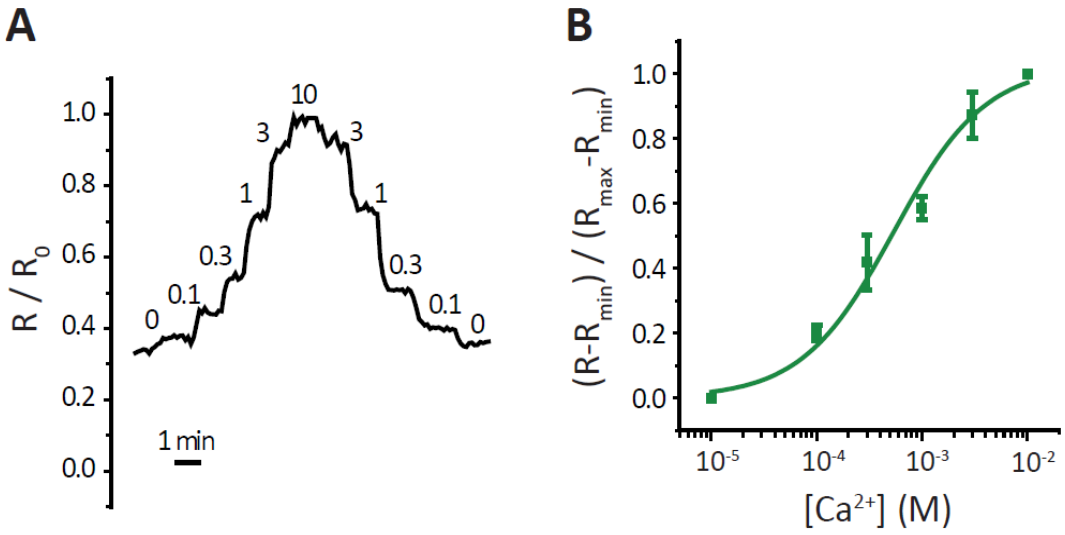

Figura 28. Calibración *in situ* de erGAP2. (A) Experimento de imagen en célula única para la calibración de la erGAP2, en el que se representa la normalización del cociente de F_{470} / F_{403} (R), dividiéndolo por dicho cociente en EGTA (R_0). El trazo es la media de 27 células presentes en el campo, sobre el que se indica la concentración de calcio añadida en mM. (B) Curva calculada con la ecuación de Hill. Cada punto representa la media ± la DSM de tres cubreobjetos. La curva representa la función y = $[Ca^{2+}]^n$/ (K_d^n + $[Ca^{2+}]^n$), donde K_d es la constante de disociación y n el coeficiente de Hill (ver valores en el texto principal). Otros detalles metodológicos como en la **Figura 22**.

3.2. MEDIDA DE LA $[Ca^{2+}]_{ER}$ EN CELULAS INTACTAS

Una vez verificada que la afinidad de la sonda erGAP2 por Ca^{2+} se mantenía *in situ*, se procedió a comprobar su comportamiento registrando

la homeostasis del calcio en respuesta a estímulos fisiológicos. En una primera serie de experimentos, se comparó la respuesta de un estímulo máximo con ATP (100 μM) junto con histamina (100 μM) en presencia y en ausencia de calcio extracelular (ATP + His; **Figura 29**). En células HeLa, el ATP extracelular se une a su receptor purinérgico P2Y acoplado a proteína G_q y estimula la ruta de señalización del IP_3 (Smit y cols., 1993). La histamina tiene cuatro receptores distintos que disparan diversas vías de señalización, y concretamente, el receptor H_1 está acoplado a proteínas G y también desencadena la ruta del IP_3 (Hill, 1990). Al añadir los dos estímulos juntos, se pretendía obtener un efecto máximo y con mínima desensibilización.

La estimulación produjo una reducción en la F_{470} y un aumento de F_{403}, como se observa en la **Figura 29A**. El cociente R (normalizado con respecto a la señal basal, R_0) disminuyó un 33%, como se aprecia en la **Figura 29B**. La aplicación de tres pulsos sucesivos de ATP con histamina en ausencia de Ca^{2+} extracelular produjo tres caídas de la señal de erGAP2, disminuyendo la señal un 50% con respecto a R_0. Tras la aplicación de los dos primeros estímulos, la SERCA recapta el Ca^{2+} que se ha liberado a través del receptor de IP_3 y el RE comienza a rellenarse, aunque no llega a hacerlo completamente antes de le llegue el estímulo siguiente (**Figura 29B**). El tercer estímulo produce un vaciamiento prácticamente completo. Al reponerse el Ca^{2+} extracelular (1 mM) se recupera la señal basal de la $[Ca^{2+}]_{ER}$.

Con objeto de demostrar que la señal de erGAP2 procede exclusivamente del RE, se realizó un experimento con inhibidores de la SERCA. En primer lugar se hizo un experimento con el inhibidor reversible TBH. En la **Figura 29C**, tras un estímulo máximo de ATP en presencia de Ca^{2+} extracelular, con posterior rellenado del RE al interrumpir el estímulo, se perfundió durante 2 minutos con MEC sin Ca^{2+} (EGTA 0.5 mM) y 10 μM de TBH. La TBH produjo una lenta caída de la señal R/R_0, lo que indica una lenta salida pasiva del Ca^{2+} del RE debido al bloqueo de la actividad de la SERCA. La estimulación con ATP en presencia de TBH provocó una rápida caída de la señal R/R_0, evidenciando el vaciamiento del RE, que llega a un plateau, sugiriendo que es completo. La disminución del cociente R/R_0 fue, en este caso, de casi el 60%. Tras unos minutos se retiraron los estímulos y la TBH y se perfundió de nuevo con MEC con 1 mM de Ca^{2+}. La TBH se lavó rápidamente y se recuperó la señal basal de erGAP2, con un valor de R/R_0

próximo a 1 (**Figura 29C**). Es posible, por tanto, tener en cada trazado una estimación del valor de R_{min} al final de cada registro estimulando con ATP en presencia de TBH; este valor es necesario para calibrar la señal fluorescente en $[Ca^{2+}]$, como se mostrará más adelante.

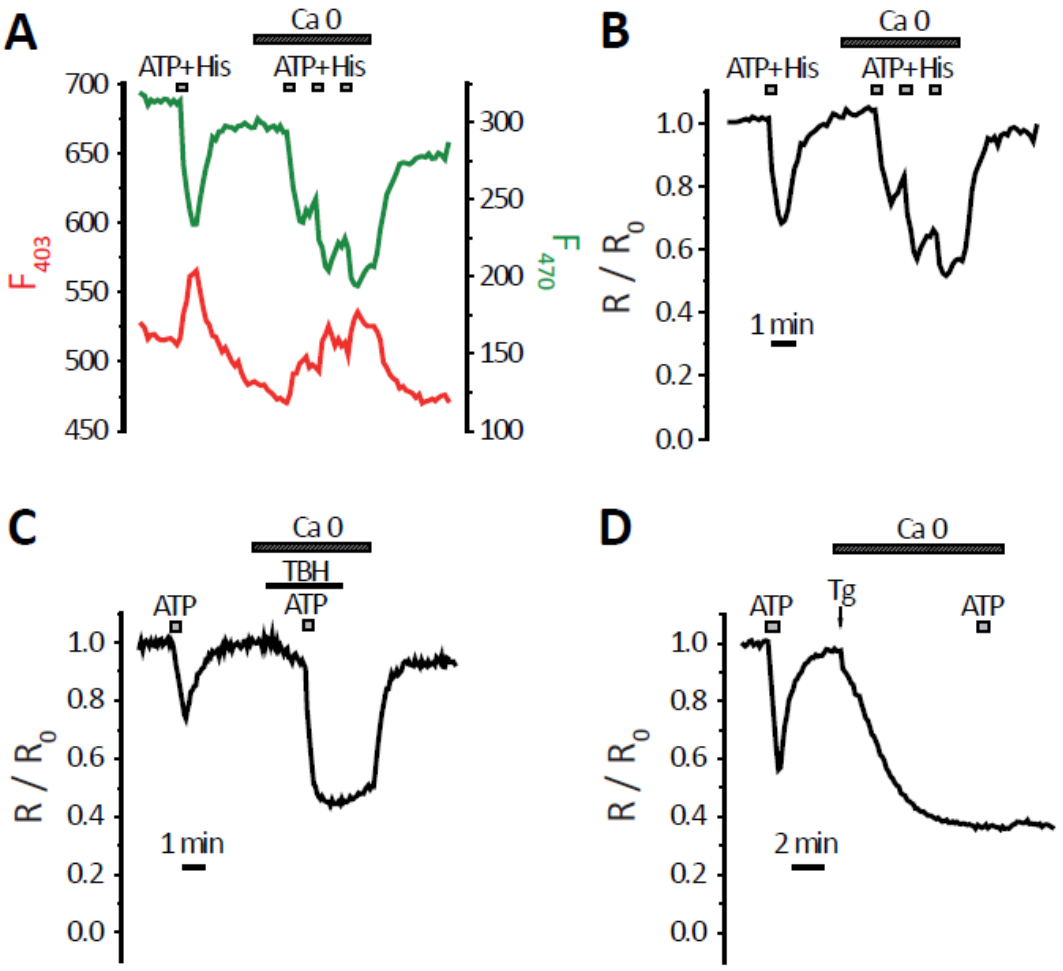

Figura 29. Medidas de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ en células HeLa-erGAP2. Durante estos registros las células fueron estimuladas con ATP (100 μM), o con ATP más histamina (ambas a 100 μM) durante 30 segundos. (A) Las dos longitudes de onda de excitación de erGAP2 (403 y 470 nm) se comportan de forma especular durante los vaciamientos del RE provocados por ATP e histamina. El trazado es la media de 27 células presentes en el mismo campo. (B) Mismo registro que en (A), representando el cociente F_{470}/F_{403} (R), normalizado al dividir por el valor basal (R_0). (C) Al aplicar TBH (10 μM) se produce un lento vaciamiento del RE, y junto con ATP se consigue el vaciamiento completo. El trazado es la media de 23 células en el mismo campo. (D) La tapsigargina (1 μM) también provoca un lento vaciamiento del RE en 8 minutos. El trazado es la media de 37 células presentes en el mismo campo.

En segundo lugar, se probó también el inhibidor irreversible de la SERCA tapsigargina (Tg). La Tg redujo el R/R_0 hasta un 60% (**Figura 29D**), y la adición de ATP 12 minutos después no produjo ninguna reducción adicional de la señal, indicando que el RE se había vaciado completamente durante ese tiempo de incubación con la Tg. Finalmente se volvió a perfundir las células con 1 mM de Ca^{2+}, y como era de esperar, y contrariamente a lo observado con TBH (**Figura 29C**), la readición de Ca^{2+} no indujo recuperación alguna del $[Ca^{2+}]_{ER}$ basal. Este resultado es consistente con al carácter irreversible de la inhibición de la SERCA por tapsigargina.

Tomados globalmente, estos resultados indican que el nuevo sensor erGAP2 mantiene las propiedades de rango dinámico y sensibilidad por Ca^{2+} descritas *in vitro* también en el contexto fisiológico del RE de células de mamífero vivas.

La proteína GAP2 es una sonda localizada en el lumen del RE, por lo que puede combinarse con indicadores de Ca^{2+} sintéticos para hacer registros simultáneos de los cambios de la $[Ca^{2+}]$ en el RE y el citosol. El espectro del sensor GAP (excitación azul y emisión verde) es compatible con el de indicadores como el Rhod (excitación verde, 560 nm, y emisión roja, 580-630 nm), aunque también pueden realizarse medidas simultáneas con el Fura-2 (excitación en ultravioleta, 340 nm y 380 nm; emisión en verde, 530 nm). Para demostrar este punto, se hicieron mediciones de la $[Ca^{2+}]$ en dos compartimentos celulares simultáneamente, RE y citosol, en el clon estable de HeLa que expresa erGAP2, cargado con Rhod-3 o Fura-2.

En la **Figura 30A** se muestra un resultado representativo en células del clon estable erGAP2 cargadas con Rhod-3, a las que se estimuló dos veces consecutivas con una dosis máxima de ATP y carbacol. El carbacol es un agonista colinérgico que se une a los receptores muscarínicos de acetilcolina y activan la ruta de señalización del IP_3 (Short y cols., 2000). La estimulación provocó vaciamientos parciales del RE (trazado verde, bajada de la señal de erGAP2), que, a su vez, aumentan la $[Ca^{2+}]_C$, lo que se refleja en el aumento de la fluorescencia del Rhod-3 (registro rojo). A continuación, este mismo estímulo, ATP con carbacol, se aplicó en presencia de EGTA y el inhibidor reversible de la SERCA TBH (tercer estímulo y siguientes). Esto produjo de nuevo un vaciamiento del RE, y un incremento de la $[Ca^{2+}]_C$ similar a las registradas anteriormente, pero sin

rellenado cuando cesa el estímulo debido a la presencia de TBH, que bloquea la SERCA. Un segundo estímulo en presencia de TBH produjo una nueva liberación, pero la cantidad de Ca^{2+} que se libera es mucho menor, ya que el RE está medio vacío ya. Esto se refleja en los pequeños cambios descendentes de la señal de erGAP2. Dos estímulos adicionales, y uno posterior de cafeína 50 mM, no produjeron mayores cambios de las señales fluorescentes, lo que indica que el RE está completamente vacío a estas alturas ($R/R_0 \approx 0.4$). La reposición del calcio extracelular en este momento indujo un pequeño aumento del Ca^{2+} citosólico, casi imperceptible, debido a la activación de la entrada capacitativa Ca^{2+}. Este Ca^{2+} es captado por el RE, que vuelve a rellenarse, lo que se registra como una recuperación de la señal de erGAP2, que se acerca hacia los niveles de fluorescencia iniciales.

En la **Figura 30B** se muestra un experimento similar en el clon estable de erGAP2, pero cargado con Fura-2 y estimulado con una dosis máxima de ATP. Los resultados son muy similares a los de la **Figura 30A**. En presencia de Ca^{2+} extracelular (primer estímulo), la estimulación provocó un descenso en la F_{470} de erGAP2 y un aumento concomitante del cociente de fluorescencias F_{340}/F_{380} (normalizada como R/R_0) del Fura-2, que indica un aumento de $[Ca^{2+}]_C$ (**Figura 30B**). Estos cambios reflejan liberación del Ca^{2+} desde el RE con descenso de $[Ca^{2+}]_{RE}$ y el consiguiente aumento de $[Ca^{2+}]_C$. A continuación, la adición de TBH en ausencia de Ca^{2+} extracelular indujo una pequeña y lenta disminución en la señal de la $[Ca^{2+}]_{RE}$, que coincidió plenamente con un incremento de la señal del Fura-2, reflejando el lento vaciamiento pasivo del RE con un aumento de $[Ca^{2+}]_C$. La estimulación en este momento con un segundo estímulo de ATP en presencia del inhibidor de la SERCA TBH produjo una rápida y completa reducción de la señal de $[Ca^{2+}]_{ER}$ con un valor de R cercano a 0.5. Este mínimo se mantuvo mientras no se repuso el Ca^{2+} extracelular. Al lavarse la TBH con MEC con 1 mM de Ca^{2+} se produjo la entrada de Ca^{2+} al citosol, el Fura-2 sufrió un pequeño incremento de la señal, y el RE se rellenó rápidamente (**Figura 30B**). El acoplamiento entre la entrada del Ca^{2+} a través de la membrana plasmática y la captación por el RE parece muy eficiente, pues la $[Ca^{2+}]_C$ sube bastante poco. En el experimento anterior (**Figura 30A**) se ve exactamente lo mismo.

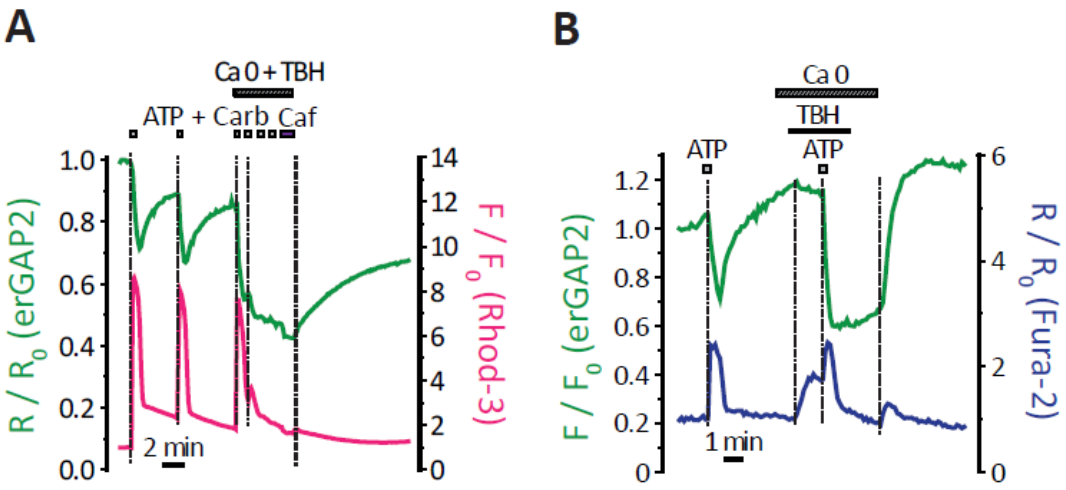

Figura 30. Medidas simultáneas de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ y la $[Ca^{2+}]_C$ en el HeLa-erGAP2. (A) La $[Ca^{2+}]_C$ se midió con Rhod-3. Los trazados son la media de 10 células estimuladas durante 30 segundos con ATP junto con carbacol (100 μM y 10 μM respectivamente) y cafeína (50 mM), en ausencia o presencia de TBH (10 μM). (B) El clon estable HeLa-erGAP2 se cargó con Fura-2, y se registró la fluorescencia a 340 y 380 nm para el Fura-2 y a 470 nm para erGAP2. El trazado es la media de 18 células en el campo, estimuladas durante 30 segundos con ATP (100 μM), en presencia o ausencia de TBH (10 μM).

La coherencia temporal de los cambios de fluorescencia entre los registros de erGAP2 y el de los indicadores sintéticos es una evidencia más del excelente comportamiento de GAP2 como sensor de altas concentraciones de Ca^{2+} en el RE.

4. MODIFICACIONES DE GAP2 DESTINADAS A AUMENTAR SU BRILLO

A pesar del buen comportamiento de GAP2 en cuanto a sensibilidad a Ca^{2+} o Mg^{2+}, al pH y su fotoestabilidad, se observó que la intensidad de fluorescencia había disminuido a las dos longitudes de onda de excitación (403 nm y 470 nm) respecto a GAP o a GAP1. Para ponderar esta disminución se cuantificó la diferencia de fluorescencia en cultivos de células HeLa transfectadas con idéntica cantidad de DNA de erGAP1 y erGAP2 (**Figura 31**) en las mismas condiciones experimentales, tanto en los tiempos de exposición como en los filtros de densidad neutra. Los valores registrados a ambas longitudes de onda se sumaron para compensar los posibles artefactos causados por la variaciones de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ de célula a célula. Se observó cómo la proteína erGAP2 tiene aproximadamente la mitad de fluorescencia que erGAP1.

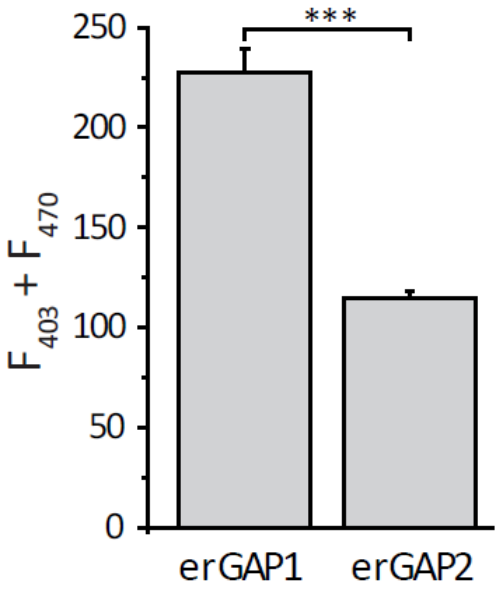

Figura 31. Comparación de la fluorescencia de erGAP1 y erGAP2. Las células HeLa se transfectaron con la misma cantidad de cDNA para cada sensor y se excitaron de forma idéntica. Se sumaron las fluorescencias obtenidas a 403 y 470 nm de excitación. Se muestran valores medio ± ESM de 71-77 células. La fluorescencia de la erGAP2 disminuyó un 50% con respecto a GAP1) (***, $p < 0.001$; test de Mann-Whitney).

Para contrarrestar esta pérdida de fluorescencia se introdujeron en la proteína GAP2 una serie de mutaciones inspiradas en modificaciones descritas previamente para otros sensores de Ca^{2+}. Siguiendo la numeración de la secuencia primaria de la proteína GFP (y no la del erGAP), estas mutaciones son las siguientes:

- L15Q: aumenta el doble la fluorescencia dependiente de Ca^{2+} en el indicador GCaMP (Zhao y cols., 2011).
- T153K: incrementa el rango dinámico (Tian y cols., 2009).
- I167V: aumenta la fluorescencia a 470 nm y disminuye la longitud de onda de emisión (Heim y cols., 1994).
- S175G: mejora la estabilidad de la proteína GFP a 37°C (Siemering y cols., 1996; Tallini y cols., 2006).
- D180Y: aumenta el brillo de la proteína cpGFP (Tallini y cols., 2006).
- A206I: impide la dimerización de la GFP (Zacharias y cols., 2002; Zhao y cols., 2011).

Las mutaciones se generaron mediante mutagénesis dirigida sobre el gen erGAP2 en el plásmido de expresión en eucariotas pcDNA3. El cribado de las 8 mutantes producidas (**Tabla 14**) se realizó directamente *in situ* en el RE de células HeLa transfectadas con cada plásmido y comparándolos con el sensor erGAP2. La sensibilidad a Ca^{2+} se comprobó mediante un experimento de imagen, un protocolo consistente en un estímulo de ATP en presencia de calcio extracelular, y un vaciado completo del RE con un estímulo de ATP en presencia de EGTA y TBH, similar al mostrado en la **Figura 29C**. Todas las mutantes tenían mayor fluorescencia respecto a erGAP2, pero como puede apreciarse en la Tabla 14, solo dos, las mutantes 5 (llamada erGAP3.5) y 7 (llamada erGAP3.7) eran sensibles a Ca^{2+}.

	MUTACIÓN						Sensibilidad a Ca^{2+}
Mutante	**S175G**	**D180Y**	**I167V**	**L15Q**	**A206I**	**T153K**	
1	X	X		X	X		✗
2	X	X	X	X	X	X	✗
3	X	X	X	X	X		✗
4	X	X	X	X	X	X	✗
5	X	X	X	X		X	✓
6	X	X	X		X		✗
7	X	X	X	X			✓
8			X	X	X		✗

Tabla 14. Mutantes de la erGAP2. Se obtuvieron 8 versiones diferentes surgidas de dos reacciones de mutagénesis, de las cuales sólo dos eran sensibles a Ca^{2+}. La versión 4 tenía una mutación espontánea adicional, la T50K.

Es interesante observar que todas las mutantes insensibles a Ca^{2+} contenían la mutación A206I, lo cual sugiere que este aminoácido podría participar en la emisión de fluorescencia dependiente de Ca^{2+}. Para verificarlo, se introdujo la mutación A206I en el gen GAPwt, se produjo la proteína recombinante GAP^{A206I} en *E. coli*, y se determinó el espectro de excitación de la fluorescencia entre 380 nm y 500 nm, con la emisión fijada a 520 nm. Como se había previsto, la mutación eliminaba la sensibilidad a Ca^{2+} de GAPwt, de tal forma que su espectro era indistinguible del de la proteína parental GFPuv, como se observa en la **Figura 32**. Este resultado indica que el residuo A206 podría estar implicado directa o indirectamente en el cambio de conformación de GAP inducido por su unión a Ca^{2+}.

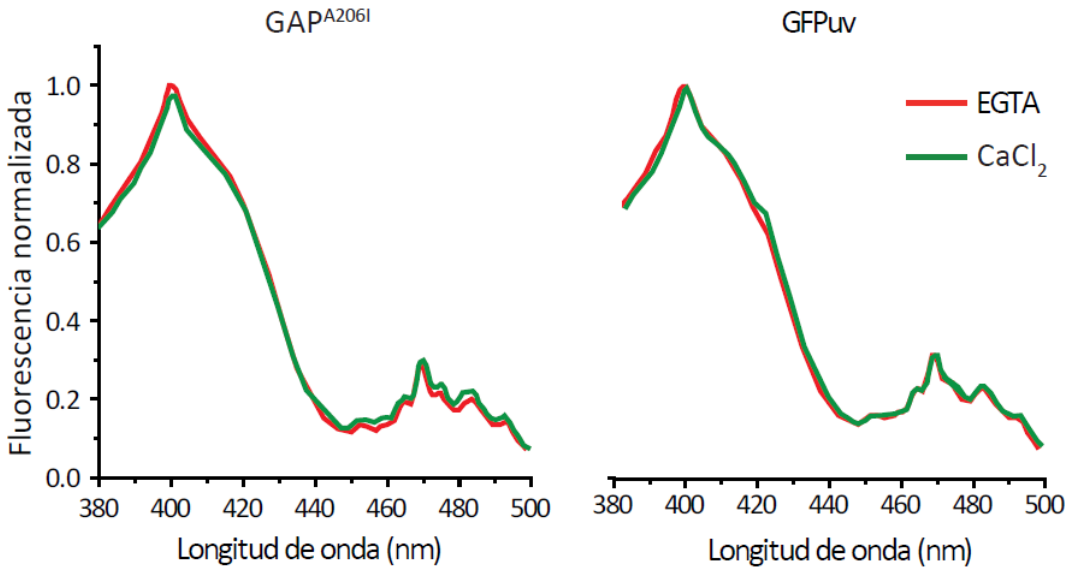

Figura 32. Comparación de los espectros de excitación GAP^{A206I} y de GFPuv. Las medidas se realizaron con 8.5 µg de cada proteína en 1 ml de PBS en presencia de $CaCl_2$ 1 mM (trazo verde) o de EGTA 0.1 mM (trazo rojo). El espectro de GAP con la mutación A206I (panel izquierdo) es insensible a calcio y presenta un espectro idéntico al de la GFPuv (panel derecho), que tiene el mismo aspecto que el de GAP funcional en presencia de EGTA (ver **Figura 21A**).

Quedaban, por tanto, dos mutantes que conservaban la fluorescencia sensible a Ca^{2+}, erGAP3.5 y erGAP3.7. De forma análoga a lo descrito en la **Figura 31**, se comparó la intensidad de fluorescencia de ambas proteínas en condiciones basales, entre sí y con respecto a la proteína parental erGAP2. Los resultados mostrados en la **Figura 33** indican que ambas mutantes incrementaron su brillo, recuperando los niveles de GAPwt, es decir, que contrarrestan la pérdida de brillo al generar GAP2. Los valores de fluorescencia obtenidos para erGAP3.5 y erGAP3.7 fueron significativamente superiores a los de la erGAP2.

A continuación, se comparó directamente el comportamiento de las tres sondas en un experimento funcional de vaciamiento del RE en células HeLa transfectadas y estimuladas con ATP e histamina, con un protocolo experimental similar al descrito previamente en la **Figura 29C** (**Figura 34A**). Como puede observarse en la **Figura 34B**, la mutante erGAP3.5 había reducido a la mitad su rango dinámico, determinado mediante el tratamiento con ATP e histamina en presencia de TBH (vaciamiento total). Por otra parte, la mutante erGAP3.7 mostraba un valor del cociente R/R_0 de 0.5 en el vaciado, similar al de la proteína parental erGAP2, de 0.6.

Estos resultados descartaron la mutante erGAP3.5, y se continuó con erGAP3.7 como siguiente versión, a partir de aquí renombrada erGAP3.

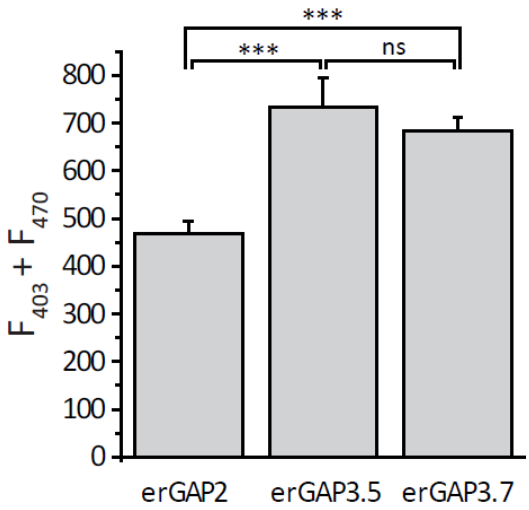

Figura 33. Comparación del nivel de fluorescencia de la erGAP2, erGAP3.5 y erGAP3.7. Se sumaron las fluorescencias obtenidas a 403 y 470 nm de excitación. Se compararon los niveles basales de ambas longitudes de onda en células transfectadas con la misma cantidad de cDNA. Se muestran valores medio ± ESM de 44 (erGAP2), 35 (erGAP 3.5) o 112 células (erGAP3.7) (*** $p < 0.001$; test de Mann-Whitney).

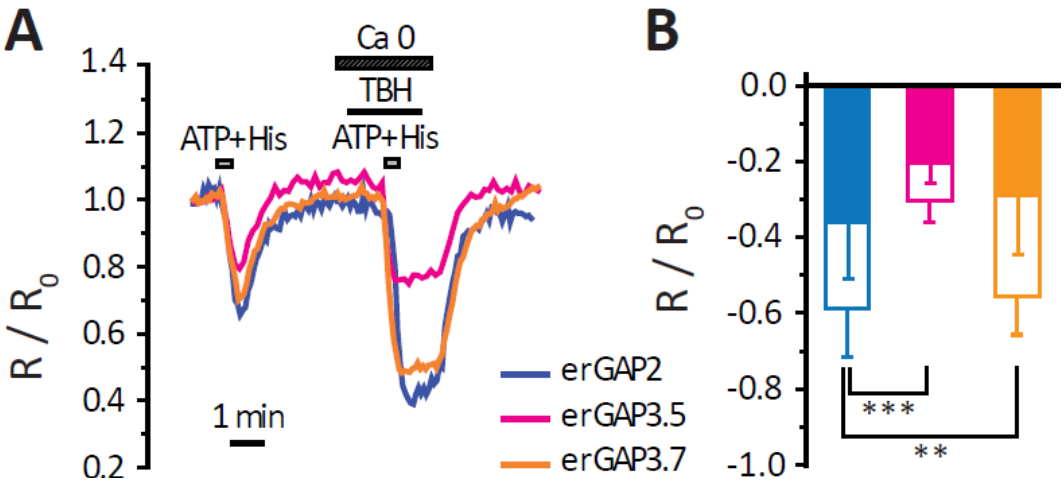

Figura 34. Comparación de las tres GAPs de baja afinidad. (A) Trazados medios de tres experimentos idénticos realizados con células transfectadas con erGAP2, erGAP3.5 y erGAP3.7, y estimuladas con ATP junto con histamina (100 µM cada una) durante 30 segundos, en ausencia o presencia de TBH (10 µM). (B) Representación de la media ± DSM de la bajada del cociente F_{470}/F_{403} (R), normalizada entre 0 y 1 dividiéndolo por dicho cociente en condiciones basales (R_0) tanto con el vaciado parcial (rectángulo de color) como con el total (rectángulo en blanco). Se representa la media de 23 células para erGAP2, 18 células para erGAP3.5 y 27 para erGAP3.7 (estadística realizada con el test de Kruskal-Wallis; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

5. CARACTERIZACION DE GAP3

De forma análoga a como se ha hecho con GAP2, y para facilitar la caracterización del nuevo sensor en el RE se generó un clon estable de erGAP3 en células HeLa, llamado HeLa-erGAP3, con el que se realizaron los experimentos de rutina.

En primer lugar, se confirmó la correcta localización del sensor en el RE mediante una inmunofluorescencia, marcando el RE con un anticuerpo anti-SERCA, y el núcleo con DAPI. Como se observa en la **Figura 35A**, la proteína erGAP3 se excluye del núcleo y colocaliza con el marcador del RE. Además se confirmó que la proteína erGAP3 tenía el tamaño teórico esperado y estaba íntegra, mediante western blot revelado con un anticuerpo específico anti-GFP (**Figura 35B**).

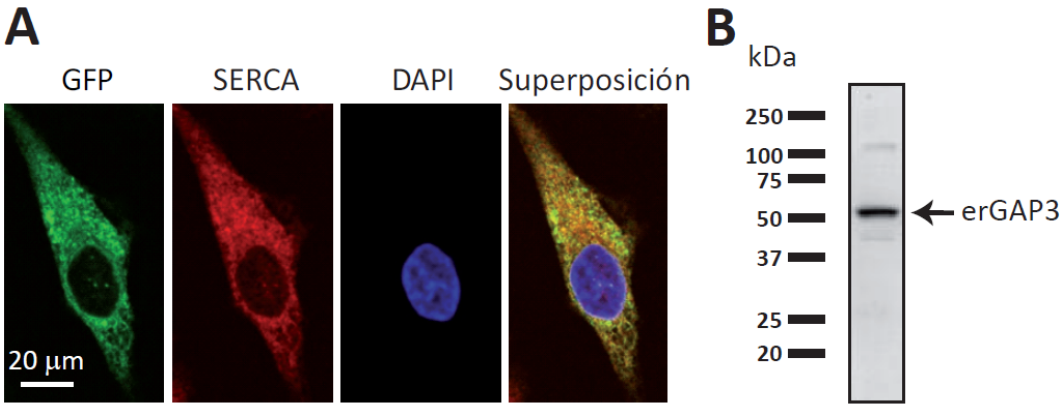

Figura 35. Clon estable HeLa-erGAP3. (A) Inmunofluorescencia realizada sobre células del clon estable sembrado en cristales de 12 mm. De izquierda a derecha está la foto de de la proteína erGAP3, el marcaje del RE con anti-SERCA, el núcleo contrateñido con DAPI, y la superposición de las tres fotos. (B) Western blot del extracto celular total del clon estable revelado con anti-GFP.

En segundo lugar se comprobó la fotoestabilidad de erGAP3, que fue similar a la obtenida con erGAP2 (**Figura 27**). En un experimento representativo se observó que a las dos longitudes de onda de excitación hay una lenta y pequeña reducción en la intensidad de fluorescencia en los 3 primeros minutos, siendo ésta algo más pronunciada a 405 nm (**Figura 36A**). Sin embargo, el cociente de las dos fluorescencias individuales corrige estas pequeñas variaciones, observándose un aumento de R/R_0 del 10% en 20 minutos (**Figura 36B**).

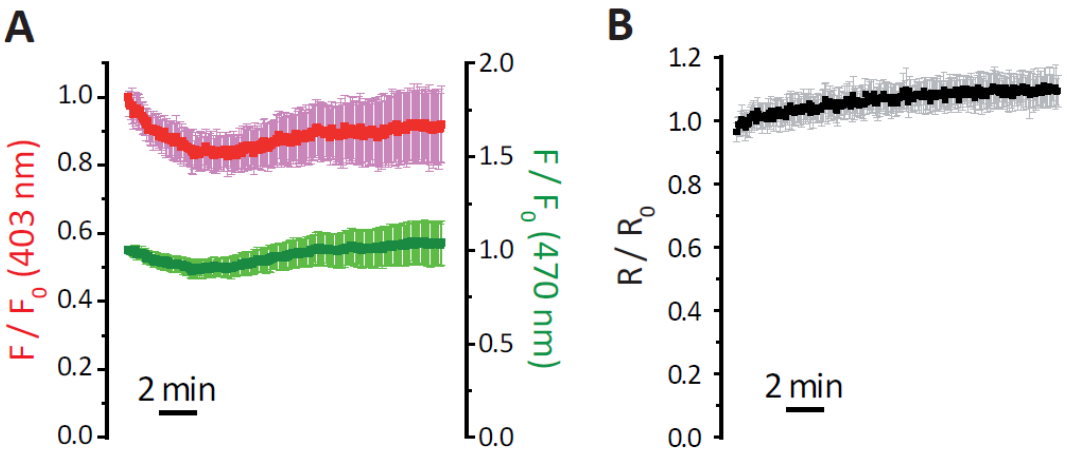

Figura 36. Fotoestabilidad de erGAP3. (A) Representación de un experimento de células HeLa transfectadas con pcDNA3.erGAP3. En rojo se representa la fluorescencia a 403 nm de 33 células, y en verde la media de la fluorescencia de las mismas células a 470 nm. Ambas fluorescencias están normalizadas dividiendo por F_0. (B) Cociente F_{470}/F_{403} normalizado. Estos trazos son la media ± DSM de 33 células.

5.1. ESPECTRO DE FLUORESCENCIA

En segundo lugar, aunque ya se había probado que el nuevo sensor GAP3 era sensible a Ca^{2+}, se quiso comprobar si se habían modificado las características espectrales, dado que se habían introducido varias mutaciones en el dominio de la GFP. A partir de un extracto total del clon estable HeLa-erGAP3 se realizó el espectro de fluorescencia de excitación.

En la **Figura 37** puede observarse que se mantienen los dos máximos de excitación a 405 y 470 nm, aunque el segundo (a 470 nm) es mayor que el primero (a 405 nm), al contrario de lo que pasaba en las versiones anteriores a erGAP3. También se observa la sensibilidad a Ca^{2+}, al disminuir la fluorescencia a 405 nm y aumentar a 470 nm en presencia de Ca^{2+}. El espectro de emisión (resultado no mostrado) mantenía su máximo a 510 nm, análogo al mostrado en la **Figura 21B**. De forma pareja a como se ha descrito previamente para GAP2, a partir del R_{max}/R_{min}, se calculó el rango dinámico, que resultó en 2.1, un valor algo inferior que el obtenido para GAP2, de 2.6.

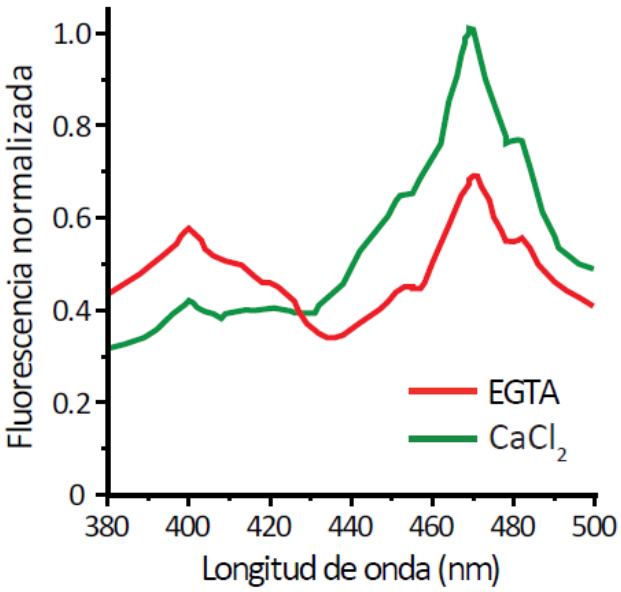

Figura 37. Espectros de excitación de erGAP3. Las medidas se realizaron con 200 µl aproximadamente del extracto celular en un medio de KCl 140 mM, $MgCl_2$ 1 mM y MOPS pH 7.2 20 mM, en ausencia de Ca^{2+} (con EGTA 0.1 mM, trazo rojo) o en presencia de Ca^{2+} 10 mM (trazo verde). El pico de excitación a 470 nm emite mayor fluorescencia en comparación con las versiones anteriores (ver **Figuras 13** y **21**).

5.2. CALIBRACION *IN VITRO* E *IN SITU*

En tercer lugar, se comprobó que la afinidad de GAP3 no había cambiado respecto a la de GAP2 después de incluir las mutaciones en la GFP, para lo cual se calibró tanto *in vitro* como *in situ*. Para la calibración *in vitro*, se clonó GAP3 en el vector de expresión bacteriano pET28a; posteriormente, éste se transformó en la cepa bacteriana BL21, y la proteína se indujo y se extrajo utilizando el mismo procedimiento que para GAP2 (véase Materiales y Métodos). La calibración del extracto bacteriano se realizó en el siguiente medio: KCl 140 mM, $MgCl_2$ 1 mM, MOPS 20 mM, pH 7.2, con distintas concentraciones de Ca^{2+}. Los resultados se muestran en la **Figura 38A**, donde también se comparan con los obtenidos para GAP2. Tras el ajuste a la ecuación de Hill, los parámetros obtenidos para la proteína GAP3 fueron: Vmax = 1; K_d = 489 ± 43 µM y n = 0.9 ± 0.1 (media ± DSM). Como puede observarse a partir de estos datos, los parámetros cinéticos de GAP3 son muy similares a los obtenidos para GAP2.

A continuación, se realizó la calibración *in situ* de erGAP3 en experimentos de célula única, siguiendo el mismo protocolo que para erGAP2 (ver **Figura**

28). Los resultados se muestran en la **Figura 38B**. Los valores de fluorescencia a 403 nm y 470 nm se normalizaron y se obtuvieron los cocientes, que se ajustaron a la ecuación de Hill. Los valores estimados para los parámetros cinéticos de GAP3 fueron (media ± DSM): K_d = 540 ± 80 µM, V_{MAX} = 1, y n 0.85 ± 0.1. Estos resultados son muy parecidos a los obtenidos con el extracto bacteriano.

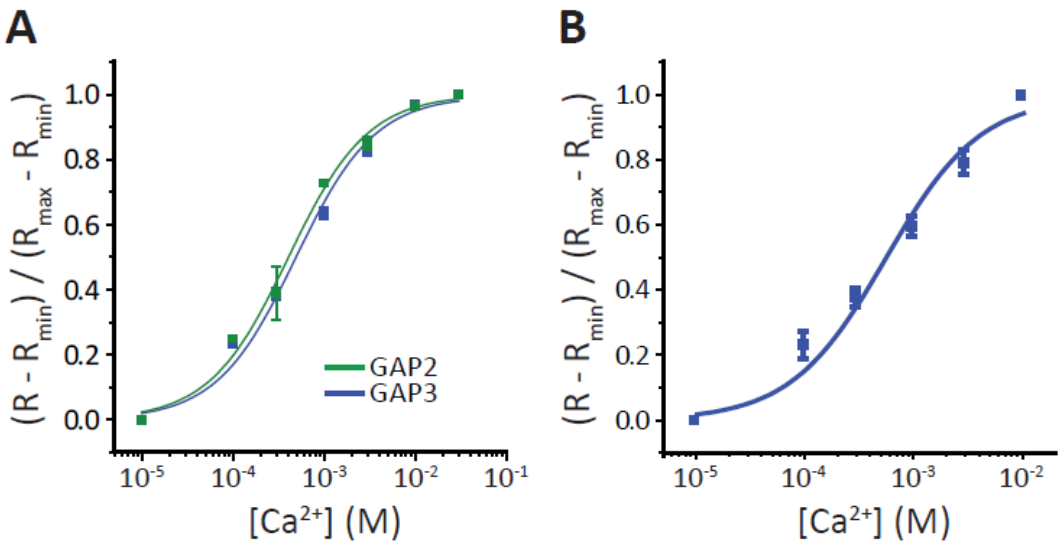

Figura 38. Calibración de GAP3 *in vitro* e *in situ*. (A) Calibración *in vitro* de GAP2 y GAP3. En cada muestra se añadieron 3.5 µg de la proteína erGAP3 (trazo azul) en medio conteniendo, KCl 140 mM, $MgCl_2$ 1 mM y MOPS, pH 7.2. Cada punto representa la media ± DSM de tres valores. (B) Procedimiento como en la **Figura 28**. Se representan los cocientes de F_{470} / F_{403} (R) normalizados. Cada punto representa la media ± DSM de 9 células. La línea se ajustó a la ecuación de Hill. Ver valores de los parámetros cinéticos en el texto.

5.3. COMPARACION DE erGAP1, erGAP2 Y erGAP3

En la **Figura 39** se muestra el comportamiento en un experimento de imagen de las dos sondas desarrolladas en esta tesis, erGAP2 y erGAP3, con su predecesora, la proteína erGAP1, también de baja afinidad. Para ello se transfectaron las células HeLa con cada uno de los tres genes expresados en el plásmido pcDNA3. El protocolo utilizado fue similar a los mostrados previamente (**Figura 34**). Se estimuló con ATP y carbacol, primero en medio estándar conteniendo 1 mM Ca^{2+}, lo que originó un vaciamiento parcial, y luego en medio sin Ca^{2+} y con TBH para vaciar completamente el RE. Como puede apreciarse, aunque la liberación máxima fue similar con los 3 sensores (segundo estímulo), erGAP1 apenas

registró la liberación submáxima, mientras que sí se evidencia perfectamente con erGAP2 o erGAP3 (**Figura 39A**). En la **Figura 39B** se muestra la estadística de varias células. Para cada sensor se ha estimado célula a célula el vaciamiento parcial aparente durante el primer estímulo (ΔR_{est}) y se ha dividido por el vaciamiento total (ΔR_{min}), de modo que los valores oscilan entre 0 (no vaciamiento) y 1 (vaciamiento completo). El vaciamiento aparente estimado por erGAP2 y erGAP3 fue mucho mayor que el indicado por GAP1, y las diferencias fueron altamente significativas ($p<0.001$), indicando que los nuevos sensores son mucho más ventajosos para monitorizar fielmente $[Ca^{2+}]_{ER}$. No hubo diferencias significativas en este aspecto entre GAP2 y GAP3, por lo que ambas se usaron casi intercambiablemente en algunos de los experimentos que se describen a continuación.

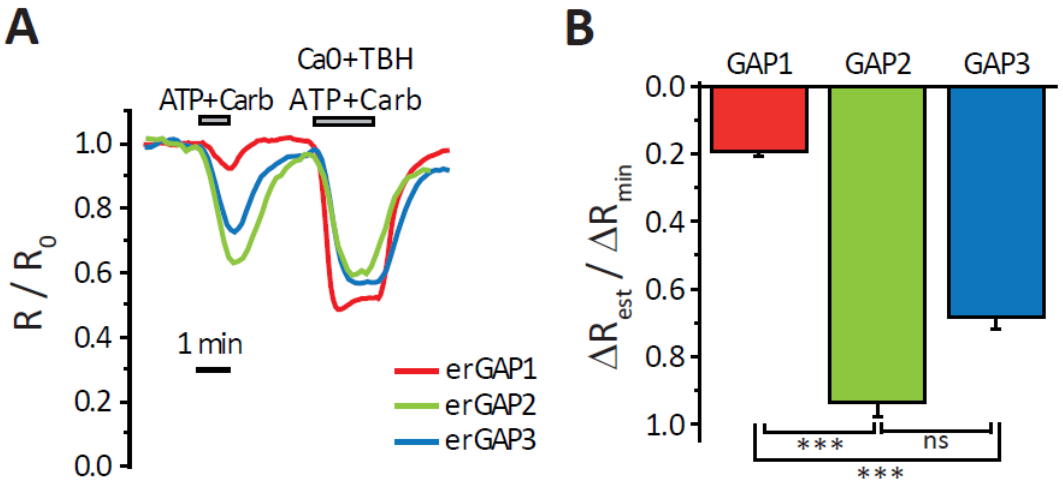

Figura 39. Comparación de erGAP1, erGAP2 y erGAP3. (A) Se representa el cociente F_{470}/F_{403} (R) normalizado con respecto al nivel basal (R_0) para las tres sondas expresadas en células HeLa. Se indujo un vaciado parcial perfundiendo durante 1 minuto ATP junto con carbacol (100 μM y 10 μM, respectivamente) y un vaciado total con los mismos estímulos en presencia de EGTA (0.5 mM) y TBH (10 μM) durante 2 minutos. (B) Vaciamiento aparente, estimado de la disminución de la fluorescencia ($\Delta R/R_0$) durante el vaciado parcial normalizada con respecto al vaciado total (1 = vaciado total; 0 = No vaciamiento). Los valores se expresan como medias ± ESM. Número de células analizadas: n = 30 para erGAP1; n = 8 para erGAP2; n = 16 para erGAP3. Estadística realizada con el test de Kruskal-Wallis (***, $p < 0.001$; ns, no significativo).

6. EXPRESION DE GAP3 EN EL APARATO DE GOLGI

Esta tesis está centrada en el RE, que es el principal depósito de Ca^{2+} en las células animales. Sin embargo no es el único orgánulo con una alta concentración de este ión, ya que el aparato de Golgi también lo almacena a altas concentraciones (Lissandron y cols., 2010). Por este motivo, decidimos realizar una prueba de concepto para ver si los nuevos sensores serían también útiles para estudiar el funcionamiento del aparato de Golgi. GAP3 se expresó en esta organela mediante la fusión en su extremo N-terminal del péptido señal de la galactosiltransferasa humana II, una proteína marcadora del trans-Golgi (Llopis y cols., 1998). En la **Figura 40** se muestra un esquema del gen resultante, denominado tgoGAP3, que se clonó en el vector pHSV, de relativamente baja expresión, para evitar la localización errónea de la sonda en lugares distintos al aparato de Golgi.

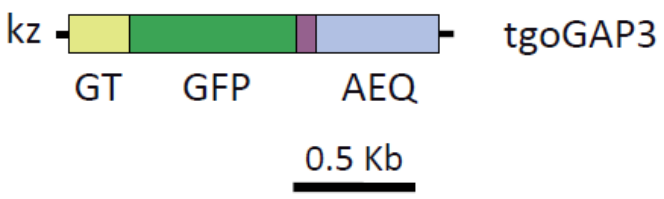

Figura 40. Esquemática de la construcción tgoGAP3. La direccionalidad al aparato trans-Golgi se obtuvo mediante la fusión en el extremo 5' de la galactosiltransferasa humana II (GT). La secuencia consenso Kozak (kz) que facilita su óptima expresión en células de mamífero.

La correcta localización de tgoGAP3 se comprobó mediante una inmunofluorescencia de células HeLa transfectadas de forma transitoria con el plásmido pHSV.tgoGAP3, utilizando un anticuerpo anti-TGN46 (del inglés *trans-Golgi network*), un marcador específico del trans Golgi. Esta zona del aparato de Golgi tiene un aspecto punteado (**Figura 41**), y se localiza mayoritariamente alrededor del núcleo, generalmente de forma asimétrica. Como puede observarse en la imagen de superposición, la localización que presenta la proteína GAP3 en las células HeLa coincide razonablemente bien con el del trans Golgi.

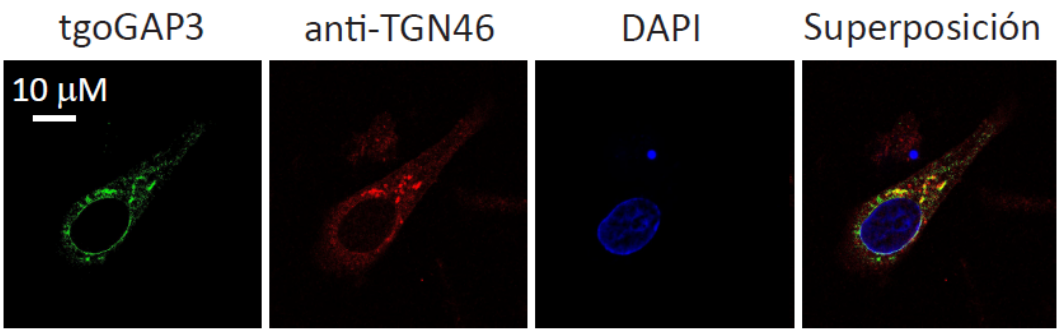

Figura 41. Localización de tgoGAP3. Imagen de fluorescencia confocal de una célula HeLa transfectada con el plásmido pHSV.tgoGAP3 y fijada. En verde, se ve la fluorescencia endógena de la GFP de tgoGAP3; en rojo, aparece la célula marcada con un anticuerpo anti-TGN46, específico del trans-Golgi; en azul aparece el núcleo contra-teñido con DAPI; y en el cuarto panel está la superposición de las tres imágenes. Los píxeles amarillos indican colocalización de GAP3 con el marcaje del trans-Golgi.

A continuación, se hizo un estudio funcional para investigar si GAP3 es capaz de medir la concentración de Ca^{2+} dentro del en el aparato de Golgi ($[Ca^{2+}]_{GO}$) y monitorizar sus cambios fisiológicos. Para ello se realizaron medidas de imagen de fluorescencia en células HeLa transfectadas con el gen tgoGAP3 (**Figura 42**). El protocolo fue similar a los mostrados anteriormente para el RE, en los que se provocaron vaciamientos a través de los canales IP_3R, aunque en el caso del aparato de Golgi, las caídas de fluorescencia no eran tan grandes como en el RE. Probablemente se deba a la menor $[Ca^{2+}]$ que contiene esta organela (Pinton y cols., 1998; Aulestia y cols., 2015).

La $[Ca^{2+}]_{GO}$ basal medida en el trans Golgi de las HeLa fue de 250 ± 38 µM, valor próximo a los referidos en la literatura. También se documenta la rápida caída de la $[Ca^{2+}]_{GO}$ inducida por ATP junto a histamina, que actúan ambos vía producción de IP_3. Puede observarse que el vaciamiento por el agonista fue casi completo. Estos resultados son concordantes con los resultados recientes de nuestro grupo (Aulestia y cols., 2015).

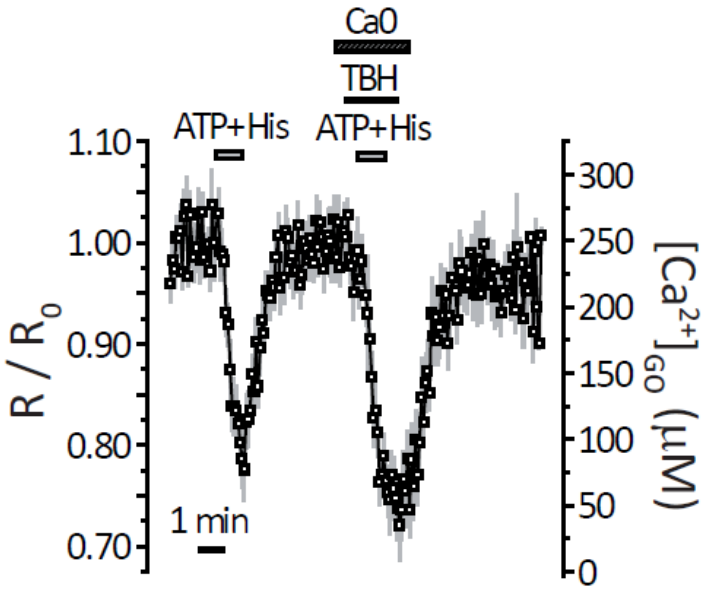

Figura 42. Medidas de la $[Ca^{2+}]_{GO}$ con GAP3 dirigida al aparato de Golgi en HeLa. Las células HeLa se transfectaron con el plásmido pHSV.tgoGAP3. En el eje izquierdo se representa la fluorescencia normalizada como R/R_0, donde R es el cociente F_{470}/F_{403}. Los valores representados son la media ± ESM de 13 células. Las células fueron estimuladas con ATP junto con histamina (100 μM cada uno) en MEC con $CaCl_2$ 1 mM (primer estímulo) o bien en presencia de TBH (10 μM) en MEC sin Ca^{2+} (EGTA 0.5 mM). En el eje derecho se representa la señal calibrada en $[Ca^{2+}]$.

7. MODELOS DE ANIMALES TRANSGENICOS

Una de las principales ventajas de los sensores proteicos es poder generar organismos transgénicos, que permiten realizar experimentos en condiciones lo más fisiológicas posibles. Por esta razón, se crearon animales transgénicos, tanto ratones como moscas, en los que se pudo comprobar, que la expresión del transgén GAP en su genoma era compatible con la vida y no originó alteraciones fenotípicas detectables.

7.1. RATONES TRANSGENICOS

En primer lugar, se resintetizaron los cDNAs de GAP2 y GAP3 para optimizar el uso de sus codones en mamíferos y así mejorar su expresión en el contexto del animal transgénico. Posteriormente, las variantes dirigidas al RE (erGAP2 y erGAP3) se clonaron en un vector de expresión que contiene el promotor de expresión ubicua CAG.

En el caso de erGAP2, de los tres ratones transgénicos positivos analizados por PCR, sólo uno transmitía el transgén por línea germinal, el cual se cruzó con ratones C57BL/6 para crear la línea estable 3 (L3). Los ratones hemicigotos eran fértiles y producían camadas de tamaño y distribución entre sexos normales, y su longevidad también es normal. Los análisis histológicos no revelaron ningún fenotipo discernible asociado con la expresión del reportero de Ca^{2+} GAP. En la **Tabla 15** se tabulan los órganos y tipos celulares donde se expresa el transgén. El análisis se hizo detectando la fluorescencia endógena de la GFP de erGAP2 en secciones fijadas. Como era esperable de un promotor ubicuo, erGAP2 se expresaba en muchos tejidos.

SISTEMA / ORGANO	TEJIDO / TIPO CELULAR
Glándulas adrenales	Corteza de la médula
Hipófisis	Gonadotropas, lactotropas, probablemente otros tipos
Músculo esquelético	Deltoides, abdominales, digitorum brevis, lengua
Oído	Mácula utricular, mácula sacular, órgano de Corti, ampollas de conductos semicirculares
Ojo	Córnea, iris, cristalino, retina
Órgano vomeronasal	
Páncreas	Islotes pancreáticos
Sistema digestivo	Epitelio prismático de la vellosidad intestinal
Sistema nervioso central	Bulbo olfatorio, corteza cerebral, corteza cerebelosa (células de Purkinje), hipocampo
Testículos	

Tabla 15. Expresión del transgén en ratones transgénicos para erGAP2 (L3). Las secciones de los distintos tejidos se analizaron mediante la detección de la fluorescencia endógena de la GFP. Los cortes analizados provenían de ratones de 1 mes de edad, excepto los del hipocampo, que provienen de ratones entre P0 y P15.

En el caso de erGAP3 se obtuvieron dos líneas de ratones transgénicos, las Líneas 1 y 10 (L1 y L10), que se caracterizaron por histología para comprobar la expresión en todos los órganos analizados. Como se observa en la **Tabla 16**, prácticamente la mayor parte de los órganos eran positivos para el transgén en las dos líneas, aunque en algunos casos concretos el patrón de expresión puede ser distinto, como por ejemplo en la hipófisis (ver apartado 8.4).

LÍNEA	SISTEMA / ÓRGANO	TEJIDO / TIPO CELULAR
L1, L10	Aparato digestivo	Estómago, epitelio prismático de la vellosidad intestinal, glándula salivar
L1, L10	Aparato respiratorio	Tráquea, pulmón
L1, L10	Bazo	Cápsula conjuntiva, vasos sanguíneos, células inmunitarias
L1, L10	Corazón	Endocardio (L1)
L1, L10	Glándula adrenal	Corteza
L1, L10	Hipófisis	Adenohipófisis; pars intermédia
L1, L10	Músculo esquelético	Cuádriceps, recto abdominal, lengua
L1, L10	Ojo	Córnea, cristalino, cuerpo ciliar, retina, nuclear interna
L1, L10	Páncreas	Islotes pancreáticos
L1, L10	Piel	Folículos pilosos, epidermis, glándulas sebáceas
L1, L10	Riñón	Corteza, médula
L1, L10	Sistema Nervioso Central	Hipocampo, bulbo olfatorio, meninges, células de Purkinje, ependimocitos, motoneuronas, células del asta de la sustancia gris, células de la sustancia blanca
L1, L10	Sistema inmune	Timo, nódulos linfáticos, ganglios linfáticos del cuello
L1	Aparato circulatorio	Endotelio capilar
L1	Glándula lagrimal	
L1	Glándula maxilar	
L1	Glándula parótida	
L1	Sistema Nervioso Periférico	Ganglios de las raíces dorsales, ganglio del trigémino
L1	Útero	Tejido conjuntivo
L10	Epífisis	
L10	Hígado	
L10	Oído	
L10	Sistema nervioso periférico	Ganglio de la raíz dorsal, ganglio del trigémino
L10	Testículos	Espermatogonias, células de Sertori, epitelio, tubos seminíferos, cápsula conjuntiva

Tabla 16. Expresión del trasngén en los ratones transgénicos para erGAP3 (L1 y L10). La Línea 1 fue estudiada con ratones de 3.5 semanas, y la Línea 10 con ratones de 3 semanas; además, el hipocampo se estudió también en ratones de 2.5, 3 y 12 meses; el cerebelo, con un ratón de 2.5 meses; el sistema nervioso periférico, con un ratón de 9.5 meses; el corazón y el oído se estudiaron en ratones P1 y P2. Todas las secciones se analizaron mediante la detección de la fluorescencia endógena de la GFP.

7.2. MOSCAS TRANSGENICAS

Otro modelo animal muy utilizado para estudios de imagen con sensores de Ca^{2+} *in vivo* es la mosca *Drosophila melanogaster*. Con este objetivo se generaron moscas transgénicas de erGAP3, expresada bajo el sistema GAL4/UAS, que permite la expresión del transgén en tejidos u órganos específicos. En esta tesis se presentarán únicamente los datos funcionales obtenidos con la línea de erGAP3 en músculo estriado (ver apartado 8.6).

8. PRUEBAS DE CONCEPTO DEL FUNCIONAMIENTO DE erGAP3 EN DISTINTOS SISTEMAS BIOLOGICOS

Los animales transgénicos se crearon para demostrar que erGAP3 es un sensor útil para medir en condiciones lo más fisiológicas posibles. Para ello, en lugar de hacer un estudio exhaustivo de un sistema en particular, se examinó en varios modelos dispares entre sí, como las células del sistema inmune, células y tejidos del sistema nervioso y el endocrino, y en el músculo estriado intacto *in vivo*. El objetivo era verificar que los nuevos sensores de Ca^{2+} eran adecuados para abordar problemas fisiológicos variados, pero sin intentar entrar en el detalle, que queda relegado para un estudio posterior. A continuación, se muestra la descripción de los resultados en el siguiente orden: 1) cultivos primarios, 2) tejidos intactos *ex vivo*, y 3) medidas *in vivo* en el animal entero; es decir, de las mediciones menos fisiológicas a las más fisiológicas.

8.1. MEDIDAS DE LA $[Ca^{2+}]_{ER}$ *IN VITRO* EN MONOCITOS DE RATON

Entre los tejidos y órganos que analizamos para caracterizar las dos líneas transgénicas de ratones erGAP3, se observó que en el bazo había células positivas para GFP. Debido al gran interés de las células inmunitarias, se amplió la observación inicial y se hizo un estudio funcional elemental, que se describe a continuación.

En primer lugar, se caracterizaron mediante citometría de flujo los tipos celulares que expresaban erGAP3. Se usó una batería de anticuerpos específicos para distintos tipos de células inmunitarias: CD3 para linfocitos T, CD4 para linfocitos T helper, CD19 para linfocitos B, CD11b para monocitos y macrófagos y CD11c para células dendríticas. Se realizó un marcaje doble en ratones normales y transgénicos: en un canal se detectó la fluorescencia verde endógena de la proteína erGAP3, y en el otro canal

la fluorescencia amarilla o roja de los marcadores específicos de los distintos tipos celulares. Los resultados indicaron que las células que expresan los antígenos CD3, CD4, CD11c y CD19 eran negativas para erGAP3, mientras que las positivas para CD11b sí expresaban la fluorescencia verde. Se concluyó, por tanto, que las células que expresaban el sensor eran los monocitos, mientras que las células dendríticas y los linfocitos T no expresaban el sensor. En la **Figura 43** se muestran los resultados de la citometría de flujo, donde se representa la intensidad de la fluorescencia verde de la GFP (en las abscisas) frente a la intensidad de la fluorescencia roja del anticuerpo anti-CD11b acoplado a aloficocianina (en las ordenadas). Se compararon las células de bazo aisladas de un ratón normal y un ratón transgénico. En el primer caso, un 15% de las células emiten fluorescencia debido al marcaje con el anticuerpo anti-CD11b, indicando que son monocitos, pero ninguna célula presentaba fluorescencia para la GFP, lo cual era previsible ya que el ratón normal no expresa erGAP3 ni otras proteínas fluorescentes verdes. En el segundo caso, hay un 13% de la población que emite fluorescencia debido al marcaje de los monocitos (CD11b), pero este grupo de células está desplazado ahora hacia la derecha en el eje de las abscisas, indicando que también emiten la fluorescencia verde de la GFP. El grupo que expresa la fluorescencia verde supone el 15.5% de la población celular, lo que coincide con la fracción de monocitos. Son, por tanto, únicamente los monocitos los que expresan erGAP3. El recuadro en la **Figura 43B** corresponde a la población doblemente positiva para CD11b y erGAP3 del ratón transgénico, que no existe en el ratón de tipo salvaje C57BL/6 (**Figura 43A**).

Con el objetivo de confirmar funcionalmente estos resultados se decidió estudiar las respuestas de erGAP3 a la activación con varios agonistas en monocitos de ratón. Para ello se llevaron a cabo cultivos primarios de las células extraídas del bazo de un ratón transgénico. En estos cultivos la mayor parte de las células adheridas a la placa eran positivas para erGAP3 (no mostrado). En la **Figura 44A** se muestran imágenes de microscopía confocal de una célula típica contrateñida con DAPI. Estas células presentaron la morfología típica de los monocitos, con grandes vesículas citosólicas que excluyen la fluorescencia verde en su interior. El sensor erGAP3 se expresa en todo el citosol y está excluida del núcleo y de las vesículas citosólicas, patrón característico de la localización en el RE.

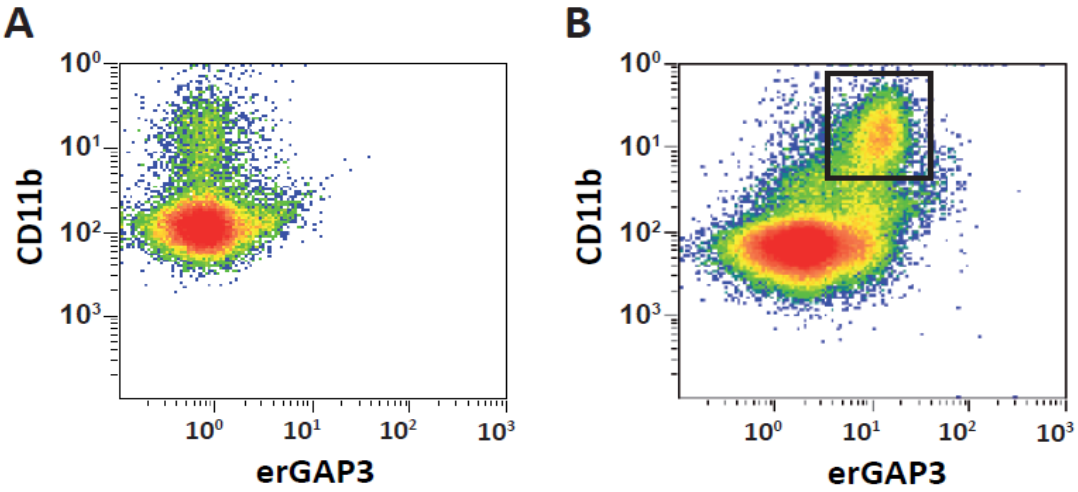

Figura 43. Citometría de flujo de las células del bazo de ratón. El gráfico (A) es de un ratón de tipo salvaje y el gráfico (B) es de ratón transgénico de la Línea 1. Se representa la fluorescencia de la GFP (verde) en el eje de las abscisas frente al marcaje con anti-CD11b (rojo) de las células en el eje de las ordenadas. En el recuadro se enmarcan los monocitos, positivos para CD11b y erGAP3.

Se ensayaron los efectos de varios agonistas potenciales sobre $[Ca^{2+}]_{RE}$, monitorizado por los cambios de la fluorescencia de erGAP3 (**Figuras 44B** y **44C**). Los monocitos fueron estimulados con los siguientes estímulos: lipopolisacáridos (LPS) a 10 μg/ml, carbacol a 10 μM, histamina a 100 μM, ATP a 100 μM y cafeína a 50 mM. Como puede observarse, la cafeína fue, con mucho, el estímulo más eficaz. Provocó un gran descenso de la $[Ca^{2+}]_{RE}$, que recuperó los niveles basales tras el lavado del estímulo. El mismo estímulo dado conjuntamente con el inhibidor TBH para obtener un completo vaciamiento provocó una liberación máxima, un poco mayor que la obtenida por la cafeína sola. En la **Figura 44B** se muestra a la derecha una escala calibrada en $[Ca^{2+}]_{RE}$, donde puede apreciarse que el nivel de reposo está entre 150 y 200 μM, aunque existe una gran dispersión. La media ± DSM de 37 células fue de de 160 ± 7 μM. El resto de los agonistas, incluyendo el LPS, fueron muy poco eficaces lo que sugiere que la liberación de calcio del RE es, en estos casos, muy reducida (**Figura 44C**). No obstante, la estimulación con ATP en presencia del inhibidor de la SERCA TBH (último estímulo en el trazado) puso de evidencia un sustancial descenso de $[Ca^{2+}]_{ER}$ en las tres células estudiadas.

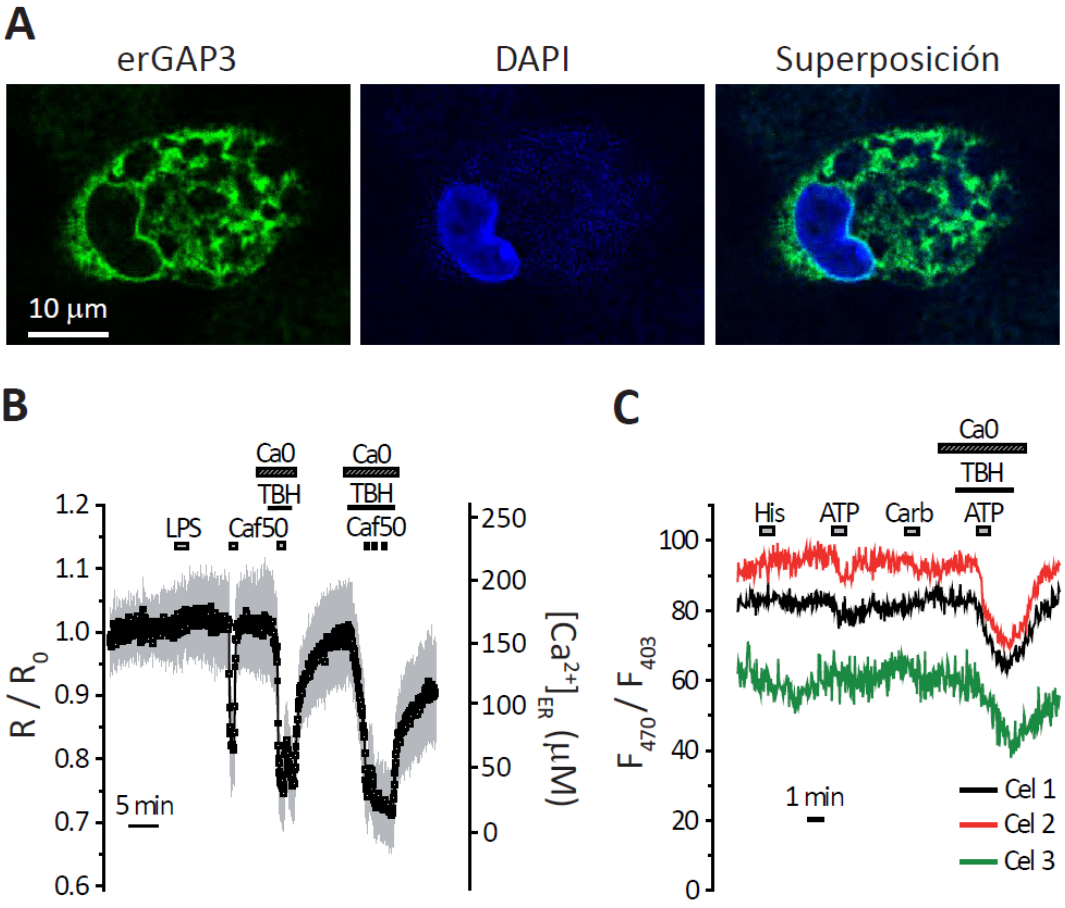

Figura 44. Expresión funcional de erGAP3 en monocitos aislados a partir de ratón transgénico. (A) Imagen de microscopía confocal de una célula típica; en el panel de la izquierda se observa la expresión de erGAP3, y en el panel central la contratinción nuclear con DAPI; en el panel de la derecha se muestra la superposición de las dos imágenes. (B) Medida de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ con erGAP3 a partir experimentos de imagen de célula única en el que se representa la media ± DSM de 51 células, cuya señal se ha normalizado entre 0 y 1 al dividir el cociente F_{470}/F_{403} (R) entre R_0, y se ha calibrado a $[Ca^{2+}]_{RE}$ (escala a la derecha). Los monocitos fueron estimulados con lipopolisacáridos (10 µg/ml) durante 2 minutos y cafeína (50 mM) durante 30 segundos en presencia o ausencia de TBH (10 µM). (C) Representación del cociente de F_{470}/F_{403} de tres monocitos estimulados durante 1 minuto con histamina (100 µM), ATP (100 µM), carbacol (10 µM) y ATP en medio sin Ca^{2+} y con TBH (10 µM).

8.2. MEDIDAS DE $[Ca^{2+}]_{RE}$ *IN VITRO* EN NEURONAS Y GLIA DE HIPOCAMPO EN CULTIVO PRIMARIO

Los experimentos se realizaron en cultivos mixtos que contenían tanto neuronas como glía procedentes del hipocampo del ratón transgénico erGAP2 (L3) y mantenidas en cultivo durante una semana (ver Materiales y Métodos). Se estimularon con el neurotransmisor glutamato (20 µM) o

con cafeína (20 y 50 mM) sola o junto con TBH para vaciar completamente el RE. La **Figura 45A** muestra una imagen de fluorescencia representativa, en la que se distinguen bien las neuronas y las glías por su morfología. Estas últimas, mayoritariamente astrocitos, aparecen ligeramente desenfocadas. Puede observarse que tanto las neuronas como la glía expresan bien erGAP3. El glutamato tuvo un efecto variable en las neuronas: en la **Figura 45B** se muestra una que responde con un gran vaciamiento y dos con respuestas muy pequeñas. En promedio de 20 células analizadas, se obtuvo respuesta en un 89% de las neuronas estimuladas con glutamato. La estimulación con glutamato no tuvo efecto, generalmente, en los astrocitos; en dos glías analizadas no se observó efecto en ninguna.

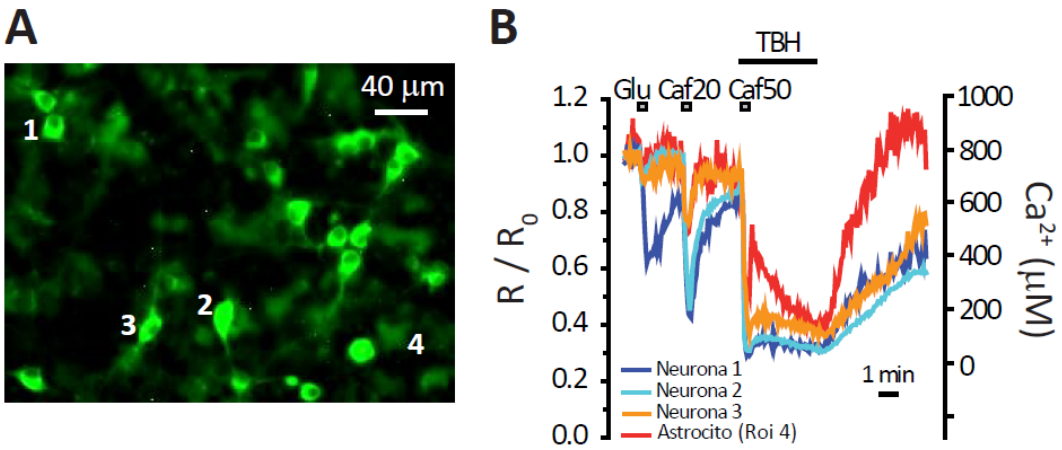

Figura 45. Medidas de $[Ca^{2+}]_{ER}$ en cultivos mixtos de hipocampo de los ratones transgénicos erGAP2. (A) Imagen de fluorescencia con un objetivo 20x de un cultivo mixto disociado de hipocampo. Las células 1 a 3 son neuronas, mientras que la célula 4 es un astrocito. (B) Registro de las células 1-4 descritas en (A), en el que se representa en la barra izquierda el cociente F_{470} / F_{405}, normalizado dividiendo por R_0. Las células fueron estimuladas durante 30 segundos con glutamato (20 µM), cafeína (20 mM), y cafeína junto con TBH (50 mM y 10 µM, respectivamente) para maximizar el vaciado del RE. En la barra derecha aparece una calibración aproximada de la señal fluorescente en $[Ca^{2+}]$.

La cafeína fue, en general, un estímulo eficaz para vaciar de Ca^{2+} el RE, tanto en neuronas como en glías. El 100% de las células testadas (18 neuronas y 2 glías) respondieron a cafeína, aunque el porcentaje de vaciamiento producido fue muy variable. El tratamiento con cafeína 50 mM en presencia de TBH parece bastante eficaz para producir vaciamiento

completo y obtener el valor de R_{min} (0.3 a 0.4, expresado como R/R_0). Utilizando el valor de F_{min} de cada célula, se recalibró todo el experimento en $[Ca^{2+}]_{RE}$. La media de la basal de calcio para 15 neuronas presentes en el campo, fue de 760 ± 60 μM (media ± ESM).

8.3. MEDIDAS DE $[Ca^{2+}]_{RE}$ EN ISLOTES PANCREATICOS *EX VIVO*

Los islotes de Langerhans son las unidades funcionales del tejido endocrino del páncreas, de modo que las respuestas de Ca^{2+}, responsables de la secreción de insulina, suceden simultáneamente en todas las células del islote (Santos y cols., 1991; Valdeolmillos y cols., 1993), por lo que el estudio de los islotes *ex vivo* se aproxima mucho más a la condición fisiológica que los cultivos de células disociadas.

En primer lugar, se comprobó que los islotes pancreáticos de los ratones transgénicos expresaban erGAP3. Para ello, se realizó una inmunofluorescencia sobre islotes fijados. Se utilizaron anticuerpos específicos frente a las tres hormonas principales: glucagón, insulina y somatostatina, que marcan de forma específica las células α, β y δ, respectivamente. La histología se realizó en islotes de ratones transgénicos erGAP3 de la Línea 1 de 25 días de edad. Con la inmunofluorescencia anti-insulina se observó que existe colocalización entre las células que expresan erGAP3 y las células marcadas con el anticuerpo (**Figura 46A**), demostrando que las células β expresan la sonda. Hay algunas células que expresan erGAP3, pero no insulina. Con la inmunofluorescencia anti-glucagón se observó que en algunas células α colocalizaba la señal verde de la GFP con la del marcaje rojo (**Figura 46B**). En el caso de las células δ no se encontró colocalización en el marcaje de la somatostatina y la fluorescencia verde de la GFP, indicando que estas células no expresaban la proteína erGAP3 (resultados no mostrados). Además puede observarse que la localización de erGAP3 estaba excluida del núcleo y era compatible con el RE. No se observan agregados ni acúmulos del sensor.

A continuación se realizaron algunos experimentos preliminares para comprobar la funcionalidad de los islotes del ratón transgénico erGAP3 en lo que se refiere a la regulación de la secreción de insulina. Para ello, se extrajeron los islotes de los páncreas de ratones transgénicos de la Línea 1 (ver Métodos) y se cargaron con Fura-2, para medir simultáneamente la $[Ca^{2+}]_{RE}$ y la $[Ca^{2+}]_C$ (**Figura 47A**). El Fura-2 se carga preferentemente en las

células periféricas del islote, por lo que la mayor parte de la señal citosólica proviene de esta zona. En estos experimentos medimos la fluorescencia de todo el islote, es decir, que la señal proviene mayoritariamente de las células β, ya que son las más abundantes.

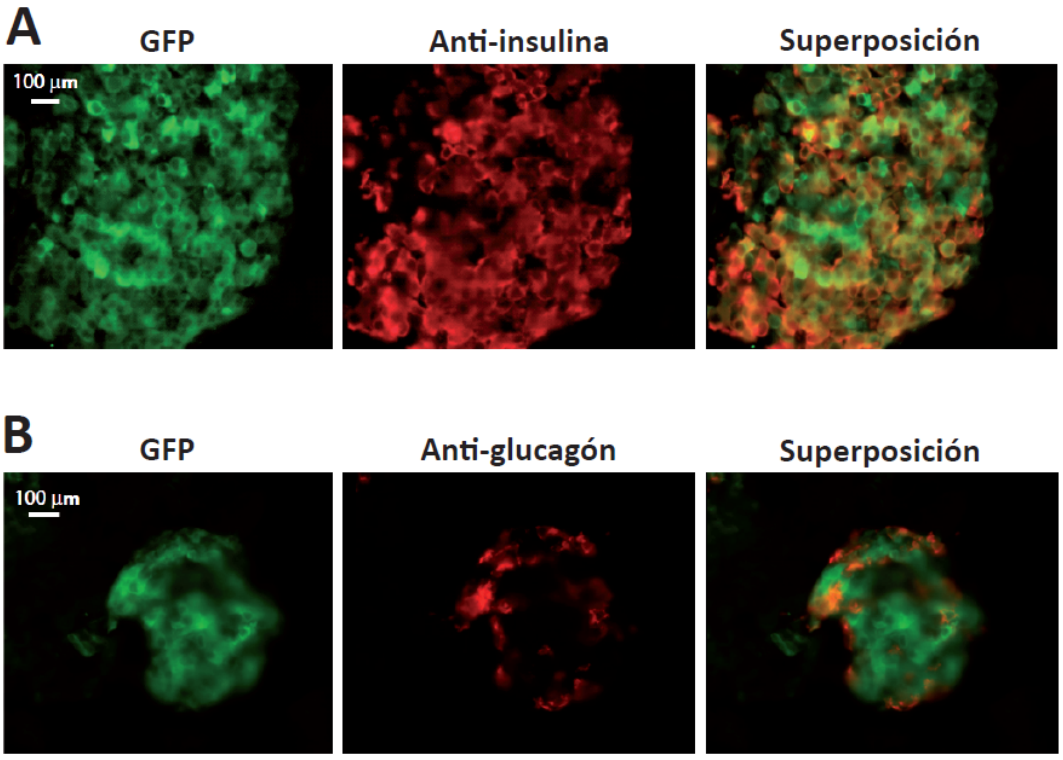

Figura 46. Expresión de erGAP3 en islotes pancreáticos aislados de ratones transgénicos erGAP3 (L1). (A) De izquierda a derecha, aparece la foto de la fluorescencia de la GFP (filtro FITC, tiempo de exposición = 200 ms); marcaje anti-insulina con el fluoróforo AF-568 (tiempo de exposición = 100 ms); montaje de las dos fotos anteriores. (B) De izquierda a derecha, aparece la foto de la fluorescencia de la GFP (filtro FITC, tiempo de exposición = 200 ms); marcaje anti-insulina con el fluoróforo AF-568 (tiempo de exposición = 100 ms); montaje de las dos fotos anteriores.

El paso siguiente fue estimular los islotes con sus estímulos fisiológicos. En el experimento de la **Figura 47B** se perfundió un estímulo inicial de acetilcolina (ACh) en medio de baja glucosa (3 mM) seguido de una perfusión con alta glucosa (9.5 mM). Se representa tanto la fluorescencia de erGAP3 (F_{470}, escala a la derecha) como la fluorescencia del Fura-2, proporcional a la $[Ca^{2+}]_C$ (F_{340}/F_{380}, escala a la izquierda). El estímulo de ACh produjo una discreta disminución de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ acompañada de un aumento de la $[Ca^{2+}]_C$, indicando una relación de causalidad entre la estimulación colinérgica, la liberación de Ca^{2+} del RE (con descenso de la

$[Ca^{2+}]_{RE}$) y el aumento de la señal de la $[Ca^{2+}]_C$. Además, como era de esperar, la TBH potencia el efecto de la ACh provocando vaciamiento completo del RE, como se ve al final del registro. Por otro lado, el paso de baja (3 mM) a alta (9.5 mM) glucosa produjo un pico citosólico transitorio inicial (no acompañado de descenso de la $[Ca^{2+}]_{RE}$) seguido de oscilaciones que se ven tanto en la $[Ca^{2+}]_C$ como en la $[Ca^{2+}]_{RE}$. La disminución de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ no coincide con el aumento de la $[Ca^{2+}]_C$, indicando que el aumento de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ sigue al aumento de la $[Ca^{2+}]_C$ (**Figura 47C**).

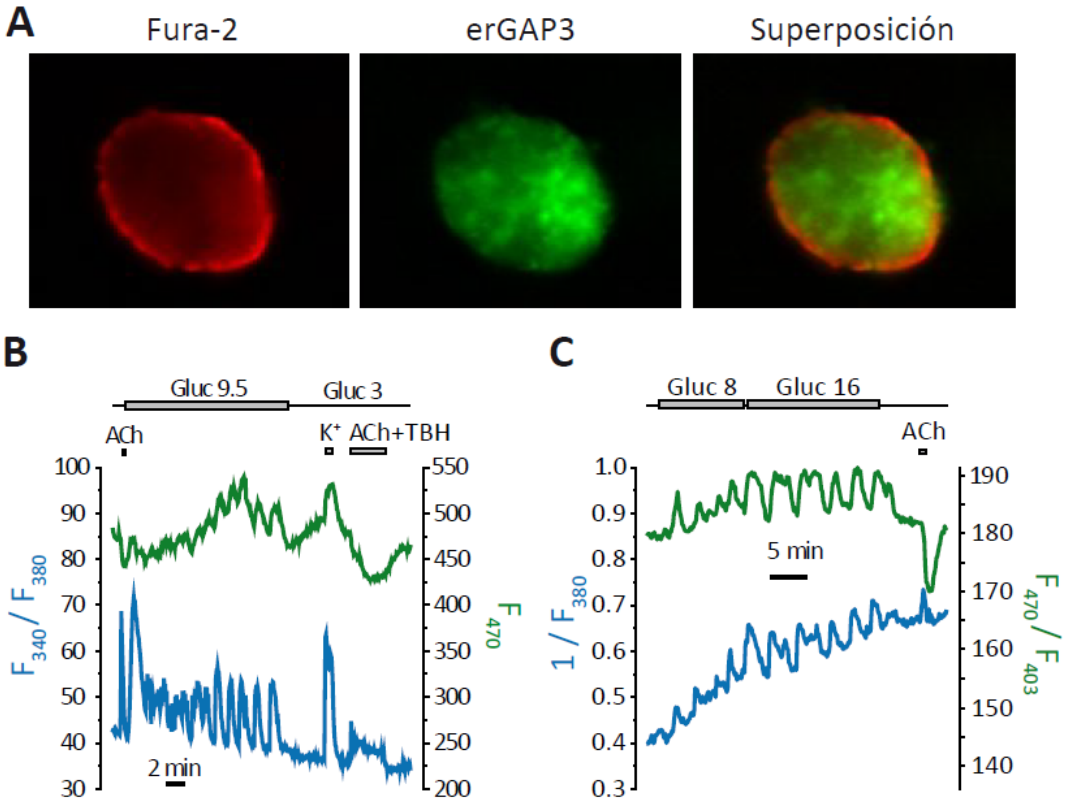

Figura 47. Medida simultánea de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ y $[Ca^{2+}]_C$ en islotes de Langerhans *ex vivo*. (A) Los islotes de obtuvieron de los ratones transgénicos erGAP3 (L1) y se cargaron con Fura-2. En el panel de la izquierda se ve una imagen del islote cargado excitado a 380 nm (el segundo máximo de excitación del Fura-2) en rojo. La mayoría de la fluorescencia se encuentra en las células más superficiales. El panel central es una imagen de la fluorescencia del islote al excitar a 470 nm. La proteína erGAP3 se expresa en casi todas las células, de modo que se ve fluorescencia en todo el islote, aunque pueden apreciarse algunas células individuales. En este caso, la mayoría de la fluorescencia viene del centro, que es donde hay mayor cantidad de células. En el panel de la derecha está la superposición de ambas fotos. (B) y (C) Registros de $[Ca^{2+}]_C$ y $[Ca^{2+}]_{RE}$ (barras izquierda y derecha, respectivamente) de dos islotes diferentes estimulados con glucosa (8, 9.5 y 16 mM), alto K^+ (80 mM) y ACh (10 μM) en presencia o ausencia de TBH (10 μM).

La **Figura 47C** muestra otro ejemplo de oscilaciones de Ca^{2+} inducidas por glucosa, en este caso con el aumento desde 8 a 16 mM. Las oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_C$, que ya existían con glucosa 8 mM, se hacen más intensas. Aparecen entonces oscilaciones también de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ pero, de nuevo, la disminución de $[Ca^{2+}]_{RE}$ no coincide con el aumento de la $[Ca^{2+}]_C$. Una vez más, da la impresión que el incremento de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ sigue al incremento de la $[Ca^{2+}]_C$ (**Figura 47C**). Al final del experimento se muestra una liberación de calcio del RE debida a un estímulo con ACh, evidenciada como un descenso de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ y un aumento de la $[Ca^{2+}]_C$. Sí que parece claro que este neurotransmisor parasimpático actúa aumentando la $[Ca^{2+}]_C$ (y por tanto la secreción de hormona) vía liberación de calcio desde el RE.

El hecho de que el alto potasio no provoque ninguna liberación del Ca^{2+} del RE, sino más bien recaptación, junto el comportamiento del $[Ca^{2+}]_{RE}$ en las oscilaciones, que sigue de forma pasiva al citosólico, parece indicar que no existe el fenómeno CICR en las células β del páncreas.

8.4. MEDIDAS DE LA $[Ca^{2+}]_{RE}$ EN ADENOHIPOFISIS *EX VIVO*

Como se ha señalado en la **Tabla 15**, se observó también expresión de erGAP3 en la adenohipófisis tanto la Línea 1 como la 10 del ratón transgénico. En la Línea 1, prácticamente la totalidad de la células hipofisarias expresaban el sensor, como puede observarse en los paneles de la izquierda en la **Figura 48**. Esto permite la medida de la fluorescencia del órgano completo con el objetivo 5x. Por el contrario, en la Línea 10 (paneles de la derecha) hay un menor número de células positivas, lo que puede ser ventajoso en un experimento de análisis de imagen a nivel de célula única, al tener menor fluorescencia de fondo y distinguirse mejor los límites de cada célula. En las dos imágenes inferiores de la **Figura 48** se aprecia una región menos fluorescente que el resto del órgano (señaladas con puntas de flecha), que corresponden a la parte central de la hipófisis, la neurohipófisis, que no era fluorescente.

A continuación se realizaron experimentos funcionales de imagen en el órgano entero, recién aislado, y perfundido con distintas hormonas liberadoras. Puesto que las células hipofisarias son excitables, también se utilizó un estímulo despolarizante de alto K^+, y por último, se incluyó en el protocolo ATP, que está acoplado a la cascada de IP_3 a través de los receptores P2Y.

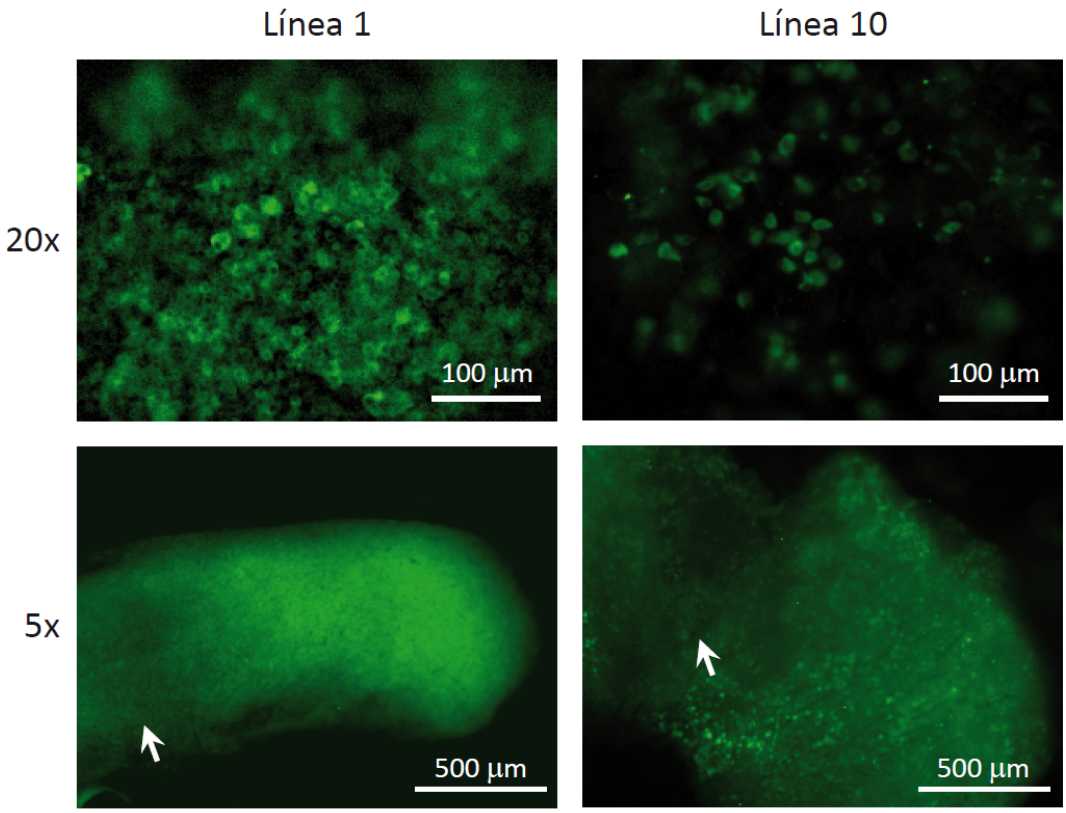

Figura 48. Comparación de la expresión de erGAP3 en las hipófisis de las dos líneas de ratón (L1 y L10). Todas las imágenes se han tomado excitando a 470 nm por el lado ventral de la hipófisis. Las fotos de la izquierda corresponden a la hipófisis de la línea 1 (en estadio P15), y las de la derecha a hipófisis de la línea 10 (la foto superior es de un ratón de 2.5 meses, y la inferior es de un ratón de 2 meses). Las fotos superiores se tomaron con un objetivo 20x, mientras que las de abajo se hicieron con un objetivo 5x.

En la **Figura 49A** se observa un campo de la hipófisis, en el que se han enmarcado tres células representativas con diferentes patrones de respuesta a las hormonas liberadoras. Debido a que la medida se hizo en el órgano entero, muchas de las células aparecen fuera de foco. Se observaron tres patrones principales de respuesta: 1) vaciamiento del RE solo al aplicar TRH (**Figura 49B**); 2) solo al aplicar LHRH (**Figura 49C**) y, 3) en menor medida, también había células que respondían a ambas hormonas (**Figura 49D**). Las monorreceptoriales, que sólo respondían a una hormona, mostraron respuestas más potentes, con vaciamientos de un 30 - 40% respecto a la señal basal; por el contrario, las células polirreceptoriales que responden tanto a TRH como a LHRH muestran solamente un 10% de vaciamiento respecto a la basal. Las frecuencias de las repuestas observadas en 38 células de un mismo campo (situado en la zona central

de la glándula), fueron las siguientes: el 23.1% de las células respondieron a TRH, el 61.5% respondieron a LHRH, y el 15.4% respondieron a ambas hormonas. Estos resultados son coherentes con nuestros conocimientos (Tse y Hille, 1992; Villalobos y cols., 1996; Villalobos y cols., 1997a; Villalobos y cols., 1997b; Villalobos y cols., 2004).

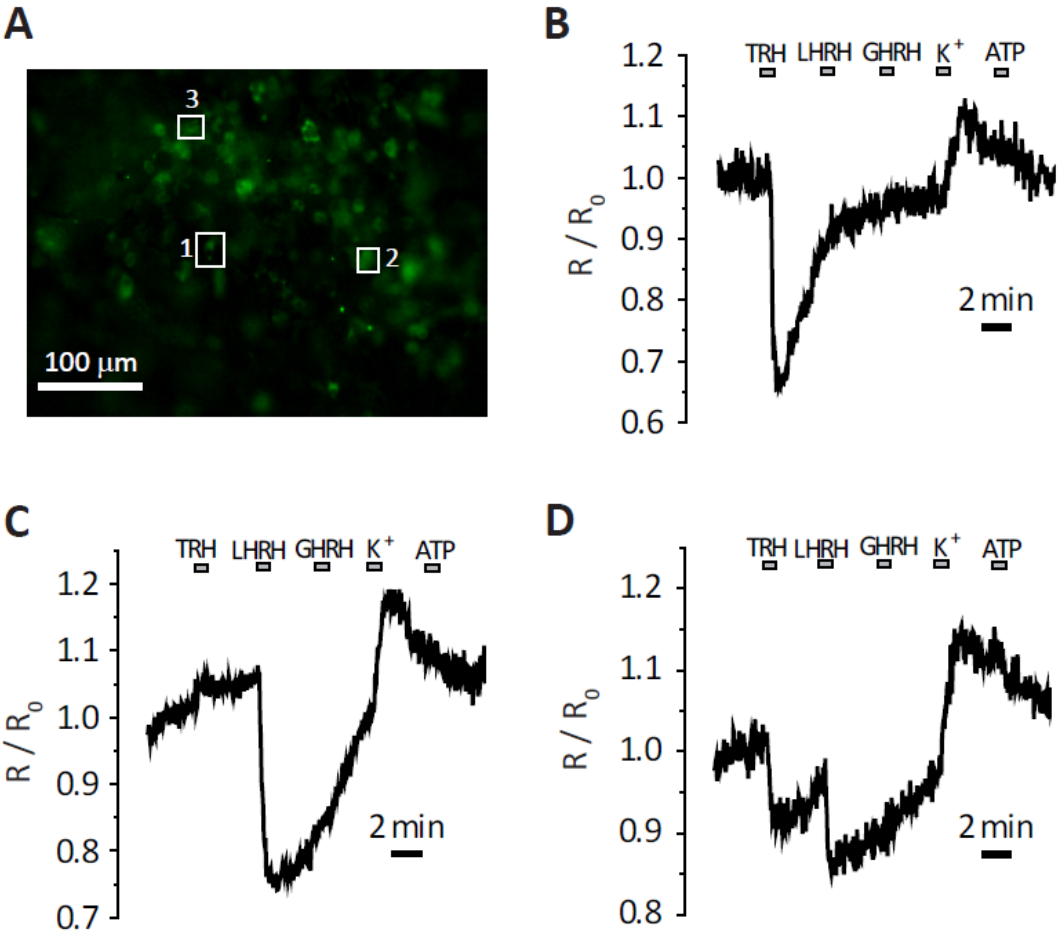

Figura 49. Medidas de $[Ca^{2+}]_{ER}$ en hipófisis de ratón transgénico erGAP3 (L10). (A) Expresión de erGAP3 en la hipófisis de un ratón de 17 días de edad excitada a 470 nm. (B) Respuesta de una célula representativa, que solo responde a TRH, correspondiente a la región de interés (ROI) 1 en (A). (C) Respuesta del ROI 2, que solo responde a LHRH. (D) Respuesta del ROI 3, una célula polirreceptorial (Villalobos y cols., 1997b) que responde tanto a TRH como a LHRH. En los tres registros se representan los cocientes F_{470}/F_{405} normalizados mediante su división por dicho cociente en condiciones basales. El órgano fue estimulado con las tres hormonas mencionadas (10 nM), alto K^+ (80 mM) y ATP (100 µM).

Ninguna célula mostró respuesta a GHRH ni a ATP. En el caso de la estimulación con alto K^+, se observó un aumento de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ por encima de la señal basal, evidenciando captación de Ca^{2+} por el RE en los tres tipos

de células, probablemente en respuesta al aumento de la $[Ca^{2+}]_C$ debido a la entrada de Ca^{2+} inducida por la despolarización (**Figura 49B**, **49C** y **49D**). En ningún caso se observó disminución de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ en respuesta a la despolarización por alto K^+, sugiriendo que no es operativo el mecanismo de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+}.

8.5. DISTRIBUCION FUNCIONAL DE LOS RECEPTORES METABOLICOS DE ACETILCOLINA EN RODAJAS DE HIPOCAMPO *EX VIVO*

El estudio del tejido nervioso a bajos aumentos *ex vivo* tiene una serie de ventajas sobre la visualización a alta resolución. En primer lugar, la organización es mucho más parecida al estado que impera durante el funcionamiento real del organismo y, por lo tanto, más próximo a las condiciones fisiológicas. En segundo lugar, la función surge generalmente, y más en el sistema nervioso, como propiedad emergente del funcionamiento de muchas células. No es infrecuente que las funciones se enmarquen y organicen en áreas funcionales de dimensiones muy superiores a las celulares y que no pueden percibirse a altos aumentos. Desde este punto de vista, los estudios funcionales de areas cerebrales intactas tienen un gran interés.

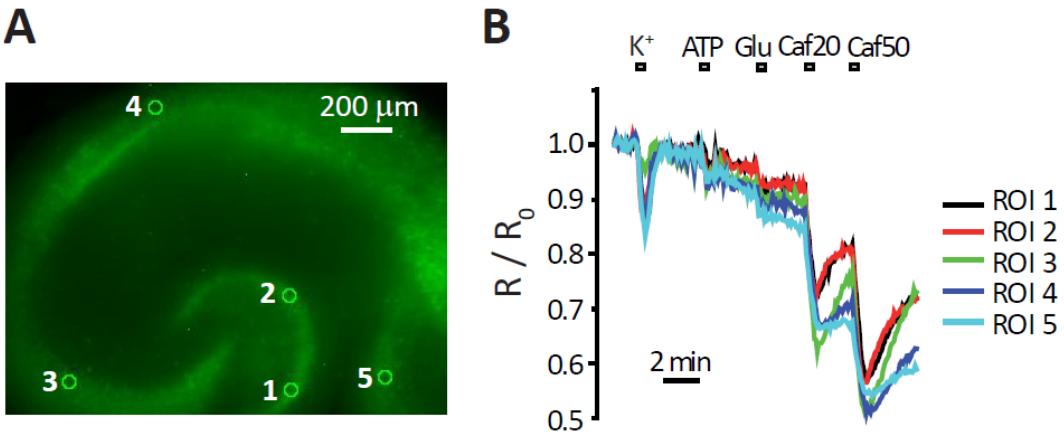

Figura 50. Medidas de $[Ca^{2+}]_{RE}$ en rodaja de hipocampo del ratón transgénicos para erGAP2. (A) Expresión de erGAP2 en una rodaja de hipocampo de un ratón en estadío P11. Se han señalado regiones de interés (ROIs) en el giro dentado (1 y 2), el cuerno de Amón (3 y 4, situados en las regiones CA3 y CA1 respectivamente) y subículum (5). (B) Registros normalizados de la señal de erGAP2 en cada ROI. Los estímulos se perfundieron durante 30 segundos con alto K^+ (80 mM), ATP (100 µM), glutamato (20 µM) y cafeína (20 y 50 mM).

En el hipocampo de nuestros ratones transgénicos, la mayor parte del erGAP3 se encuentra en los somas de las neuronas piramidales del cuerno de Amón (CA) y del giro dentado (**Figura 50A**). En este experimento, las rodajas de hipocampo se obtuvieron del ratón transgénico para erGAP2 y los estímulos utilizados, de 30 segundos de duración, fueron: despolarización por alto K^+, ATP, glutamato y cafeína (**Figura 50B**). Se ilustran las respuestas en 5 áreas seleccionadas: giro dentado (1 y 2), CA3 (3), CA1 (4) y subículum (5). Las respuestas a glutamato y ATP fueron muy pequeñas, mientras que las respuestas a cafeína fueron considerables y similares en las distintas zonas. Todas las zonas respondieron a la despolarización por alto K^+ con una discreta liberación, similar también en todas las áreas, sugiriendo la presencia del mecanismo de liberación de calcio inducida por Ca^{2+} (CICR).

La **Figura 51** ilustra la distribución de las respuestas al neurotransmisor acetilcolina en rodajas de hipocampo de la línea 10 del ratón transgénico erGAP3. Las rodajas se incubaron con Rhod-3, para cargarlas y medir simultáneamente $[Ca^{2+}]_{RE}$ y $[Ca^{2+}]_C$ en toda la rodaja. En la **Figura 51A** se muestra la señal normalizada de ambas sondas, erGAP3 y Rhod-3, antes, durante y después de un estímulo de ACh (10 μM). En la imagen tomada durante el estímulo se observa cómo la señal de erGAP3 disminuye en la zona CA1 (disminución de $[Ca^{2+}]_{RE}$), coincidiendo con el aumento de la señal del Rhod-3, que refleja el consecuente incremento de la $[Ca^{2+}]_C$, también mostrada muestra en la **Figura 51B**.

En la **Figura 51B** se representan los registros normalizados de la fluorescencia del Rhod-3 y el erGAP3 en la región CA1 de la rodaja de la **Figura 51A**, mostrando el descenso de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ simultáneo con el incremento de la $[Ca^{2+}]_C$. De hecho, los cambios en ambos trazados se inician simultáneamente, pero el pico de la $[Ca^{2+}]_C$ se alcanza antes que el máximo vaciamiento del RE. Por otro lado, el aclaramiento del Ca^{2+} citosólico es más rápido que el rellenado del RE. La localización de las respuestas a acetilcolina en la región CA1 coincide con las previamente postuladas a partir del mapeo electrofisiológico del hipocampo (Power y Sah, 2002; Fernandez de Sevilla y cols., 2008).

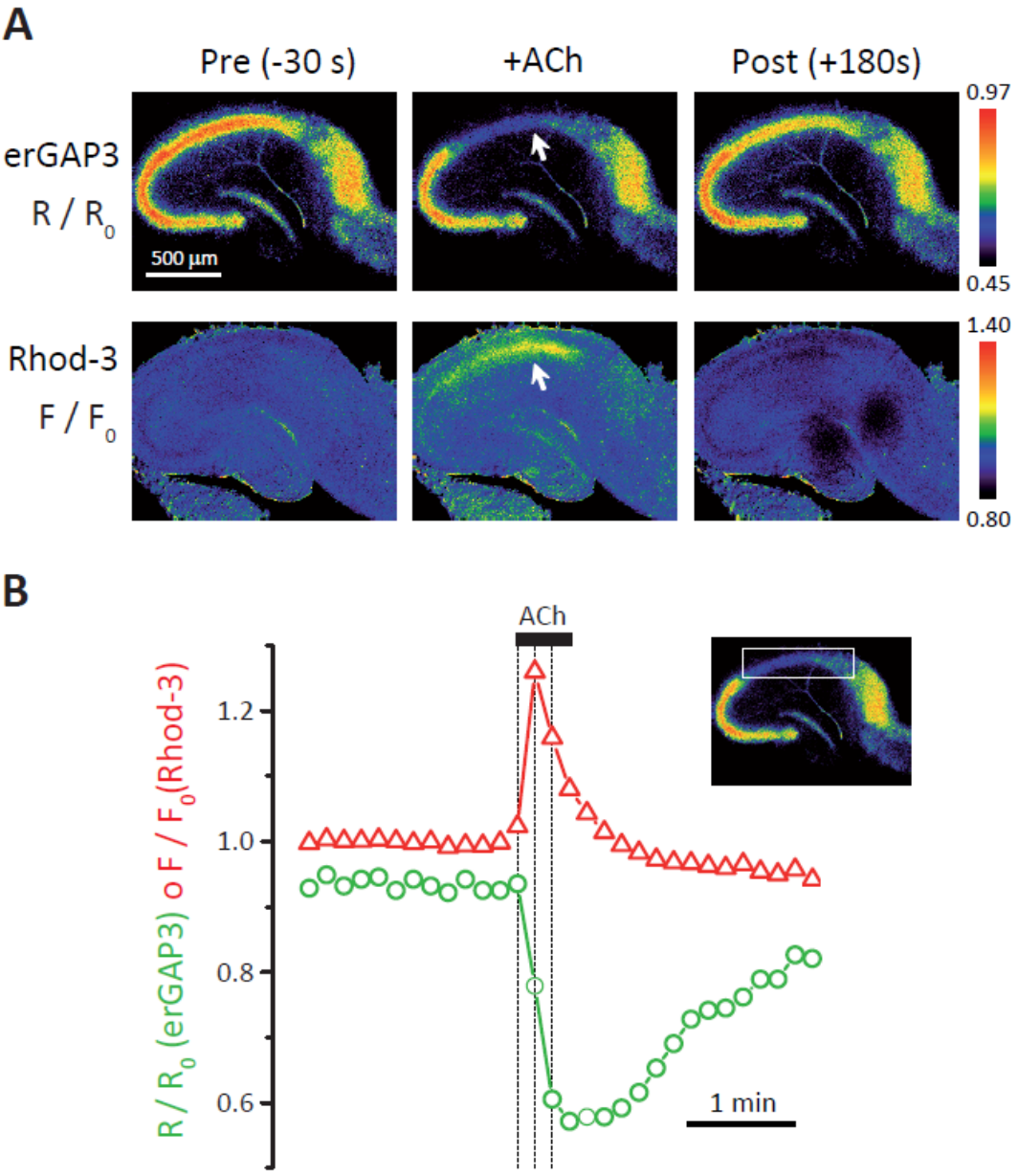

Figura 51. Distribución de la respuesta a acetilcolina (ACh) en rodajas de hipocampo de ratones transgénicos para erGAP3. (A) Rodaja de hipocampo de un ratón P7 de erGAP3 (Línea 10), representado en escala de pseudocolor en función de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ (imágenes superiores) o la $[Ca^{2+}]_{C}$ (imágenes inferiores). La escala pasa de los colores cálidos a los fríos, representando altas y bajas concentraciones, respectivamente. La flecha indica la región de CA1 donde se produce la respuesta. (B) Registro del cociente de fluorescencia (erGAP3, en verde) o la fluorescencia individual (Rhod-3, en rojo), ambas normalizadas. En la imagen del hipocampo en pseudocolor se muestra el ROI en el que se midió la señal fluorescente. El estímulo de ACh (10 µM) fue aplicado durante 30 segundos.

8.6. MEDIDAS DE LA $[Ca^{2+}]_{ER}$ *IN VIVO* EN EL RETICULO SARCOPLASMATICO DEL MUSCULO ESTRIADO DE MOSCAS TRANSGENICAS

El siguiente objetivo que se propuso fue realizar medidas de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ *in vivo*. Para ello utilizamos el modelo animal de *Drosophila melanogaster*, que ofrece varias ventajas frente al ratón, como son la facilidad de generar animales transgénicos específicos de tejido y poder registrar más fácilmente en el animal entero. Se eligió el músculo estriado porque en este tejido el Ca^{2+} del RS desempeña un papel fundamental en la contracción muscular (Szent-Gyorgyi, 1975). Para ello erGAP3 se expresó bajo el promotor del gen de la cadena pesada de la miosina (Mhc) (Mitra y cols., 1996). En la **Figura 52A** se muestra una imagen representativa de la fluorescencia endógena de una mosca transgénica adulta, en la que se observa expresión en los músculos de las extremidades y del tórax. Durante los registros no fue necesario retirar la cutícula o exoesqueleto para obtener una buena señal de fluorescencia procedente de los músculos del tórax, pues hay la suficiente transparencia (**Figura 52B**).

La estimulación a baja frecuencia (0.25-0.50 Hz) produjo cambios especulares de las fluorescencias de erGAP3, de tal forma que F_{470} baja y F_{405} sube, indicando que hay una liberación de Ca^{2+} desde el RS con cada estímulo (**Figura 52C**). Cuando la frecuencia de estimulación fue mayor (4-16 Hz) los eventos unitarios se fusionaron, produciendo una liberación del calcio mucho mayor (**Figura 52D**). La liberación a 16 Hz fue sustancialmente mayor que a 4 Hz. En la **Figura 52E** se muestran los cambios en el citosol, medidos con la sonda GCaMP3 en una mosca transgénica para este sensor expresado también en el músculo mediante el mismo promotor (Tian y cols., 2009). Los cambios de la $[Ca^{2+}]_C$ registrados son perfectamente coherentes con los de la $[Ca^{2+}]_{RE}$: la estimulación a baja frecuencia produjo eventos unitarios con una disminución de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ y un aumento rápido de la $[Ca^{2+}]_C$ seguida de una recaptación más lenta. Por el contrario, a frecuencias más altas (4 y 32 Hz) se produjo una fusión de los eventos con una mayor disminución de $[Ca^{2+}]_{RE}$, con un mayor incremento de la $[Ca^{2+}]_C$ alcanzada durante el estímulo. Finalmente, se realizaron los mismos protocolos experimentales utilizando una mosca transgénica para GFP dirigida a la membrana plasmática (pmGFP) expresada también bajo el promotor muscular Mhc (Mohseni y cols., 2009). La pmGFP no mostró cambios en la intensidad de

fluorescencia durante la estimulación (**Figura 52F**) como es propio de una proteína insensible a Ca^{2+}, lo que ratifica que los cambios observados en las Figuras 52C, 52D y 52E no son artefactuales.

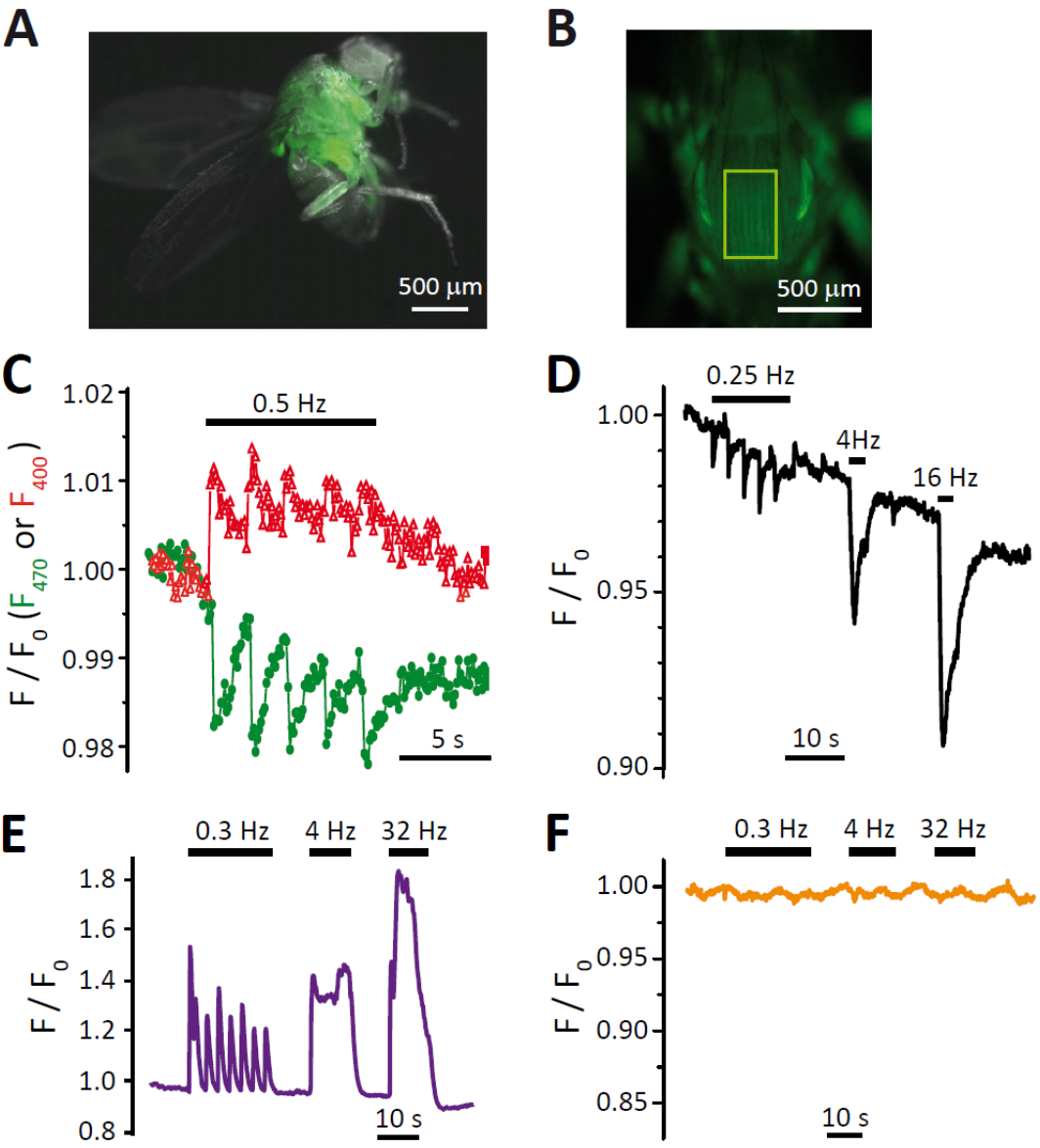

Figura 52. Medidas de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ *in vivo* en *Drosophila melanogaster* adulta. (A) Imagen de fluorescencia endógena de una mosca de la línea w; +; Mhc-GAL4//UAS-erGAP3 en posición lateral. (B) Vista apical de la fluorescencia del tórax de una mosca de la misma línea. Se muestra el ROI donde se dan los cambios de fluorescencia. (C) Registros de Ca^{2+} a las dos longitudes de onda individuales de erGAP3. (D) Comparación de los resultados de la estimulación nerviosa a diferentes frecuencias (0.5, 4 y 16 Hz). (E) Registro del Ca^{2+} citosólico de los músculos en moscas transgénicas de la línea w; +; Mhc-GAL4//UAS-GCaMP3. (F) Control de moscas transgénicas de la línea w; +; Mhc-GAL4//UAS-pmGFP. En los paneles D-F, F es la fluorescencia a 470 nm. Todas las estimulaciones se hicieron a 6 voltios durante 30 ms.

Estas despolarizaciones o eventos unitarios corresponden a un “quanto” de Ca^{2+} liberado por una estimulación del nervio. Sus características temporales se muestran con mayor detalle en la **Figura 53**. La liberación de Ca^{2+} del RS se completa en menos de 100 ms (que es la velocidad de adquisición de las imágenes) y se relaja también con relativa rapidez, aunque más lentamente, con un $t_{1/2}$ de 0.5-1 s. (**Figura 53A**). En los experimentos con estimulación a alta frecuencia se distinguen perfectamente la sumación y fusión de las respuestas individuales (hasta 15), que sucede con gran eficiencia (**Figura 53B** y **53C**). Estas observaciones son coherentes con los conocimientos actuales acerca de la fisiología de la contracción muscular.

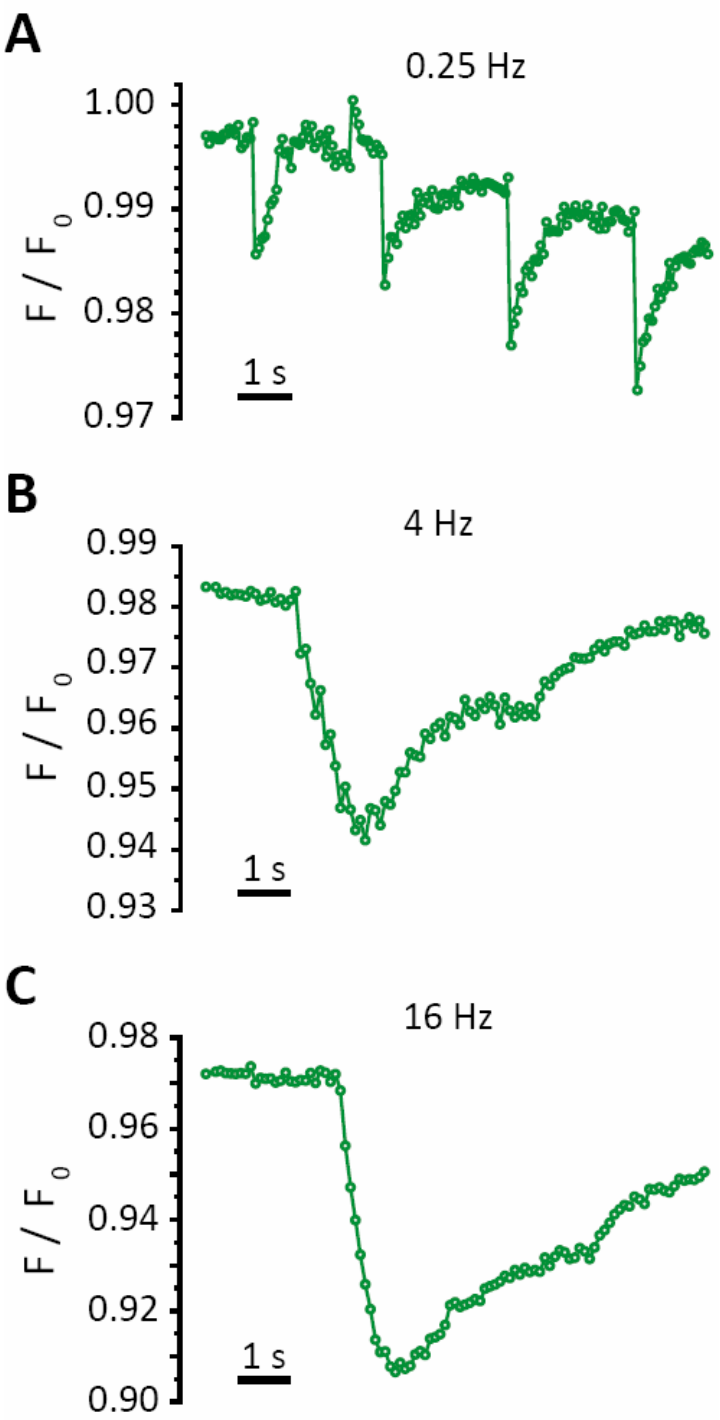

Figura 53. Liberaciones de Ca^{2+} del RS inducidas por trenes de estimulación de distintas frecuencias. La estimulación se hizo vía la fibra gigante (ver Métodos), con lo que se consigue que afecte simultáneamente a todas las motoneuronas. La fluorescencia se recogió de una región amplia de los músculos del dorso, que respondieron sincrónica y coherentemente como un todo. Se aplicaron impulsos de 6 voltios de intensidad y 30 ms de duración a diferentes frecuencias de estimulación: (A) 0.2 Hz, (B) 4 Hz y (C) 16 Hz. La duración del tren de estímulos fue de 15 s para el estímulo de 0.2 Hz y de 5 s para los otros dos. Se representa la F_{470} normalizada dividiendo por la fluorescencia basal.

DISCUSION

Siempre nos hallamos de acuerdo en dos o tres puntos que entendemos, y discutimos sobre dos o tres mil que no entendemos en manera alguna.

Voltaire

1. DESARROLLO DE UN NUEVO SENSOR DE Ca^{2+}

El objetivo general de esta Tesis era desarrollar un sensor de la familia GAP con baja afinidad por el Ca^{2+} para monitorizar con precisión la homeostasis de este ion en el RE. La necesidad de esta herramienta es patente porque, mientras que existen muchos GECIs diseñados para medir en el citosol, hay muy pocos capaces de medir en el rango alto de concentraciones de Ca^{2+} existentes en el RE, de entre 0.1 y 1 mM (Alonso y cols., 1998). Estas medidas son necesarias para dilucidar cómo sucede la homeostasis del Ca^{2+} reticular, y está aceptado que desempeña un papel importante en la génesis de procesos como el envejecimiento o las enfermedades neurodegenerativas (Verkhratsky, 2005). Antes de iniciar este trabajo, se había desarrollado en el Laboratorio el nuevo sensor GAP y una variante, la GAP1, que contenía una serie de mutaciones que disminuían la afinidad por el Ca^{2+}, aumentando la K_d desde el valor de 660 nM de la GAP original a 12 μM para la GAP1 (**Figura 54**). En esta variante se había reducido la afinidad por Ca^{2+} aproximadamente 20 veces, permitiendo detectar el vaciamiento de Ca^{2+} del RE en respuesta a estímulos potentes. Sin embargo, para tener sensibilidad suficiente para visualizar las respuestas a estímulos submáximos, era necesario reducir la afinidad un orden de magnitud más.

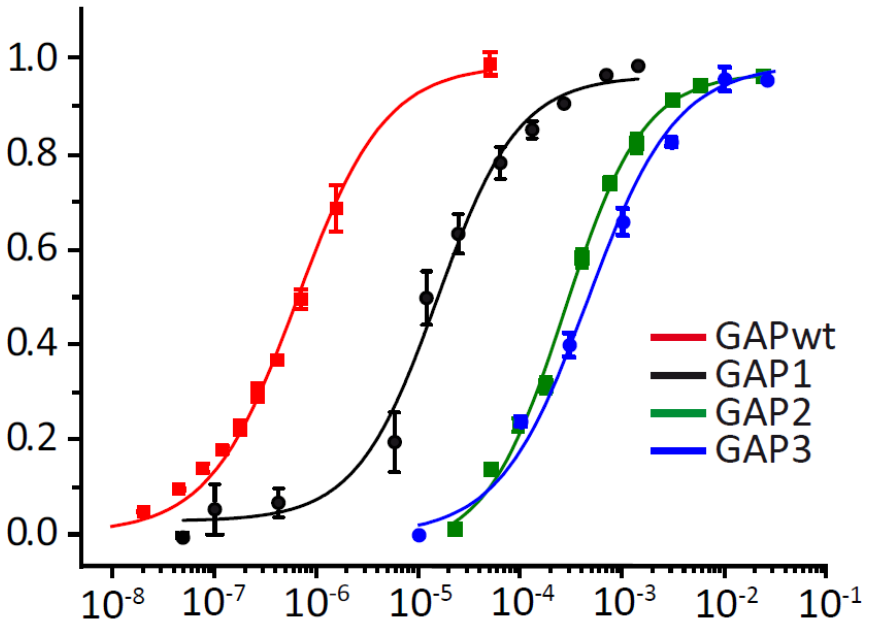

Figura 54. Comparación de la afinidad de las distintas GAP producidas. GAPwt, GAP1, GAP2 y GAP3, que tienen una K_d 0.66 μM, 12 μM, 407 μM y 489 μM, respectivamente.

Un truismo frecuente dice que “uno sólo encuentra lo que está buscando”. Por ese motivo es necesario poner a punto un método cuantitativo sencillo para detectar los mutantes de baja afinidad con la K_d adecuada. Una vez decididas las nuevas mutaciones a realizar sobre el sensor GAP portador de la mutación D119A (Kendall y cols., 1992c), se puso a punto el ensayo para detectar las proteínas de baja afinidad que tuvieran una K_d de entre 0.1 y 1 mM, ya que la concentración de Ca^{2+} del RE está entre estos valores (Alonso y cols., 1998). Era necesario adaptar el protocolo de síntesis proteica para ajustarlo a pequeña escala para producir 22 mutantes de GAP diferentes. La segunda parte, el análisis de los mutantes, se realizó inicialmente mediante experimentos de imagen de célula única, lo cual es un método lento y escasamente cuantitativo. Para mejorar este procedimiento, se puso a punto un ensayo en el lector de placas de 96 pocillos, que permitía una rápida lectura de la fluorescencia de los 22 sensores a la vez. Éste método de cribado ha sido validado por al descubrimiento de GAP2, que efectivamente, tiene la K_d adecuada para medir en el RE (Tabla 13).

El nuevo sensor de baja afinidad, GAP2, había perdido, desafortunadamente, en intensidad de fluorescencia (brillo) con respecto a su predecesor GAP1 (**Figura 31**). Para solventarlo se intentaron dos estrategias distintas. En la primera, se sustituyó la GFPuv por la GFPuv permutada circularmente en el residuo 145; esta modificación resultó en una proteína no fluorescente, que no se ha mostrado en esta tesis. Es relevante mencionar que en un trabajo previo de nuestro grupo se había sustituido la GFPuv por la EGFP, o por los fluoróforos rojos, RFP o tdTomato; en todos los casos el resultado fue la pérdida de sensibilidad al Ca^{2+} de las proteínas resultantes. La segunda estrategia, descrita en esta Tesis, consistió en introducir mutaciones en la GFP, que habían sido previamente descritas en el contexto de otros sensores y que aumentaban el brillo. Se combinaron al azar 6 mutaciones candidatas sobre la versión de GAP2 optimizada para su expresión en mamífero. De este experimento surgió un sensor con el doble de intensidad de brillo e igual rango dinámico que GAP2, al que se denominó GAP3.

Los ensayos de mutagénesis realizados sobre GAP reflejan la dificultad que entraña la ingeniería de proteínas, ya que casi todas las modificaciones, incluyendo aspectos insospechados, influyen en la eficiencia de su función, en este caso, la dependencia de Ca^{2+} de la fluorescencia. Es muy difícil

hacer predicciones estructura/función cuando se realizan mutaciones en los distintos dominios de una proteína. En el caso concreto de GAP, se ha observado que la mutación A206I en la GFPuv anula completamente la sensibilidad a Ca^{2+}, mientras que algunas mutaciones en la aequorina que ya contenía la mutación D119A podían eliminar la fluorescencia de la GFP (por ejemplo, D117N, E156P y D161K). Además, en la aequorina se ha observado que la mutación de un mismo residuo a distintos aminoácidos puede tener efectos muy distintos; por ejemplo, el aspartato 24, que en la primera ronda de mutagénesis se había mutado a alanina y en la segunda a valina, histidina o asparragina. Las mutaciones D24A, D24V y D24H no disminuyeron la afinidad de GAP, mientras que la D24N sí lo hizo. Esto sugiere que la asparragina es capaz de afectar la conformación de la primera mano EF de la aequorina, y con ello la afinidad por Ca^{2+}. El ejemplo más extremo de la dificultad de las predicciones de estructura/función es el caso del pericam, del que nunca se ha logrado una mutante de baja afinidad, porque las mutaciones en los residuos de su calmodulina anulan completamente la fluorescencia de la YFP (datos no publicados de P. Chamero). Otro ejemplo es el CEPIA, en el que se probaron mutaciones sobre los residuos en la posición –Z de las manos EF de la calmodulina. En este caso, aunque las mutaciones redujeron la afinidad por Ca^{2+} de forma sinérgica, inevitablemente reducían también el rango dinámico (Suzuki y cols., 2014).

La mayor parte de los sensores proteicos de Ca^{2+} son proteínas de fusión del sensor de Ca^{2+} con el emisor de fluorescencia, separados por un péptido de unión. La longitud y composición aminoacídica de este péptido suele ser crítica para la interacción entre las dos proteínas y para su función. En el caso de la proteína GAP, surgida de la unión de la GFP y la aequorina, se habían probado otros péptidos de unión diferentes, como el péptido descrito por Baubet y colaboradores (Baubet y cols., 2000) o colocando en tándem dos péptidos de unión de GAP. El péptido que dio mejores resultados fue el descrito en esta memoria. También durante este proyecto, aunque no se ha reflejado en esta memoria, se intentó mejorar erGAP3 mediante la manipulación del péptido de unión entre GFPuv y aequorina. Se probó a añadir o quitar entre uno y cuatro aminoácidos del extremo N-terminal del péptido. Todas estas variantes de GAP demostraron ser iguales o peores que la proteína parental erGAP3.

2. CARACTERIZACION DE LOS NUEVOS SENSORES DE Ca^{2+}

En el desarrollo de un sensor proteico de Ca^{2+} hay una serie de características críticas que hay que tener muy en cuenta: la K_d debe ser del mismo orden de magnitud que la $[Ca^{2+}]$ existente en el compartimento celular en el que se desea medir; debe ser brillante y tener un alto cociente señal/ruido; debe tener un único sitio de unión a Ca^{2+} para facilitar la calibración; no tener cooperatividad, es decir, el coeficiente de Hill debe ser cercano a 1; no debe ser sensible a pH ni a otros iones divalentes para evitar interferencias; debe ser capaz de expresarse en orgánulos o localizaciones subcelulares bien definidas; y, lo más importante, debe ser funcional *in vivo*. A continuación, se discutirán estas características concretas para GAP2 y GAP3.

El principal parámetro de elección de un GECI es su afinidad. En el RE, las $[Ca^{2+}]$ basales típicas serían entre 200 y 1000 μM (Alonso y cols., 1998). Esto significa que la K_d de un sensor ideal deberá estar cercana a este rango de concentraciones, lo que le permitirá registrar pequeñas variaciones de Ca^{2+} en torno a dicho valor con una máxima relación señal/ruido. Los primeros sensores reticulares de Ca^{2+} que se desarrollaron (los indicadores sintéticos, la mayoría de los camaleones y LAR-GECO1) tienen una K_d con valor de decenas de micromolar (**Tabla 3**). Aunque estos sensores permitían detectar cambios de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ la medida era poco sensible, pues la K_d no era óptima; teniendo en cuenta que el RE puede almacenar hasta cientos de micromolar de Ca^{2+}, el indicador debe encontrarse casi saturado a las concentraciones basales de Ca^{2+} dentro del RE y, por tanto, muy poco sensible a los cambios de $[Ca^{2+}]_{RE}$.

La principal mejora de los sensores presentados en este trabajo, GAP2 y GAP3, respecto a su predecesor GAP1 es el aumento de la K_d de un orden de magnitud, un valor mucho más apropiado para realizar medidas precisas y detectar pequeños cambios de $[Ca^{2+}]_{RE}$. Con el GAP1 se detectan bien los cambios de $[Ca^{2+}]_{RE}$ observados tras estimulación con cafeína, TBH o tapsigargina, que producen vaciamientos completos del RE. Por el contrario, podría resultar difícil observar vaciamientos parciales, como los provocados por estímulos fisiológicos submáximos (**Figuras 45** y **46**). En cambio, con GAP2 y GAP3 los vaciamientos parciales son claramente visibles y puede matizarse mucho mejor la intensidad de la respuesta. Por ejemplo, se puede ver cómo distintos estímulos provocan diferentes

niveles de vaciado (**Figuras 50**, **51** y **53D**). Esto es debido a que tanto el sensor GAP2 como el sensor GAP3 tienen una afinidad adecuada para medir en las organelas de alto contenido en Ca^{2+}, con K_ds de 407 y 489 μM, respectivamente (**Figura 54**). Con ambos sensores se ha podido medir la homeostasis del Ca^{2+} en el RE, y además también se ha medido con GAP3 en el aparato de Golgi. Dentro del repertorio de colorantes existentes, Split-YC7.3, GCaMPer y CEPIA son otros ejemplos de sensores que tienen una afinidad apropiada para medir Ca^{2+} en el RE.

Una propiedad distintiva de la familia GAP es su carácter de sensor ratiométrico, que permite reducir muchos artefactos de registro, que afectan de forma similar a las dos longitudes de onda y se cancelan al hacer el cociente. Es importante destacar que, a pesar de las mutaciones introducidas tanto en la aequorina, para obtener la GAP2, como en la GFPuv, para obtener la GAP3, ambas variantes han mantenido el carácter ratiométrico de la GAP original. Como se ha comentado, los sensores ratiométricos son ventajosos respecto a los de una única longitud de onda, ya que permiten corregir los posibles artefactos resultantes de cambios de foco o incluso el fotoblanqueo. En todos los experimentos se comprueba de forma sistemática que las dos longitudes de onda a las que se mide GAP cambian en la dirección prevista, de forma especular, y los experimentos en los que no ha ocurrido se descartan. En segundo lugar, y más importante, es el hecho de que únicamente los sensores ratiométricos permiten calibrar la señal fluorescente en $[Ca^{2+}]$ con fiabilidad, y no limitan el estudio solamente a los cambios en la intensidad de fluorescencia, que pueden ser artefectuales, debidos a otro cambio asociado a la función que se esté estudiando (por ejemplo, cambio de forma asociado a la contracción). La mejora de GAP2 y 3 es especialmente relevante en las organelas de alta $[Ca^{2+}]$, como el RE y el aparato de Golgi, donde se pretende medir con precisión los niveles de Ca^{2+} en el lumen de ambos orgánulos en reposo. Como se ha comentado en la Introducción, es muy importante conocer estos valores, ya que la reducción crónica del Ca^{2+} luminal puede desencadenar procesos patológicos. Las ventajas de las medidas ratiométricas no pueden utilizarse, sin embargo, en los experimentos de cinética rápida mostrados en la **Figura 52**, debido a que GAP es un sensor ratiométrico de excitación y no es posible tomar simultáneamente las dos lecturas de fluorescencia. Para este tipo de experimentos los sensores ratiométricos de emisión serían más

adecuados, pues permiten medir simultáneamente las dos emisiones utilizando dos cámaras o duplicando la imagen y proyectándola sobre dos mitades del sensor CCCD (Suzuki y cols., 2014).

El espectro de fluorescencia de GAP2 es igual que el de GAP original, pero en el caso de GAP3, una vez se modificaron los aminoácidos de GFPuv, el espectro de fluorescencia cambió ligeramente respecto a GAP original y GAP2 (**Figuras 13**, **21** y **37**). La proteína GAP2 tiene un espectro más similar al de la GFP, mientras que el espectro de GAP3 se asemeja más al de EGFP (**Figura 7**), ya que el segundo máximo de excitación es mayor que el primero. Esto puede explicarse en base a las mutaciones en la GFP de GAP2 para aumentar la intensidad de fluorescencia.

A la hora de elegir un sensor de Ca^{2+} para una aplicación concreta, el rango dinámico es uno de los parámetros decisivos. Los rangos dinámicos de GAP2 y GAP3 realizado a partir de proteína bacteriana son cercanos a 3, quizás algo menor que el de sus predecesoras, GAP y GAP1. Es importante señalar que, sin embargo, el rango dinámico obtenido *in situ*, en el RE, puede, en ocasiones, ser cercano a 5, como puede observarse en la **Figura 45**, en la que la señal de Ca^{2+} baja desde 1 en la basal a 0.2 tras el vaciamiento total. En general, los sensores de baja afinidad tienen un rango dinámico mucho menor que los de alta. En concreto, los sensores pioneros del RE, los camaleones, y algunos más recientes, como el CatchER o el GCaMPer tienen un rango dinámico muy pobre (entre 1.5 y 2), mientras que los sensores más recientes tienen un rango dinámico mayor, como el LAR-GECO o CEPIA (entre 4.7 y 10).

Un parámetro clave para determinar el rango de sensibilidad del indicador es su grado de cooperatividad, descrito por el coeficiente de Hill (n_H). Desde un punto de vista estructural, n_H se relaciona con la estequeometría de unión al Ca^{2+} del sensor. En general, los sensores de Ca^{2+} con alta cooperatividad tienen reducido el rango de sensibilidad y, además, su calibración es más complicada. El coeficiente de Hill de GAP2 y GAP3 es de 1, lo que sugiere que la unión a Ca^{2+} no es cooperativa. Esto probablemente se debe a que GAP2 y GAP3 poseen solamente una mano EF funcional, concretamente la cuarta (Toma y cols., 2005), a la cual se une el Ca^{2+}. En este sentido, el que la aequorina tenga 3 sitios de sitios de unión a Ca^{2+}, en lugar de 4 como la calmodulina (en la que se basan la mayoría de los sensores actuales), explica que sea más fácil de manipular.

Los camaleones como el YC4er y D1ER tenían dos sitios de unión a Ca^{2+}, lo que hace que tengan dos valores de K_d, una de alta y otra de baja afinidad. Esto distorsiona la curva de calibración y complica el análisis de la señal fluorescente. Bajo este punto de vista GAP sería ventajoso frente al CEPIA, cuyo coeficiente de Hill es mayor de 1 (entre 1.37 y 1.95).

La sensibilidad a pH es otro parámetro especialmente relevante en los sensores de Ca^{2+} derivados de la GFP, ya que la fluorescencia de la GFP es sensible a $[H^+]$. GAP2 y GAP3 son poco sensibles a los cambios de pH, ya que son funcionales a pHs discretamente alcalinos (entre 7 y 8.5) (**Figura 23**), por lo que sería posible usarlas en la matriz mitocondrial, donde el pH es próximo a 8.5 (Llopis y cols., 1998). También son funcionales a pHs neutros y discretamente ácidos, por lo que pueden usarse en el RE, cuya matriz está a pH entre 7-7.2, e incluso a pHs más ácidos, como el del lumen del aparato de Golgi (entre 6 y 6.5) (Llopis y cols., 1998). En la **Figura 42** se muestra cómo GAP3 se expresa correctamente en el aparato de Golgi de células HeLa, donde la relación señal/ruido es suficiente para poder detectar claramente pequeños cambios dinámicos. Como comparación, el sensor YC3.3 fue expresado en el aparato de Golgi de las células HeLa, donde la señal basal disminuye solo en un 42% al producir un vaciamiento completo de la organela con EGTA y ionomicina (Griesbeck y cols., 2001). En el caso del GAP la reducción de señal por vaciamiento completo es de un 50-70%. En el caso de un estímulo de ATP e histamina, la señal disminuye un 20%, mientras que con un estímulo de histamina, la señal de YC3.3 apenas produjo una bajada de la señal, confundiéndose con el ruido basal del sensor.

El Mg^{2+} es el metal divalente más abundante en la fase intracelular, donde se encuentra ligado a los nucleótidos y ejerce de cofactor de muchas enzimas. Algunas proteínas con dominios de manos EF también son capaces de unir Mg^{2+}, como es el caso de la troponina C (Heim y Griesbeck, 2004). Por fortuna, el sensor GAP2 no es sensible a la concentración de Mg^{2+} (**Figura 24A**), ni siquiera cuando esta es 10 veces mayor o menor que la fisiológica (Romani y Scarpa, 1992). Tampoco el Mn^{2+}, que es el cofactor de algunas enzimas, tuvo ningún efecto sobre GAP2. Otros cationes, como el Co^{2+} y sobre todo el Ni^{2+}, compiten con el Ca^{2+} por el sitio de unión (**Figura 24B**). Sin embargo, no se puede considerar que esto vaya a suponer un problema en la medición del Ca^{2+} en células animales, ya que

tanto el Ni^{2+} como el Co^{2+} se encuentran a concentraciones muy bajas en las células.

Las mediciones de Ca^{2+} en el RE con erGAP2 y erGAP3 son compatibles con el uso simultáneo de otras sondas de Ca^{2+} de características espectrales diferentes, dirigidas eventualmente a otros compartimentos celulares. Un ejemplo que se muestra en esta Tesis es el indicador rojo Rhod-3 (**Figuras 4D**, **30A** y **52**), cuyos espectros de excitación y emisión no se solapan con los de GAP. También pueden realizarse medidas simultáneas con el Fura-2 (**Figuras 4A**, **30B** y **47B**), aunque renunciando a la longitud de onda de excitación de GAP a 405 nm, ya que está muy cercana a la longitud de onda de excitación del Fura-2 a 380 nm.

A menudo es difícil aumentar la $[Ca^{2+}]_{RE}$ por encima de la basal para obtener R_{max}. Por el contrario, en el curso de esta Tesis hemos encontrado un protocolo prácticamente universal que permite obtener R_{min} en prácticamente todos los tipos celulares estudiados, aplicando un cóctel de EGTA, TBH y cafeína. Este consigue depletar el RE de Ca^{2+} en entre 3 y 5 minutos.

La principal ventaja de la familia GAP con respecto a otros sensores de Ca^{2+} es que el dominio que confiere la sensibilidad a Ca^{2+} es la aequorina, una proteína presente exclusivamente en el género *Aequorea*, y sin homólogos conocidos en mamíferos. Lo mismo sucede con la GFP, que tampoco se encuentra en mamíferos. Por contrario, los sensores de Ca^{2+} que contienen la troponina C y, especialmente, la calmodulina, podrían unirse a los efectores celulares de estas proteínas, y esto podría interferir con la señal fluorescente. Es por ello que estos sensores incluyeron modificaciones en sus dominios de sensibilidad a Ca^{2+} que impidieran interacciones con las proteínas de su entorno (Palmer y cols., 2004; Palmer y cols., 2006).

La familia GCaMP tiene carácter intensiométrico, es de las más optimizadas y está muy enfocada en el citosol, aunque recientemente han incorporado una variante reticular, GCaMPer. Con esta última sonda se pudieron registrar bajadas de $[Ca^{2+}]_{RE}$ en cardiomiocitos, donde los cambios de fluorescencia fueron del 2.5% durante las contracciones, y de hasta 50% cuando se vaciaba completamente el RS con cafeína (Henderson y cols., 2015), por lo que el rango dinámico *in situ* de 2. Sin embargo, GAP y CEPIA tienen mejor rango dinámico, ya que son ambos mayores de 3. Existen dos variantes de CEPIA intensiométricas y una

ratiométrica, aunque esta última tiene la desventaja de que hay que excitarlo con luz más desplazada hacia el ultravioleta (380 nm) (Suzuki y cols., 2014). La ventaja más importante de los sensores basados en FRET es su intrínseco carácter ratiométrico de emisión, lo que permite medir cinéticas rápidas más fácilmente que con un sensor ratiométrico de excitación, y más fiables que con un GECI intensiométrico (ver más arriba). Por otro lado, suelen padecer de un rango dinámico pequeño, y también de la sensibilidad a pH característica de las proteínas amarillas (Miyawaki y cols., 1999). El CatchER también sufre de un rango dinámico pequeño, probablemente el motivo por el cual no ha sido utilizado *in vivo*, aunque es digno de reconocimiento el diseño de mutagénesis para introducir un dominio de unión a Ca^{2+} en la propia estructura de la GFP.

A pesar de que el RE es el principal orgánulo que almacena Ca^{2+}, no es el único. El aparato de Golgi también acumula altas [Ca^{2+}] y participa en su homeostasis. Los registros de fluorescencia en el aparato de Golgi con GAP3 dirigido al trans-Golgi (tgoGAP3) son más ruidosos que los obtenidos con erGAP3. Esto es probablemente debido a la menor cantidad de sensor expresado, algo inevitable dado el tamaño del orgánulo y el promotor empleado, de expresión moderada, para evitar la deslocalización del sensor. También muestra una menor diferencia entre el ratio normalizado R/R_0 en la señal basal y en el vaciado máximo, seguramente debido a la menor [Ca^{2+}] que hay en el lumen del trans-Golgi. Esto hace que la señal basal de la sonda se halle en la mitad inferior de la curva de calibración, lo que hace que el espectro de fluorescencia tenga menos margen para cambiar. La sonda tgoGAP3 mide adecuadamente en el trans-Golgi, cuyos vaciamientos provocados por ATP e histamina aparecen reflejados en el cociente F_{470}/F_{403}, y cuya calibración a [Ca^{2+}] coincide con lo descrito en la bibliografía (Lissandron y cols., 2010; Aulestia y cols., 2015).

3. POSIBLE MECANISMO DE ACCION DE LOS SENSORES GAP

En el transcurso de esta Tesis se han realizado numerosos intentos, hasta ahora infructuosos, de cristalizar la proteína GAP purificada, tanto a partir de bacterias como de células de mamífero. Sin disponer de los datos estructurales sólo podemos especular sobre el mecanismo de acción. Una hipótesis de trabajo consiste en que el cambio de fluorescencia dependiente de Ca^{2+} podría depender de la interacción entre la GFPuv y la aequorina. Cuando el Ca^{2+} se une a los dominios de manos EF de la

aequorina, esta debe sufrir un cambio conformacional que se transmitiría al fluoróforo de la GFP, y esto desplazaría el máximo del espectro de excitación (**Figura 55**). En base al desplazamiento espectral encontrado originalmente durante la protonación/deprotonación de la GFP (Miyawaki y cols., 2003), se ha propuesto un mecanismo general para los sensores de Ca^{2+} fluorescentes ratiométricos. El cambio de fluorescencecia dependiente de Ca^{2+} sería también debido a un cambio en el estado de protonación del fluoróforo de la GFP. GAP estaría en equilibrio entre dos especies moleculares: una libre de Ca^{2+}, donde el cromóforo de la GFP estaría protonado y que emitiría su fluorescencia con el máximo de excitación a 405 nm, y otra unida a Ca^{2+}, con el cromóforo desprotonado y el máximo de excitación a 470 nm. Por otra parte, se ha propuesto que la GFP puede formar dímeros (Cubitt y cols., 1995) y, por ello, parecía factible que en el mecanismo de acción estuvieran implicadas interacciones GFPuv-GFPuv. Se ha descrito que al mutar el residuo A206 a lisina o isoleucina, se impide la dimerización de la GFP (Zacharias y cols., 2002). En nuestro caso, al mutar el residuo A206, situado en la décima lámina β del barril de la GFP, el sensor GAP pierde la sensibilidad a Ca^{2+} (**Figura 32**). Sin embargo, no tenemos evidencias de que el GAP original dimerice. En colaboración con Guillermo Jiménez Gallego (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid), se realizaron experimentos de centrifugación por equilibrio de sedimentación (que no se muestran en esta memoria) para investigar si GAP dimeriza. Esta técnica consiste en ultracentrifugar la proteína GAP en un gradiente de densidades, de forma que la proteína se sitúa en el punto donde su densidad y la densidad del gradiente sean idénticas. Este experimento se realizó a dos velocidades de centrifugación en presencia y ausencia de Ca^{2+}, y no se apreció diferencia entre las dos condiciones (con y sin Ca^{2+}), dando en ambos casos un peso molecular cercano al teórico de una molécula de GAP y sugiriendo, por tanto, que no dimeriza.

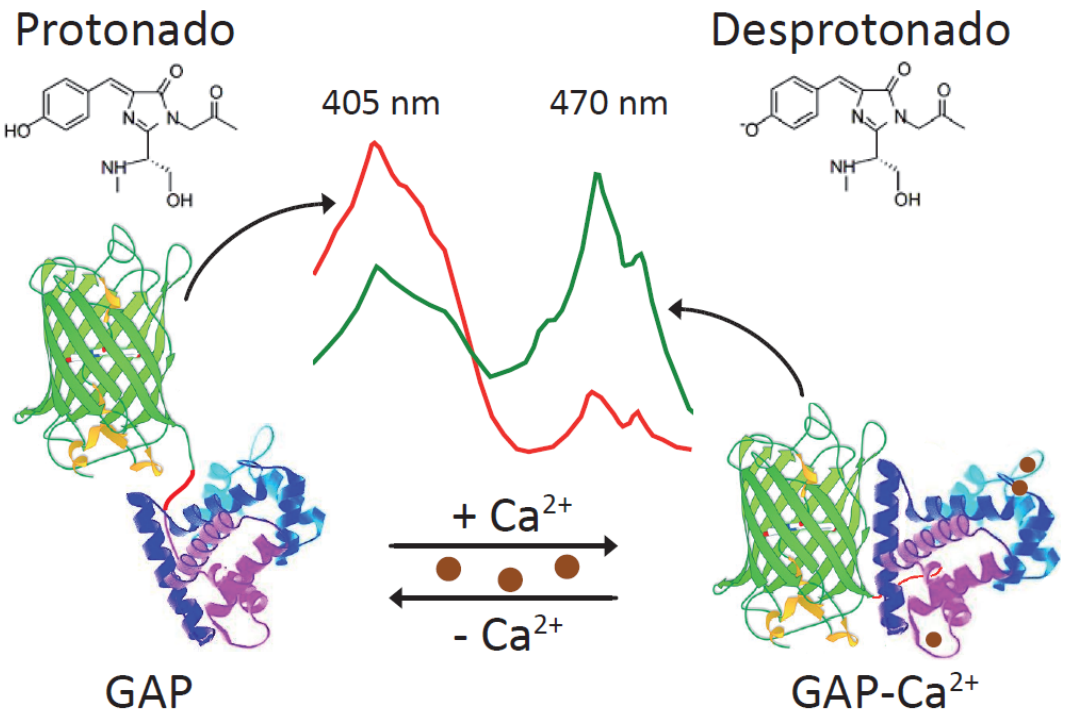

Figura 55. Mecanismo de acción propuesto para las proteínas GAP. Cuando la aequorina no está unida a Ca^{2+}, el cromóforo de la GFP está protonado, y se excita mayoritariamente a 405 nm. Cuando la aequorina une Ca^{2+}, se produce un cambio conformacional que se transmite a la GFP, provocando la desprotonación del cromóforo, y la mayor fluorescencia a 470 nm.

4. PRUEBAS DE CONCEPTO Y MEDIDAS *IN VIVO*

Se han utilizado diversos abordajes experimentales para realizar las pruebas de concepto de la funcionalidad de GAP en distintos modelos celulares, como las líneas de células estables y los animales transgénicos. Para este proyecto, se eligió expresar GAP dirigida al RE (erGAP) bajo el promotor CAG porque no queríamos restringir el estudio de la funcionalidad a un único tejido; por el contrario, el objetivo era demostrar la versatilidad del sensor en distintos tejidos y modelos celulares. Con estas herramientas se han podido hacer medidas de Ca^{2+} en siete sistemas diferentes: células HeLa, monocitos, islotes de Langerhans, cultivos mixtos y rodajas de hipocampo, adenohipófisis y músculo estriado *in vivo*.

En las líneas de ratón transgénico la expresión de erGAP2 o erGAP3 sucede prácticamente en todos los órganos, aunque el nivel de expresión puede ser muy variable entre los diversos tejidos, e incluso puede ser muy diferente entre distintos tipos celulares dentro de un mismo tejido. En

concreto, las dos líneas caracterizadas de erGAP3 tienen un perfil de expresión muy similar, aunque puede haber diferencias en tejidos concretos, como por ejemplo en el caso de la hipófisis.

Hasta la fecha sólo se había descrito un único ratón transgénico de un sensor dirigido al RE, el camaleón YC3.3er expresado específicamente en los islotes de Langerhans mediante el uso de un promotor específico (Hara y cols., 2004). La combinación del pequeño rango dinámico del YC3.3er (de 1.6) con su baja expresión, en parte debido al promotor específico, produjo unos resultados muy pobres. La mayor parte de los resultados obtenidos con los sensores de Ca^{2+} *in vivo* han sido muy poco satisfactorios, en general por los mismos motivos que el YC3.3er en los islotes pancreáticos.

Las *Drosophila* permiten una gran versatilidad, y mayor facilidad para expresar transgenes en tejidos específicos gracias al sistema GAL4:UAS, por lo que en el caso de este modelo, se desarrollaron líneas específicas de expresión de erGAP3 en músculo estriado.

La funcionalidad de los nuevos sensores, erGAP2 y erGAP3, se probó en los distintos sistemas de los ratones transgénicos. Con estos datos se pudo observar que los distintos tipos celulares pueden contener diferentes $[Ca^{2+}]_{RE}$ basales. Por ejemplo, los monocitos y las neuronas, que tienen una $[Ca^{2+}]_{RE}$ basal muy diferente, de 150 y 760 μM, respectivamente (ver **Figuras 44** y **45**). La respuesta a agonistas fue también muy variable dependiendo del tipo celular.

Los **monocitos** (**Figura 44**) sólo respondieron con vaciado del RE a la estimulación con ATP (que atrae a los monocitos hacia las células apoptóticas, a las que fagocitan) y con cafeína (un estímulo no fisiológico). Como era de esperar, no encontramos ninguna respuesta a los agonistas colinérgicos ni a los lipopolisacáridos, ya que estos agonistas activan la expresión genética a través de cascadas de quinasas (De Nardo, 2015). Tampoco respondieron a la histamina, probablemente porque se une a receptores no acoplados a proteínas G (Hill, 1990). La diferencia entre el cociente normalizado R/R_0 a nivel basal y el correspondiente en el vaciado total en los monocitos es bajo (de un 20%), probablemente debido a que la $[Ca^{2+}]_{RE}$ basal es baja (150 - 200 μM), como se ve al calibrar la señal fluorescente.

En los **islotes de Langerhans** (**Figura 47**) el aumento de la $[Ca^{2+}]_C$ inducido por alta concentración de glucosa extracelular no va acompañado de una disminución de la $[Ca^{2+}]_{RE}$. Esto indica que estos los picos de la $[Ca^{2+}]_C$ de las células del páncreas endocrino no son debidos a liberación desde el RE. En puridad, el aumento de la $[Ca^{2+}]_C$ se correlaciona con un aumento de la $[Ca^{2+}]_{RE}$, sugiriendo que el aumento de la $[Ca^{2+}]_C$ (que probablemente resulta de la entrada de Ca^{2+} extracelular) estimula la SERCA y el Ca^{2+} es captado por el RE. Esta interpretación está apoyada también por los efectos del alto K^+. El alto K^+ despolariza la membrana, lo que provoca la apertura de canales de Ca^{2+}, con entrada de Ca^{2+} y aumento de la $[Ca^{2+}]_C$. Esta entrada no produce liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR), sino aumento de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ por captación desde el citosol. Así pues, no parece existir un mecanismo amplificador a través de CICR u otro mecanismo de liberación desde el RE en este tejido, sino que las oscilaciones parecen debidas enteramente a entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes de la membrana plasmática, lo cual, por otro lado, no discrepa de la descripción más aceptada del acoplamiento excitación-secreción en los islotes de Langerhans (Ashcroft y cols., 1994).

Como ya se ha mencionado, en las dos líneas existentes de ratones transgénicos para erGAP3 el patrón de expresión dentro de un mismo órgano puede ser diferente en cada una de ellas. El ejemplo más claro lo obtuvimos con la **hipófisis**, en la que un gran porcentaje de las células eran fluorescentes en la línea 1, mientras que en la línea 10 el porcentaje de células fluorescentes es claramente inferior (**Figura 48**). En los ensayos funcionales se ha visto que algunas hormonas hipotalámicas (TRH y LHRH) desencadenan el vaciamiento de RE en algunas de las estirpes celulares de la hipófisis, mientras que otras hormonas liberadoras, como la GHRH, no afectan al contenido del Ca^{2+} reticular, sino que disparan otras rutas de señalización que no implican el vaciamiento del RE. El alto K^+ provoca, por despolarización, la apertura de los VOC en las células hipofisarias, permitiendo la entrada del Ca^{2+} desde el medio extracelular al citosol, desde donde lo capta en el RE, que se rellena por encima de la $[Ca^{2+}]$ basal transitoriamente; al retirar el estímulo $[Ca^{2+}]_{RE}$ tiende a volver a la basal. Por lo tanto, y al igual que en los islotes de Langerhans, en este órgano no se da la potenciación de la señal de Ca^{2+} citosólico a través de CICR (**Figura 49**).

Otro tejido de gran interés para el estudio del Ca^{2+} reticular es el **hipocampo**. En los cultivos neuronales mixtos de hipocampo (**Figura 45**) erGAP2 registró liberaciones de Ca^{2+} desde el RE tras la estimulación con cafeína o con glutamato. Como se ve en la práctica totalidad de los resultados, la cafeína produjo un potente vaciamiento del RE en casi todas las células estudiadas, especialmente en presencia del inhibidor de la SERCA. El glutamato es un neurotransmisor que puede actuar a través de receptores ionotrópicos o metabotrópicos (revisado por (Niswender y Conn, 2010; Traynelis y cols., 2010)) y que, en general, produjo liberaciones de Ca^{2+} reticular de menor intensidad. Sin embargo, se pueden observar célula a célula los distintos niveles de vaciado provocados por el neurotransmisor. La diferencia entre el cociente normalizado, R/R_0, medido a nivel basal y en el vaciado total en estas células es amplio, siendo la señal basal de hasta 5 veces mayor que en el vaciamiento total, seguramente debido a una mayor $[Ca^{2+}]_{RE}$ basal (de 760 μM) respecto a otras células como los monocitos.

Los cultivos disociados de **hipocampo** permiten captar imágenes de fluorescencia con buena resolución, pero tienen la desventaja de que no mantienen la estructura tridimensional con todos los circuitos neuronales existentes en el tejido del que proceden; igualmente, las conexiones originales se pierden. Por estas razones, hemos abordado el comportamiento de los nuevos sensores en una preparación del tejido intacto, como es la rodaja aguda de hipocampo del ratón transgénico para erGAP. Al contrario que en los islotes de Langerhans o la hipófisis, en las rodajas de hipocampo se observa la potenciación de la señal de Ca^{2+} por CICR, ya que al aplicar alto K^+, disminuye la $[Ca^{2+}]_{RE}$. La secuencia de eventos sería, en este caso: despolarización por K^+, entrada de Ca^{2+}, aumento de $[Ca^{2+}]_C$, liberación de Ca^{2+} desde el RE, disminución de $[Ca^{2+}]_{RE}$. La respuesta a glutamato o al ATP es menos potente y provoca vaciamientos del RE discretos. En las rodajas de las líneas 1 y 10 se monitorizaron simultáneamente la $[Ca^{2+}]_C$ y la $[Ca^{2+}]_{RE}$ con Rhod-3 y erGAP3, respectivamente. Coherentemente a lo que describieron Power y Sah (Power y Sah, 2002) observamos que sólo la región CA1 respondía a acetilcolina con un vaciamiento del RE, mientras que las otras regiones del hipocampo no respondieron a este neurotransmisor. El aumento de la $[Ca^{2+}]_C$ tras la estimulación con ACh alcanza su máximo antes de completarse el vaciamiento (ver descenso de $[Ca^{2+}]_{ER}$ en la **Figura 51**). Este

hecho, a primera vista paradójico es, sin embargo, esperable. El Ca^{2+} citosólico está siendo aclarado continuamente por la mitocondria y otros orgánulos, y por la bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA). De este modo, si la velocidad de vaciamiento del RE cae por debajo de la velocidad de aclaramiento por los otros orgánulos la $[Ca^{2+}]_C$ disminuye aun cuando la $[Ca^{2+}]_{RE}$ siga bajando.

El principal objetivo de expresar un sensor de Ca^{2+} en un animal transgénico es poder realizar medidas *in vivo*. Desde los estudios pioneros de Ringer en el corazón de rana (Ringer, 1883), es bien conocido que el músculo cardiaco necesita Ca^{2+} para la contracción. En el músculo esquelético el Ca^{2+} necesario para la contracción procede del RE, de donde se libera en respuesta a la despolarización de la membrana plasmática y el sistema T por activación del receptor de rianodina tipo 1. El estudio de Rudolf y colaboradores (Rudolf y cols., 2006) ha sido el primero en medir con un GECI el Ca^{2+} directamente en el RS del músculo estriado de ratón *in vivo.* Se utilizó, en concreto, el camaleón D1ER, con el que se registraron bajadas de $[Ca^{2+}]_{RE}$. Sin embargo, la calibración de la señal era un poco retorcida, ya que a pesar de que el D1ER tiene dos K_ds (0.8 y 60 μM), los investigadores alegaban que el sensor poseía una mayor y única K_d *in situ* (200 μM), y asumían que el sensor estaba saturado en condiciones basales, y que por tanto, la señal basal es la R_{max}. También el CatchER se empleó para medir $[Ca^{2+}]$ en el RS de músculo (Tang y cols., 2011), aunque en experimentos más simples, ya que se utilizan fibras aisladas, y no se muestran registros de las variaciones de la $[Ca^{2+}]$ durante la aplicación de un protocolo de estímulos, sino la correlación de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ basal con respecto al voltaje aplicado a las fibras. Otro GECI de baja afinidad dirigido al RS de células musculares fue el GCaMPer (Henderson y cols., 2015), con el que se midieron las variaciones de $[Ca^{2+}]_{RE}$ en cardiomiocitos disociados.

El estudio de los **músculos estriados** en moscas es más sencillo que en ratón, utilizando el mecanismo de estimulación fisiológico a través de las motoneuronas (Allen y Godenschwege, 2010), Es también una gran ventaja, la disponibilidad de sistemas de expresión específicas en el músculo estriado con el sistema UAS:GAL4 y el promotor Mhc (Schuster y cols., 1996). Los músculos indirectos del vuelo funcionan mediante un mecanismo de contracción quasi-isométrica, que se basa en la contracción del músculo sin que se acorte notablemente su longitud, lo cual genera una tensión que imprime el movimiento vibratorio a las alas (Taylor y cols.,

1999). Esto es una ventaja para realizar los experimentos de fluorescencia, ya que al no haber acortamiento muscular se producen menos artefactos de contracción. Se realizó un protocolo de tres trenes de impulsos despolarizantes a diferentes frecuencias, con los que se pudo demostrar que a cada estímulo el RS liberaba Ca^{2+}, ya que las dos longitudes de onda de GAP cambiaban de forma especular. A pesar de que el mecanismo de contracción de los músculos indirectos del vuelo de los insectos es un proceso mecánico más complejo que el de los músculos de mamífero, la aportación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico sigue siendo indispensable para la iniciación de la contracción. Esto se observa con cada vaciado reticular que se produce cada vez que las motoneuronas estimuladas eléctricamente envían un impulso nervioso. Esto se correspondió con los incrementos de calcio citosólico, como se confirmó con las moscas transgénicas de GCaMP3 expresada en el citosol de los músculos. Se descartó que los cambios obtenidos fueran debidos a artefactos provocados por el movimiento de los músculos, realizando los mismos protocolos en moscas transgénicas para la proteína pmGFP, no sensible a Ca^{2+}, expresada en músculo, donde no se observaron cambios de fluorescencia. Así pues, cada estímulo de las motoneuronas resultó en una liberación quantal de Ca^{2+} desde el RS. La liberación es rápida, completándose en menos de 0.1 s, mientras que el aclaramiento es más lento, con un $t_{1/2}$ de entre 0.5 y 1 s. Como consecuencia, cuando la frecuencia de descarga de las motoneuronas es alta (1 Hz o más) sucede una fusión de las contracciones del músculo, desarrollándose más tensión, y puede graduarse esta tensión desarrollada por el músculo a partir de la frecuencia de estimulación.

CONCLUSIONES

Puede parecer raro que un relato empiece por el final, pero todos los finales son también comienzos, lo que pasa es que no lo sabemos en su momento.

Mitch Albom

1. In this work we have designed, constructed and tested a new family of genetically-encoded fluorescent protein probes optimized for measuring the high Ca^{2+} concentrations found inside organelles such as the endoplasmic reticulum or the Golgi apparatus of living cells.

2. We developed an original methodology for small scale bacterial synthesis and plate reader screening of different mutants of a GFP-Aequorin fusion protein (GAP). Among 22 mutants tested, the one carrying D24N/D119A mutations, called GAP2, had a suitable Ca^{2+} affinity with a $K_d > 0.1$ mM.

3. GAP2 had two excitation maxima, at 405 and 470 nm, and one emission peak at 510 nm. The ratio of the excitation fluorescences (F_{470}/F_{405}) increased gradually with the Ca^{2+} concentration, and this enables to perform ratiometric measurements and to calibrate them in $[Ca^{2+}]$. Calibration follows the Hill function with a dynamic range (R_{max}/R_{min}) of about 3, a K_d of 400-500 µM, and a Hill coefficient of 1. This makes GAP2 calibration much simpler than for other existing probes. A variant (called GAP3) with codon optimization for human expression and carrying mutations L15Q/I167V/S175G/D180Y for fluorescence increase had the same properties as GAP2 and can be used interchangeably.

4. GAP2 fluorescence was neither affected by pH within the range 6.5 to 8.5, nor by Mg^{2+} in the range 0.1-5 mM, and was quite resistant to photobleaching. These properties, together with the capability for ratiometric measurements, makes GAP2 suitable for performing $[Ca^{2+}]$ measurements inside high-Ca^{2+} intracellular organelles, such as ER or Golgi apparatus. Both GAP2 and GAP3 were successfully targeted to ER (erGAP) and to the Golgi apparatus (tgoGAP) in several cell lines, where they were able to monitor changes induced by physiological stimuli.

5. In order to provide a proof of concept for the use of GAP in living animals, transgenic mice expressing erGAP2 and erGAP3 under the control of a ubiquitous promoter were created. The sensors were expressed in most of the tissues with no phenotypic anomalies caused by the constitutive expression of the transgene. The three lines of transgenic mice studied behaved normally, were fertile, and

had normal longevity. This outcome demonstrates the orthogonal character of these sensors, with no interference with the endogenous calcium-binding proteins, as one would expect from the distant phylogenetic origin of the proteins used to construct our probe.

6. Using cells, tissues or organs from the transgenic mice, we have been able to measure $[Ca^{2+}]_{ER}$ and their changes induced by physiological agonists both in cells in primary culture (monocytes, mixed hippocampal neurons and glia), and under the more physiological *ex vivo* condition (Langerhans pancreatic islets, hypophysis, hippocampal slices). In all the cases our results conformed to the known physiological paradigms.

7. We have created transgenic flies with specific expression of erGAP3 in the sarcoplasmic reticulum (SR) of skeletal muscle. Using these flies we have been able to measure $[Ca^{2+}]_{SR}$ baseline levels *in vivo* as well as to monitor changes that follow motor neuron stimulation in the living animal. At low-frequency stimulation (0.25 Hz), each stimulus of the motor neurons caused a rapid, quantal-like, release of Ca^{2+} from the sarcoplasmic reticulum. The release was completed in less than 0.1 s and was followed by reuptake with a $T_{1/2}$ of 0.5-1 s. High-frequency stimulation (> 4 Hz) resulted in the summation of the elementary SR release events with a larger SR emptying and a bigger $[Ca^{2+}]_C$ rise.

BIBLIOGRAFÍA

¿Qué diablos haríamos sin nuestras bibliotecas?

Katherine Hepburn

Ai HW (2015) Fluorescent-protein-based probes: general principles and practices. Anal Bioanal Chem 407:9-15.

Akerboom J, Carreras Calderon N, Tian L, Wabnig S, Prigge M, Tolo J, Gordus A, Orger MB, Severi KE, Macklin JJ, Patel R, Pulver SR, Wardill TJ, Fischer E, Schuler C, Chen TW, Sarkisyan KS, Marvin JS, Bargmann CI, Kim DS, Kugler S, Lagnado L, Hegemann P, Gottschalk A, Schreiter ER, Looger LL (2013) Genetically encoded calcium indicators for multi-color neural activity imaging and combination with optogenetics. Front Mol Neurosci 6:2.

Akerboom J, Chen TW, Wardill TJ, Tian L, Marvin JS, Mutlu S, Calderon NC, Esposti F, Borghuis BG, Sun XR, Gordus A, Orger MB, Portugues R, Engert F, Macklin JJ, Filosa A, Aggarwal A, Kerr RA, Takagi R, Kracun S, Shigetomi E, Khakh BS, Baier H, Lagnado L, Wang SS, Bargmann CI, Kimmel BE, Jayaraman V, Svoboda K, Kim DS, Schreiter ER, Looger LL (2012) Optimization of a GCaMP Calcium Indicator for Neural Activity Imaging. J Neurosci 32:13819-13840.

Allen MJ, Godenschwege TA (2010) Electrophysiological recordings from the Drosophila giant fiber system (GFS). Cold Spring Harb Protoc 2010:pdb prot5453.

Alonso-Torre SR, Trautmann A (1993) Calcium responses elicited by nucleotides in macrophages. Interaction between two receptor subtypes. J Biol Chem 268:18640-18647.

Alonso MT, Barrero MJ, Carnicero E, Montero M, Garcia-Sancho J, Alvarez J (1998) Functional measurements of [Ca2+] in the endoplasmic reticulum using a herpes virus to deliver targeted aequorin. Cell Calcium 24:87-96.

Ashcroft FM, Proks P, Smith PA, Ammala C, Bokvist K, Rorsman P (1994) Stimulus-secretion coupling in pancreatic beta cells. J Cell Biochem 55 Suppl:54-65.

Ashcroft FM, Rorsman P (1989) Electrophysiology of the pancreatic beta-cell. Prog Biophys Mol Biol 54:87-143.

Ashworth R, Hinkle PM (1996) Thyrotropin-releasing hormone-induced intracellular calcium responses in individual rat lactotrophs and thyrotrophs. Endocrinology 137:5205-5212.

Aulestia FJ, Alonso MT, Garcia-Sancho J (2015) Differential calcium handling by the cis and trans regions of the Golgi apparatus. Biochem J 466:455-465.

Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY (1999) Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 96:11241-11246.

Bakayan A, Domingo B, Miyawaki A, Llopis J (2015) Imaging Ca(2+) activity in mammalian cells and zebrafish with a novel red-emitting aequorin variant. Pflugers Arch 467:2031-2042.

Bakayan A, Vaquero CF, Picazo F, Llopis J (2011) Red fluorescent protein-aequorin fusions as improved bioluminescent Ca2+ reporters in single cells and mice. PLoS One 6:e19520.

Baker PF, Hodgkin AL, Ridgway EB (1971) Depolarization and calcium entry in squid giant axons. J Physiol 218:709-755.

Barrero MJ, Montero M, Alvarez J (1997) Dynamics of [Ca2+] in the endoplasmic reticulum and cytoplasm of intact HeLa cells. A comparative study. J Biol Chem 272:27694-27699.

Baubet V, Le Mouellic H, Campbell AK, Lucas-Meunier E, Fossier P, Brulet P (2000) Chimeric green fluorescent protein-aequorin as bioluminescent Ca2+ reporters at the single-cell level. Proc Natl Acad Sci U S A 97:7260-7265.

Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, Plovanich M, Belcher-Timme CA, Sancak Y, Bao XR, Strittmatter L, Goldberger O, Bogorad RL, Koteliansky V, Mootha VK (2011) Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. Nature 476:341-345.

Berridge MJ (1998) Neuronal calcium signaling. Neuron 21:13-26.

Berridge MJ (2014) Cell Signalling Biology.

Bird GS, Aziz O, Lievremont JP, Wedel BJ, Trebak M, Vazquez G, Putney JW, Jr. (2004) Mechanisms of phospholipase C-regulated calcium entry. Curr Mol Med 4:291-301.

Bischof J, Maeda RK, Hediger M, Karch F, Basler K (2007) An optimized transgenesis system for Drosophila using germ-line-specific phiC31 integrases. Proc Natl Acad Sci U S A 104:3312-3317.

Brand AH, Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. Development 118:401-415.

Brini M, Cali T, Ottolini D, Carafoli E (2013) The plasma membrane calcium pump in health and disease. FEBS J 280:5385-5397.

Butanda-Ochoa A, Hojer G, Morales-Tlalpan V, Diaz-Munoz M (2006) Recognition and activation of ryanodine receptors by purines. Curr Med Chem 13:647-657.

Campbell AK (1974) Extraction, partial purification and properties of obelin, the calcium-activated luminescent protein from the hydroid Obelia geniculata. Biochem J 143:411-418.

Campbell RE, Tour O, Palmer AE, Steinbach PA, Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY (2002) A monomeric red fluorescent protein. Proc Natl Acad Sci U S A 99:7877-7882.

Catterall WA (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca2+ channels. Annu Rev Cell Dev Biol 16:521-555.

Chattopadhyaya R, Meador WE, Means AR, Quiocho FA (1992) Calmodulin structure refined at 1.7 A resolution. J Mol Biol 228:1177-1192.

Chen Q, Cichon J, Wang W, Qiu L, Lee SJ, Campbell NR, Destefino N, Goard MJ, Fu Z, Yasuda R, Looger LL, Arenkiel BR, Gan WB, Feng G (2012) Imaging neural activity using Thy1-GCaMP transgenic mice. Neuron 76:297-308.

Chen Y, Song X, Ye S, Miao L, Zhu Y, Zhang RG, Ji G (2013) Structural insight into enhanced calcium indicator GCaMP3 and GCaMPJ to promote further improvement. Protein Cell 4:299-309.

Clapham DE (2007) Calcium signaling. Cell 131:1047-1058.

Cobbold PH, Rink TJ (1987) Fluorescence and bioluminescence measurement of cytoplasmic free calcium. Biochem J 248:313-328.

Cowen DS, Lazarus HM, Shurin SB, Stoll SE, Dubyak GR (1989) Extracellular adenosine triphosphate activates calcium mobilization in human phagocytic leukocytes and neutrophil/monocyte progenitor cells. J Clin Invest 83:1651-1660.

Crameri A, Whitehorn EA, Tate E, Stemmer WP (1996) Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. Nat Biotechnol 14:315-319.

Crompton M, Kunzi M, Carafoli E (1977) The calcium-induced and sodium-induced effluxes of calcium from heart mitochondria. Evidence for a sodium-calcium carrier. Eur J Biochem 79:549-558.

Cubitt AB, Heim R, Adams SR, Boyd AE, Gross LA, Tsien RY (1995) Understanding, improving and using green fluorescent proteins. Trends Biochem Sci 20:448-455.

Curie T, Rogers KL, Colasante C, Brulet P (2007) Red-shifted aequorin-based bioluminescent reporters for in vivo imaging of Ca2 signaling. Mol Imaging 6:30-42.

Dajas-Bailador F, Wonnacott S (2004) Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. Trends Pharmacol Sci 25:317-324.

de la Fuente S, Fonteriz RI, de la Cruz PJ, Montero M, Alvarez J (2012) Mitochondrial free [Ca2+] dynamics measured with a novel low-Ca2+-affinity aequorin probe. Biochem J.

De Nardo D (2015) Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. Cytokine 74:181-189.

De Stefani D, Raffaello A, Teardo E, Szabo I, Rizzuto R (2011) A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. Nature 476:336-340.

DeAlmeida VI, Mayo KE (2001) The growth hormone-releasing hormone receptor. Vitam Horm 63:233-276.

Eberhard M, Erne P (1991) Calcium binding to fluorescent calcium indicators: calcium green, calcium orange and calcium crimson. Biochem Biophys Res Commun 180:209-215.

Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, Park D, Woodson RI, Ostankovich M, Sharma P, Lysiak JJ, Harden TK, Leitinger N, Ravichandran KS (2009) Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. Nature 461:282-286.

Emptage N, Bliss TV, Fine A (1999) Single synaptic events evoke NMDA receptor-mediated release of calcium from internal stores in hippocampal dendritic spines. Neuron 22:115-124.

Fabiato A (1983) Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. Am J Physiol 245:C1-14.

Fernandez-Santiago R, Ezquerra M (2016) Epigenetic Research of Neurodegenerative Disorders Using Patient iPSC-Based Models. Stem Cells Int 2016:9464591.

Fernandez de Sevilla D, Nunez A, Borde M, Malinow R, Buno W (2008) Cholinergic-mediated IP3-receptor activation induces long-lasting synaptic enhancement in CA1 pyramidal neurons. J Neurosci 28:1469-1478.

Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel SH, Tanasa B, Hogan PG, Lewis RS, Daly M, Rao A (2006) A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. Nature 441:179-185.

Friel DD, Tsien RW (1992) A caffeine- and ryanodine-sensitive Ca2+ store in bullfrog sympathetic neurones modulates effects of Ca2+ entry on [Ca2+]i. J Physiol 450:217-246.

Furuichi T, Yoshikawa S, Miyawaki A, Wada K, Maeda N, Mikoshiba K (1989) Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P400. Nature 342:32-38.

Gallego-Sandin S, Alonso MT, Garcia-Sancho J (2011) Calcium homoeostasis modulator 1 (CALHM1) reduces the calcium content of the endoplasmic reticulum (ER) and triggers ER stress. Biochem J 437:469-475.

Gees M, Colsoul B, Nilius B (2010) The role of transient receptor potential cation channels in Ca2+ signaling. Cold Spring Harb Perspect Biol 2:a003962.

Gordon S, Dickinson MH (2006) Role of calcium in the regulation of mechanical power in insect flight. Proc Natl Acad Sci U S A 103:4311-4315.

Gorokhovatsky AY, Marchenkov VV, Rudenko NV, Ivashina TV, Ksenzenko VN, Burkhardt N, Semisotnov GV, Vinokurov LM, Alakhov YB (2004) Fusion of Aequorea victoria GFP and aequorin provides their Ca(2+)-induced interaction that results in red shift of GFP absorption and efficient bioluminescence energy transfer. Biochem Biophys Res Commun 320:703-711.

Greer PL, Greenberg ME (2008) From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function. Neuron 59:846-860.

Griesbeck O, Baird GS, Campbell RE, Zacharias DA, Tsien RY (2001) Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications. J Biol Chem 276:29188-29194.

Gross LA, Baird GS, Hoffman RC, Baldridge KK, Tsien RY (2000) The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. Proc Natl Acad Sci U S A 97:11990-11995.

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca2+ indicators with greatly improved fluorescence properties. J Biol Chem 260:3440-3450.

Hao L, Rigaud JL, Inesi G (1994) Ca2+/H+ countertransport and electrogenicity in proteoliposomes containing erythrocyte plasma membrane Ca-ATPase and exogenous lipids. J Biol Chem 269:14268-14275.

Hara M, Bindokas V, Lopez JP, Kaihara K, Landa LR, Jr., Harbeck M, Roe MW (2004) Imaging endoplasmic reticulum calcium with a fluorescent biosensor in transgenic mice. Am J Physiol Cell Physiol 287:C932-938.

Harper JF, Cheung WY, Wallace RW, Huang HL, Levine SN, Steiner AL (1980) Localization of calmodulin in rat tissues. Proc Natl Acad Sci U S A 77:366-370.

Hasan MT, Friedrich RW, Euler T, Larkum ME, Giese G, Both M, Duebel J, Waters J, Bujard H, Griesbeck O, Tsien RY, Nagai T, Miyawaki A, Denk W (2004) Functional fluorescent Ca2+ indicator proteins in transgenic mice under TET control. PLoS Biol 2:e163.

Head JF, Inouye S, Teranishi K, Shimomura O (2000) The crystal structure of the photoprotein aequorin at 2.3 A resolution. Nature 405:372-376.

Heikal AA, Hess ST, Baird GS, Tsien RY, Webb WW (2000) Molecular spectroscopy and dynamics of intrinsically fluorescent proteins: coral red (dsRed) and yellow (Citrine). Proc Natl Acad Sci U S A 97:11996-12001.

Heim N, Griesbeck O (2004) Genetically encoded indicators of cellular calcium dynamics based on troponin C and green fluorescent protein. J Biol Chem 279:14280-14286.

Heim R, Prasher DC, Tsien RY (1994) Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. Proc Natl Acad Sci U S A 91:12501-12504.

Heim R, Tsien RY (1996) Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. Curr Biol 6:178-182.

Hendel T, Mank M, Schnell B, Griesbeck O, Borst A, Reiff DF (2008) Fluorescence changes of genetic calcium indicators and OGB-1 correlated with neural activity and calcium in vivo and in vitro. J Neurosci 28:7399-7411.

Henderson MJ, Baldwin HA, Werley CA, Boccardo S, Whitaker LR, Yan X, Holt GT, Schreiter ER, Looger LL, Cohen AE, Kim DS, Harvey BK (2015) A Low Affinity GCaMP3 Variant (GCaMPer) for Imaging the Endoplasmic Reticulum Calcium Store. PLoS One 10:e0139273.

Hilgemann DW, Yaradanakul A, Wang Y, Fuster D (2006) Molecular control of cardiac sodium homeostasis in health and disease. J Cardiovasc Electrophysiol 17 Suppl 1:S47-S56.

Hill SJ (1990) Distribution, properties, and functional characteristics of three classes of histamine receptor. Pharmacol Rev 42:45-83.

Hofer AM, Machen TE (1993) Technique for in situ measurement of calcium in intracellular inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive stores using the fluorescent indicator mag-fura-2. Proc Natl Acad Sci U S A 90:2598-2602.

Hogan PG, Lewis RS, Rao A (2010) Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. Annu Rev Immunol 28:491-533.

Inouye S, Noguchi M, Sakaki Y, Takagi Y, Miyata T, Iwanaga S, Tsuji FI (1985) Cloning and sequence analysis of cDNA for the luminescent protein aequorin. Proc Natl Acad Sci U S A 82:3154-3158.

Inouye S, Sahara Y (2007) Expression, purification and characterization of a photoprotein, clytin, from Clytia gregarium. Protein Expr Purif 53:384-389.

Ishii K, Hirose K, Iino M (2006) Ca2+ shuttling between endoplasmic reticulum and mitochondria underlying Ca2+ oscillations. EMBO Rep 7:390-396.

Jafarian V, Sariri R, Hosseinkhani S, Aghamaali MR, Sajedi RH, Taghdir M, Hassannia S (2011) A unique EF-hand motif in mnemiopsin photoprotein from Mnemiopsis leidyi: implication for its low calcium sensitivity. Biochem Biophys Res Commun 413:164-170.

Jean-Quartier C, Bondarenko AI, Alam MR, Trenker M, Waldeck-Weiermair M, Malli R, Graier WF (2012) Studying mitochondrial Ca(2+) uptake - a revisit. Mol Cell Endocrinol 353:114-127.

Karasawa S, Araki T, Nagai T, Mizuno H, Miyawaki A (2004) Cyan-emitting and orange-emitting fluorescent proteins as a donor/acceptor pair for fluorescence resonance energy transfer. Biochem J 381:307-312.

Karlin A (1993) Structure of nicotinic acetylcholine receptors. Curr Opin Neurobiol 3:299-309.

Kendall JM, Dormer RL, Campbell AK (1992a) Targeting aequorin to the endoplasmic reticulum of living cells. Biochem Biophys Res Commun 189:1008-1016.

Kendall JM, Sala-Newby G, Ghalaut V, Dormer RL, Campbell AK (1992b) Engineering aequorin to measure Ca2+ in defined compartments of living cells. Biochem Soc Trans 20:144S.

Kendall JM, Sala-Newby G, Ghalaut V, Dormer RL, Campbell AK (1992c) Engineering the CA(2+)-activated photoprotein aequorin with reduced affinity for calcium. Biochem Biophys Res Commun 187:1091-1097.

Kotlikoff MI (2007) Genetically encoded Ca2+ indicators: using genetics and molecular design to understand complex physiology. J Physiol 578:55-67.

Krebs J, Agellon LB, Michalak M (2015) Ca homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling. Biochem Biophys Res Commun 460:114-121.

Kredel S, Oswald F, Nienhaus K, Deuschle K, Rocker C, Wolff M, Heilker R, Nienhaus GU, Wiedenmann J (2009) mRuby, a bright monomeric red fluorescent protein for labeling of subcellular structures. PLoS One 4:e4391.

Kretsinger RH, Nockolds CE (1973) Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. J Biol Chem 248:3313-3326.

Lam AJ, St-Pierre F, Gong Y, Marshall JD, Cranfill PJ, Baird MA, McKeown MR, Wiedenmann J, Davidson MW, Schnitzer MJ, Tsien RY, Lin MZ (2012) Improving FRET dynamic range with bright green and red fluorescent proteins. Nat Methods 9:1005-1012.

Lattanzio FA, Jr., Bartschat DK (1991) The effect of pH on rate constants, ion selectivity and thermodynamic properties of fluorescent calcium and magnesium indicators. Biochem Biophys Res Commun 177:184-191.

Li CJ, Heim R, Lu P, Pu Y, Tsien RY, Chang DC (1999) Dynamic redistribution of calmodulin in HeLa cells during cell division as revealed by a GFP-calmodulin fusion protein technique. J Cell Sci 112 (Pt 10):1567-1577.

Liao CW, Lien CC (2009) Estimating intracellular Ca2+ concentrations and buffering in a dendritic inhibitory hippocampal interneuron. Neuroscience 164:1701-1711.

Liou J, Kim ML, Heo WD, Jones JT, Myers JW, Ferrell JE, Jr., Meyer T (2005) STIM is a Ca2+ sensor essential for Ca2+-store-depletion-triggered Ca2+ influx. Curr Biol 15:1235-1241.

Lissandron V, Podini P, Pizzo P, Pozzan T (2010) Unique characteristics of Ca2+ homeostasis of the trans-Golgi compartment. Proc Natl Acad Sci U S A 107:9198-9203.

Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. Cell 86:147-157.

Llopis J, McCaffery JM, Miyawaki A, Farquhar MG, Tsien RY (1998) Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 95:6803-6808.

Luini A, Lewis D, Guild S, Corda D, Axelrod J (1985) Hormone secretagogues increase cytosolic calcium by increasing cAMP in corticotropin-secreting cells. Proc Natl Acad Sci U S A 82:8034-8038.

Maeda N, Niinobe M, Mikoshiba K (1990) A cerebellar Purkinje cell marker P400 protein is an inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP3) receptor protein. Purification and characterization of InsP3 receptor complex. EMBO J 9:61-67.

Manjarres IM, Chamero P, Domingo B, Molina F, Llopis J, Alonso MT, Garcia-Sancho J (2008) Red and green aequorins for simultaneous monitoring of Ca2+ signals from two different organelles. Pflugers Arch 455:961-970.

Mank M, Griesbeck O (2008) Genetically encoded calcium indicators. Chem Rev 108:1550-1564.

Mank M, Reiff DF, Heim N, Friedrich MW, Borst A, Griesbeck O (2006) A FRET-based calcium biosensor with fast signal kinetics and high fluorescence change. Biophys J 90:1790-1796.

Mank M, Santos AF, Direnberger S, Mrsic-Flogel TD, Hofer SB, Stein V, Hendel T, Reiff DF, Levelt C, Borst A, Bonhoeffer T, Hubener M, Griesbeck O (2008) A genetically encoded calcium indicator for chronic in vivo two-photon imaging. Nat Methods 5:805-811.

Markwardt ML, Kremers GJ, Kraft CA, Ray K, Cranfill PJ, Wilson KA, Day RN, Wachter RM, Davidson MW, Rizzo MA (2011) An improved cerulean fluorescent protein with enhanced brightness and reduced reversible photoswitching. PLoS One 6:e17896.

Marshall CB, Nishikawa T, Osawa M, Stathopulos PB, Ikura M (2015) Calmodulin and STIM proteins: Two major calcium sensors in the cytoplasm and endoplasmic reticulum. Biochem Biophys Res Commun 460:5-21.

Martin R, Cordova C, San Roman JA, Gutierrez B, Cachofeiro V, Nieto ML (2014) Oleanolic acid modulates the immune-inflammatory response in mice with experimental autoimmune myocarditis and protects from cardiac injury. Therapeutic implications for the human disease. J Mol Cell Cardiol 72:250-262.

Matz MV, Fradkov AF, Labas YA, Savitsky AP, Zaraisky AG, Markelov ML, Lukyanov SA (1999) Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. Nat Biotechnol 17:969-973.

Michalak M, Corbett EF, Mesaeli N, Nakamura K, Opas M (1999) Calreticulin: one protein, one gene, many functions. Biochem J 344 Pt 2:281-292.

Minta A, Kao JP, Tsien RY (1989) Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. J Biol Chem 264:8171-8178.

Mishin AS, Subach FV, Yampolsky IV, King W, Lukyanov KA, Verkhusha VV (2008) The first mutant of the Aequorea victoria green fluorescent protein that forms a red chromophore. Biochemistry 47:4666-4673.

Missiaen L, Dode L, Vanoevelen J, Raeymaekers L, Wuytack F (2007) Calcium in the Golgi apparatus. Cell Calcium 41:405-416.

Missiaen L, Van Acker K, Van Baelen K, Raeymaekers L, Wuytack F, Parys JB, De Smedt H, Vanoevelen J, Dode L, Rizzuto R, Callewaert G (2004) Calcium release from the

Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum in HeLa cells stably expressing targeted aequorin to these compartments. Cell Calcium 36:479-487.

Mitra RD, Silva CM, Youvan DC (1996) Fluorescence resonance energy transfer between blue-emitting and red-shifted excitation derivatives of the green fluorescent protein. Gene 173:13-17.

Miyawaki A (2008) Green fluorescent protein glows gold. Cell 135:987-990.

Miyawaki A, Griesbeck O, Heim R, Tsien RY (1999) Dynamic and quantitative Ca2+ measurements using improved cameleons. Proc Natl Acad Sci U S A 96:2135-2140.

Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY (1997) Fluorescent indicators for Ca2+ based on green fluorescent proteins and calmodulin. Nature 388:882-887.

Miyawaki A, Nagai T, Mizuno H (2003) Mechanisms of protein fluorophore formation and engineering. Curr Opin Chem Biol 7:557-562.

Mohseni N, McMillan SC, Chaudhary R, Mok J, Reed BH (2009) Autophagy promotes caspase-dependent cell death during Drosophila development. Autophagy 5:329-338.

Montero M, Brini M, Marsault R, Alvarez J, Sitia R, Pozzan T, Rizzuto R (1995) Monitoring dynamic changes in free Ca2+ concentration in the endoplasmic reticulum of intact cells. EMBO J 14:5467-5475.

Moore GA, McConkey DJ, Kass GE, O'Brien PJ, Orrenius S (1987) 2,5-Di(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone--a novel inhibitor of liver microsomal Ca2+ sequestration. FEBS Lett 224:331-336.

Morise H, Shimomura O, Johnson FH, Winant J (1974) Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of Aequorea. Biochemistry 13:2656-2662.

Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K, Miyawaki A (2002) A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. Nat Biotechnol 20:87-90.

Nagai T, Sawano A, Park ES, Miyawaki A (2001) Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca2+. Proc Natl Acad Sci U S A 98:3197-3202.

Nagai T, Yamada S, Tominaga T, Ichikawa M, Miyawaki A (2004) Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca(2+) by circularly permuted yellow fluorescent proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 101:10554-10559.

Nakai J, Ohkura M, Imoto K (2001) A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein. Nat Biotechnol 19:137-141.

Nakamura K, Zuppini A, Arnaudeau S, Lynch J, Ahsan I, Krause R, Papp S, De Smedt H, Parys JB, Muller-Esterl W, Lew DP, Krause KH, Demaurex N, Opas M, Michalak M (2001) Functional specialization of calreticulin domains. J Cell Biol 154:961-972.

Narayanan N, Xu A (1997) Phosphorylation and regulation of the Ca(2+)-pumping ATPase in cardiac sarcoplasmic reticulum by calcium/calmodulin-dependent protein kinase. Basic Res Cardiol 92 Suppl 1:25-35.

Niswender CM, Conn PJ (2010) Metabotropic glutamate receptors: Physiology, pharmacology, and disease. Ann Rev Pharm Tox 50:295–322.

Nomura M, Inouye S, Ohmiya Y, Tsuji FI (1991) A C-terminal proline is required for bioluminescence of the Ca(2+)-binding photoprotein, aequorin. FEBS Lett 295:63-66.

Ogawa Y (1994) Role of ryanodine receptors. Crit Rev Biochem Mol Biol 29:229-274.

Ohkura M, Matsuzaki M, Kasai H, Imoto K, Nakai J (2005) Genetically encoded bright Ca2+ probe applicable for dynamic Ca2+ imaging of dendritic spines. Anal Chem 77:5861-5869.

Palmer AE, Giacomello M, Kortemme T, Hires SA, Lev-Ram V, Baker D, Tsien RY (2006) Ca2+ indicators based on computationally redesigned calmodulin-peptide pairs. Chem Biol 13:521-530.

Palmer AE, Jin C, Reed JC, Tsien RY (2004) Bcl-2-mediated alterations in endoplasmic reticulum Ca2+ analyzed with an improved genetically encoded fluorescent sensor. Proc Natl Acad Sci U S A 101:17404-17409.

Pedelacq JD, Cabantous S, Tran T, Terwilliger TC, Waldo GS (2006) Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. Nat Biotechnol 24:79-88.

Perz-Edwards RJ, Irving TC, Baumann BA, Gore D, Hutchinson DC, Krzic U, Porter RL, Ward AB, Reedy MK (2011) X-ray diffraction evidence for myosin-troponin connections and tropomyosin movement during stretch activation of insect flight muscle. Proc Natl Acad Sci U S A 108:120-125.

Phillips GN, Jr. (1997) Structure and dynamics of green fluorescent protein. Curr Opin Struct Biol 7:821-827.

Pinton P, Pozzan T, Rizzuto R (1998) The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca2+ store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. EMBO J 17:5298-5308.

Power JM, Sah P (2002) Nuclear calcium signaling evoked by cholinergic stimulation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. J Neurosci 22:3454-3462.

Prasher D, McCann RO, Cormier MJ (1985) Cloning and expression of the cDNA coding for aequorin, a bioluminescent calcium-binding protein. Biochem Biophys Res Commun 126:1259-1268.

Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ (1992) Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. Gene 111:229-233.

Prins D, Michalak M (2011) Organellar calcium buffers. Cold Spring Harb Perspect Biol 3.

Procyshyn RM, Reid RE (1994) A structure/activity study of calcium affinity and selectivity using a synthetic peptide model of the helix-loop-helix calcium-binding motif. J Biol Chem 269:1641-1647.

Ridgway EB, Ashley CC (1967) Calcium transients in single muscle fibres. Biochem Biophys Res Commun 29:229-2234.

Ringer S (1883) A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contract. J Physiol 4:29-42.

Rizzuto R, Brini M, Murgia M, Pozzan T (1993) Microdomains with high Ca2+ close to IP3-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. Science 262:744-747.

Rodriguez-Garcia A, Rojo-Ruiz J, Navas-Navarro P, Aulestia FJ, Gallego-Sandin S, Garcia-Sancho J, Alonso MT (2014) GAP, an aequorin-based fluorescent indicator for imaging Ca2+ in organelles. Proc Natl Acad Sci U S A 111:2584-2589.

Rodriguez-Prados M, Rojo-Ruiz J, Aulestia FJ, Garcia-Sancho J, Alonso MT (2015) A new low-Ca(2+) affinity GAP indicator to monitor high Ca(2+) in organelles by luminescence. Cell Calcium 58:558-564.

Rogers KL, Picaud S, Roncali E, Boisgard R, Colasante C, Stinnakre J, Tavitian B, Brulet P (2007) Non-invasive in vivo imaging of calcium signaling in mice. PLoS One 2:e974.

Romani A, Scarpa A (1992) Regulation of cell magnesium. Arch Biochem Biophys 298:1-12.

Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV, Ohlsen K, Lioudyno M, Zhang S, Safrina O, Kozak JA, Wagner SL, Cahalan MD, Velicelebi G, Stauderman KA (2005) STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca2+ channel function. J Cell Biol 169:435-445.

Royer L, Rios E (2009) Deconstructing calsequestrin. Complex buffering in the calcium store of skeletal muscle. J Physiol 587:3101-3111.

Rudolf R, Magalhaes PJ, Pozzan T (2006) Direct in vivo monitoring of sarcoplasmic reticulum Ca2+ and cytosolic cAMP dynamics in mouse skeletal muscle. J Cell Biol 173:187-193.

Rudolf R, Mongillo M, Magalhaes PJ, Pozzan T (2004) In vivo monitoring of Ca(2+) uptake into mitochondria of mouse skeletal muscle during contraction. J Cell Biol 166:527-536.

Santos RM, Rosario LM, Nadal A, Garcia-Sancho J, Soria B, Valdeolmillos M (1991) Widespread synchronous [Ca2+]i oscillations due to bursting electrical activity in single pancreatic islets. Pflugers Arch 418:417-422.

Satin LS, Kinard TA (1998) Neurotransmitters and their receptors in the islets of Langerhans of the pancreas: what messages do acetylcholine, glutamate, and GABA transmit? Endocrine 8:213-223.

Schuster CM, Davis GW, Fetter RD, Goodman CS (1996) Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. I. Fasciclin II controls synaptic stabilization and growth. Neuron 17:641-654.

Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE, Tsien RY (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from Discosoma sp. red fluorescent protein. Nat Biotechnol 22:1567-1572.

Sharma V, O'Halloran DM (2014) Recent structural and functional insights into the family of sodium calcium exchangers. Genesis 52:93-109.

Shimomura O (1979) Structure of the chromophore of Aequorea green fluorescent protein. FEBS Letters 104:220-222.

Shimomura O (2009) Discovery of green fluorescent protein (GFP) (Nobel Lecture). Angew Chem Int Ed Engl 48:5590-5602.

Shimomura O, Johnson FH (1978) Peroxidized coelenterazine, the active group in the photoprotein aequorin. Proc Natl Acad Sci U S A 75:2611-2615.

Shimomura O, Musicki B, Kishi Y (1988) Semi-synthetic aequorin. An improved tool for the measurement of calcium ion concentration. Biochem J 251:405-410.

Shimomura O, Musicki B, Kishi Y (1989) Semi-synthetic aequorins with improved sensitivity to Ca2+ ions. Biochem J 261:913-920.

Shimomura O, Shimomura A (1985) Halistaurin, phialidin and modified forms of aequorin as Ca2+ indicator in biological systems. Biochem J 228:745-749.

Short AD, Winston GP, Taylor CW (2000) Different receptors use inositol trisphosphate to mobilize Ca(2+) from different intracellular pools. Biochem J 351 Pt 3:683-686.

Siemering KR, Golbik R, Sever R, Haseloff J (1996) Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. Curr Biol 6:1653-1663.

Smit MJ, Leurs R, Bloemers SM, Tertoolen LG, Bast A, De Laat SW, Timmerman H (1993) Extracellular ATP elevates cytoplasmatic free Ca2+ in HeLa cells by the interaction with a 5'-nucleotide receptor. Eur J Pharmacol 247:223-226.

Souslova EA, Belousov VV, Lock JG, Stromblad S, Kasparov S, Bolshakov AP, Pinelis VG, Labas YA, Lukyanov S, Mayr LM, Chudakov DM (2007) Single fluorescent protein-based Ca2+ sensors with increased dynamic range. BMC Biotechnol 7:37.

Stojilkovic SS, Iida T, Merelli F, Torsello A, Krsmanovic LZ, Catt KJ (1991) Interactions between calcium and protein kinase C in the control of signaling and secretion in pituitary gonadotrophs. J Biol Chem 266:10377-10384.

Streb H, Irvine RF, Berridge MJ, Schulz I (1983) Release of Ca2+ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. Nature 306:67-69.

Sutko JL, Ito K, Kenyon JL (1985) Ryanodine: a modifier of sarcoplasmic reticulum calcium release in striated muscle. Fed Proc 44:2984-2988.

Suzuki J, Kanemaru K, Ishii K, Ohkura M, Okubo Y, Iino M (2014) Imaging intraorganellar Ca2+ at subcellular resolution using CEPIA. Nat Commun 5:4153.

Szanda G, Rajki A, Gallego-Sandin S, Garcia-Sancho J, Spat A (2009) Effect of cytosolic Mg2+ on mitochondrial Ca2+ signaling. Pflugers Arch 457:941-954.

Szent-Gyorgyi AG (1975) Calcium regulation of muscle contraction. Biophys J 15:707-723.

Tallini YN, Ohkura M, Choi BR, Ji G, Imoto K, Doran R, Lee J, Plan P, Wilson J, Xin HB, Sanbe A, Gulick J, Mathai J, Robbins J, Salama G, Nakai J, Kotlikoff MI (2006) Imaging cellular signals in the heart in vivo: Cardiac expression of the high-signal Ca2+ indicator GCaMP2. Proc Natl Acad Sci U S A 103:4753-4758.

Tang P, Zhang Y, Chen C, Ji X, Ju F, Liu X, Gan WB, He Z, Zhang S, Li W, Zhang L (2015) In vivo two-photon imaging of axonal dieback, blood flow, and calcium influx with methylprednisolone therapy after spinal cord injury. Sci Rep 5:9691.

Tang S, Wong HC, Wang ZM, Huang Y, Zou J, Zhuo Y, Pennati A, Gadda G, Delbono O, Yang JJ (2011) Design and application of a class of sensors to monitor Ca2+ dynamics in high Ca2+ concentration cellular compartments. Proc Natl Acad Sci U S A.

Taylor KA, Schmitz H, Reedy MC, Goldman YE, Franzini-Armstrong C, Sasaki H, Tregear RT, Poole K, Lucaveche C, Edwards RJ, Chen LF, Winkler H, Reedy MK (1999) Tomographic 3D reconstruction of quick-frozen, Ca2+-activated contracting insect flight muscle. Cell 99:421-431.

Thastrup O, Dawson AP, Scharff O, Foder B, Cullen PJ, Drobak BK, Bjerrum PJ, Christensen SB, Hanley MR (1989) Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. Agents Actions 27:17-23.

Thestrup T, Litzlbauer J, Bartholomaus I, Mues M, Russo L, Dana H, Kovalchuk Y, Liang Y, Kalamakis G, Laukat Y, Becker S, Witte G, Geiger A, Allen T, Rome LC, Chen TW, Kim DS, Garaschuk O, Griesinger C, Griesbeck O (2014) Optimized ratiometric calcium sensors for functional in vivo imaging of neurons and T lymphocytes. Nat Methods 11:175-182.

Thulin E, Andersson A, Drakenberg T, Forsen S, Vogel HJ (1984) Metal ion and drug binding to proteolytic fragments of calmodulin: proteolytic, cadmium-113, and proton nuclear magnetic resonance studies. Biochemistry 23:1862-1870.

Tian L, Hires SA, Mao T, Huber D, Chiappe ME, Chalasani SH, Petreanu L, Akerboom J, McKinney SA, Schreiter ER, Bargmann CI, Jayaraman V, Svoboda K, Looger LL (2009) Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. Nat Methods 6:875-881.

Tischler AS, Dichter MA, Biales B, DeLellis RA, Wolfe H (1976) Neural properties of cultured human endocrine tumor cells of proposed neural crest origin. Science 192:902-904.

Toma S, Chong KT, Nakagawa A, Teranishi K, Inouye S, Shimomura O (2005) The crystal structures of semi-synthetic aequorins. Protein Sci 14:409-416.

Tour O, Adams SR, Kerr RA, Meijer RM, Sejnowski TJ, Tsien RW, Tsien RY (2007) Calcium Green FlAsH as a genetically targeted small-molecule calcium indicator. Nat Chem Biol 3:423-431.

Toyoshima C (2009) How Ca2+-ATPase pumps ions across the sarcoplasmic reticulum membrane. Biochim Biophys Acta 1793:941-946.

Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R (2010) Glutamate receptor ion channels: Structure, regulation, and function. Pharm Rev 62:405–496.

Truong K, Sawano A, Mizuno H, Hama H, Tong KI, Mal TK, Miyawaki A, Ikura M (2001) FRET-based in vivo Ca2+ imaging by a new calmodulin-GFP fusion molecule. Nat Struct Biol 8:1069-1073.

Tse A, Hille B (1992) GnRH-induced Ca2+ oscillations and rhythmic hyperpolarizations of pituitary gonadotropes. Science 255:462-464.

Tsien RY (1981) A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. Nature 290:527-528.

Tsien RY (1989) Fluorescent probes of cell signaling. Annu Rev Neurosci 12:227-253.

Tsien RY (1998) The green fluorescent protein. Annu Rev Biochem 67:509-544.

Tsuji FI, Inouye S, Goto T, Sakaki Y (1986) Site-specific mutagenesis of the calcium-binding photoprotein aequorin. Proc Natl Acad Sci U S A 83:8107-8111.

Valdeolmillos M, Nadal A, Soria B, Garcia-Sancho J (1993) Fluorescence digital image analysis of glucose-induced [Ca2+]i oscillations in mouse pancreatic islets of Langerhans. Diabetes 42:1210-1214.

Van Baelen K, Vanoevelen J, Callewaert G, Parys JB, De Smedt H, Raeymaekers L, Rizzuto R, Missiaen L, Wuytack F (2003) The contribution of the SPCA1 Ca2+ pump to the Ca2+ accumulation in the Golgi apparatus of HeLa cells assessed via RNA-mediated interference. Biochem Biophys Res Commun 306:430-436.

Van Petegem F (2012) Ryanodine receptors: structure and function. J Biol Chem 287:31624-31632.

Verkhratsky A (2005) Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons. Physiol Rev 85:201-279.

Verkhratsky A, Parpura V (2014) Store-operated calcium entry in neuroglia. Neurosci Bull 30:125-133.

Verkhratsky A, Rodriguez JJ, Parpura V (2012) Calcium signalling in astroglia. Mol Cell Endocrinol 353:45-56.

Villalobos C, Alonso-Torre SR, Nunez L, Garcia-Sancho J (1997a) Functional ATP receptors in rat anterior pituitary cells. Am J Physiol 273:C1963-1971.

Villalobos C, Nunez L, Frawley LS, Garcia-Sancho J, Sanchez A (1997b) Multi-responsiveness of single anterior pituitary cells to hypothalamic-releasing hormones: a cellular basis for paradoxical secretion. Proc Natl Acad Sci U S A 94:14132-14137.

Villalobos C, Nunez L, Garcia-Sancho J (1996) Functional glutamate receptors in a subpopulation of anterior pituitary cells. FASEB J 10:654-660.

Villalobos C, Nunez L, Garcia-Sancho J (2004) Anterior pituitary thyrotropes are multifunctional cells. Am J Physiol Endocrinol Metab 287:E1166-1170.

Waldeck-Weiermair M, Alam MR, Khan MJ, Deak AT, Vishnu N, Karsten F, Imamura H, Graier WF, Malli R (2012) Spatiotemporal correlations between cytosolic and mitochondrial Ca(2+) signals using a novel red-shifted mitochondrial targeted cameleon. PLoS One 7:e45917.

Waldeck-Weiermair M, Bischof H, Blass S, Deak AT, Klec C, Graier T, Roller C, Rost R, Eroglu E, Gottschalk B, Hofmann NA, Graier WF, Malli R (2015) Generation of Red-Shifted Cameleons for Imaging Ca(2)(+) Dynamics of the Endoplasmic Reticulum. Sensors (Basel) 15:13052-13068.

Walker AS, Burrone J, Meyer MP (2013) Functional imaging in the zebrafish retinotectal system using RGECO. Front Neural Circuits 7:34.

Ward WW, Cormier MJ (1975) Extraction of Renilla-type luciferin from the calcium-activated photoproteins aequorin, mnemiopsin, and berovin. Proc Natl Acad Sci U S A 72:2530-2534.

Watkins NJ, Campbell AK (1993) Requirement of the C-terminal proline residue for stability of the Ca(2+)-activated photoprotein aequorin. Biochem J 293 (Pt 1):181-185.

Webb SE, Rogers KL, Karplus E, Miller AL (2010) The use of aequorins to record and visualize Ca(2+) dynamics: from subcellular microdomains to whole organisms. Methods Cell Biol 99:263-300.

Wollheim CB, Biden TJ (1986) Second messenger function of inositol 1,4,5-trisphosphate. Early changes in inositol phosphates, cytosolic Ca2+, and insulin release in carbamylcholine-stimulated RINm5F cells. J Biol Chem 261:8314-8319.

Wu J, Abdelfattah AS, Miraucourt LS, Kutsarova E, Ruangkittisakul A, Zhou H, Ballanyi K, Wicks G, Drobizhev M, Rebane A, Ruthazer ES, Campbell RE (2014a) A long Stokes shift red fluorescent Ca2+ indicator protein for two-photon and ratiometric imaging. Nat Commun 5:5262.

Wu J, Prole DL, Shen Y, Lin Z, Gnanasekaran A, Liu Y, Chen L, Zhou H, Chen SR, Usachev YM, Taylor CW, Campbell RE (2014b) Red fluorescent genetically encoded Ca2+ indicators for use in mitochondria and endoplasmic reticulum. Biochem J 464:13-22.

Yang F, Moss LG, Phillips GN, Jr. (1996) The molecular structure of green fluorescent protein. Nat Biotechnol 14:1246-1251.

Zacharias DA, Violin JD, Newton AC, Tsien RY (2002) Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. Science 296:913-916.

Zapata-Hommer O, Griesbeck O (2003) Efficiently folding and circularly permuted variants of the Sapphire mutant of GFP. BMC Biotechnol 3:5.

Zhao Y, Araki S, Wu J, Teramoto T, Chang YF, Nakano M, Abdelfattah AS, Fujiwara M, Ishihara T, Nagai T, Campbell RE (2011) An expanded palette of genetically encoded Ca(2) indicators. Science 333:1888-1891.

Zhou Y, Frey TK, Yang JJ (2009) Viral calciomics: interplays between Ca2+ and virus. Cell Calcium 46:1-17.