



---

**Universidad de Valladolid**

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA  
MOLECULAR Y FISIOLÓGÍA

INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y GENÉTICA  
MOLECULAR (IBGM)

TESIS DOCTORAL:

Heterogeneidad funcional de los  
depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo  
endoplásmico y el aparato de Golgi

Presentada por Francisco J. Aulestia Araya  
para optar al grado de  
Doctor por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:  
Javier García-Sancho Martín  
Dra. María Teresa Alonso Alonso

## Tabla de contenido

RESUMEN.....	5
1 INTRODUCCIÓN.....	6
1.1 Mecanismos que modifican la $[Ca^{2+}]_c$ .....	6
1.2 Mecanismos que aumentan la $[Ca^{2+}]_c$ .....	7
1.2.1 Entrada de $Ca^{2+}$ desde el medio extracelular: VOC, ROC, SOC, TRP y, SMOC. 7	
1.2.2 Liberación de $Ca^{2+}$ desde los depósitos intracelulares: $IP_3R$ , RyR, TPC y canal de fuga ( <i>leak</i> ).....	22
1.3 Mecanismos que disminuyen la $[Ca^{2+}]_c$ .....	30
1.3.1 Bombas (ATPasas) de $Ca^{2+}$ : PMCA, SERCA y SPCA.....	32
1.3.2 Intercambiadores $Na^+/Ca^{2+}$ (NCX) y $Na^+/K^+/Ca^{2+}$ (NCKX). ....	41
1.3.3 El uniportador de $Ca^{2+}$ mitocondrial (MCU).....	43
1.3.4 Proteínas que ligan $Ca^{2+}$ .....	44
1.4 Órgánulos intracelulares y su función como depósitos de $Ca^{2+}$ .....	45
1.4.1 Retículo endoplásmico (RE). ....	45
1.4.2 El aparato de Golgi (Go). ....	49
1.4.3 Síntesis y tráfico de proteínas RE-Go y la señal de $Ca^{2+}$ .....	52
1.4.4 Órgánulos ácidos (lisosomas y vesículas de secreción).....	54
1.4.5 Mitocondrias. ....	56
1.4.6 Heterogeneidad funcional de los depósitos de alto $Ca^{2+}$ .....	56
2 OBJETIVOS. ....	59
3 MATERIALES Y MÉTODOS. ....	60
3.1 Cultivos celulares. ....	60
3.1.1 Células HEK293. ....	60
3.1.2 Células HeLa (Henrieta Lacks). ....	60
3.2 Plásmidos. ....	61
3.2.1 Mantenimiento y propagación de plásmidos.....	61
3.2.2 Vectores de expresión y clonación. ....	61
3.3 Transfecciones celulares.....	66
3.3.1 Generación de las líneas de HeLa estables. ....	66

3.3.2	Transfección celular para medidas de Ca <sup>2+</sup> por bioluminiscencia.....	68
3.4	Medida de la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>RE</sub> y la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>GO</sub> en poblaciones celulares por bioluminiscencia.....	69
3.5	Medida de [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>tGO</sub> en célula única con tgoGAP1.....	72
3.6	Medida de la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>C</sub> con fura-2.....	72
3.7	Técnicas de inmunodetección.....	73
3.7.1	Inmunofluorescencia y análisis de colocalización.....	75
3.7.2	<i>Western blot</i> .....	76
3.7.3	Determinación de la actividad ATPasa de SERCA3.....	76
3.8	Análisis de la expresión génica.....	77
4	RESULTADOS.....	79
4.1	Movilización de Ca <sup>2+</sup> inducida por agonistas en células HeLa y HEK293.....	79
4.2	El subcompartimento resistente a TBH no es un compartimento ácido y ni alcalino.....	83
4.3	El RE presenta un subcompartimento resistente a TBH en células HEK293, pero no en HeLa.....	85
4.4	La SERCA3d es la responsable de la captación de Ca <sup>2+</sup> resistente a TBH.....	90
4.5	Depósitos de Ca <sup>2+</sup> del Aparato de Golgi.....	94
4.6	Las sondas cGoGA y tGoGA son funcionales.....	99
4.7	El tGo contiene un compartimento resistente a tapsigargina (Tg).....	104
4.8	La captación de Ca <sup>2+</sup> resistente a Tg en el tGo tiene alta afinidad por Ca <sup>2+</sup> .....	113
4.9	La recaptación resistente a Tg en el tGo es mediada por la SPCA.....	116
4.10	La necesidad de Ca <sup>2+</sup> para el proceso secretor.....	118
4.11	Medidas preliminares de [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>GO</sub> en célula única usando una nueva sonda fluorescente derivada de la aequorina.....	119
5	DISCUSIÓN.....	122
5.1	Heterogeneidad funcional de los depósitos de Ca <sup>2+</sup> del retículo endoplásmico (RE). 122	
5.2	Heterogeneidad funcional de los depósitos de Ca <sup>2+</sup> del aparato de Golgi (Go). 126	
6	CONCLUSIONES.....	135
7	REFERENCIAS.....	137

**ABREVIATURAS.**

**AA:** Ácido araquidónico.

**ACh:** Acetilcolina.

**Aeq:** Aequorina.

**AGT:**  $\beta$ -1,6-N-acetilglucosamintransferasa.

**AMPA:**  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5metil-4-isoxazol-4-propionato.

**AraC:** Citosina- $\beta$ -D-arabinofuranosido.

**ATP:** Adenosin trifosfato.

**BSA:** Albumina de suero bovino.

**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub>:** Concentración de calcio citosólica.

**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>Go</sub>:** Concentración de calcio del aparato de Golgi.

**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>tGo</sub>:** Concentración de calcio del *trans*-Golgi.

**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>cGo</sub>:** Concentración de calcio del *cis*-Golgi.

**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>RE</sub>:** Concentración del retículo endoplásmico.

**cADPR:** ADP ribosa cíclica.

**CaM:** Calmodulina.

**CaMKII:** Proteína quinasa dependiente de Ca<sup>2+</sup>-calmodulina tipo II.

**CCh:** Carbamilcolina.

**cGo:** *cis*-Golgi.

**cDNA:** Ácido desoxirribonucleico complementario.

**CICR:** Liberación de calcio inducida por calcio.

**CMV:** Citomegalovirus.

**CPA:** Ácido ciclopiazónico.

**Cz:** Celenterazina.

**DAG:** Diacilglicerol.

**DAPI:** 4,6-diamidino-2-fenilindol.

**dem:** desviación estándar de la media.

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium.

**DHP:** Dihidropiridinas.

## **ABREVIATURAS.**

---

**DRG:** Ganglios de la raíz dorsal.

**DTT:** Ditioneitol.

**EE:** Ensayo enzimático.

**eem:** Error estándar de la media.

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético.

**EGTA:** Ácido etilenglicol-bis-( $\beta$ -amino-eti l-éter)-N,N'-tetraacetico.

**GA:** EGFP-aequorina.

**GECI:** Indicador de calcio codificado genéticamente.

**GAP:** Proteína GFP-Aequorina.

**GFP:** Proteína fluorescente verde.

**GM130:** Proteína 130 de *Golgi Matrix*.

**GluR:** Receptor de glutamato.

**Go:** Aparato de Golgi.

**GPN:** glicil-L-fenilalanina 2-naftilamida.

**GT:**  $\beta$ -1,4 N-galactosiltransferasa.

**HBSS:** *Hank's Balanced Salt solution*.

**HRP:** *Horseradish peroxidase protein*.

**HVA:** *High voltage activated*.

**HEPES:** Ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(2 etanosulfónico).

**HSV:** Virus herpes simplex.

**IF:** Inmunofluorescencia.

**IgG:** Inmunoglobulina tipo G.

**IP<sub>3</sub>:** Inositol 1, 4, 5-trifosfato.

**IP<sub>3</sub>R:** Receptor de inositol 1, 4, 5-trifosfato.

**MCU:** Uniportador de calcio mitocondrial.

**MOPS:** Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico.

**MP:** Membrana plasmática.

**NAADP:** Ácido nicotínico-adenin dinucleótido fosfato.

**nAChR:** Receptor de acetilcolina.

- NCKX:** Intercambiador  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+} - \text{K}^+$ .
- NCX:** Intercambiador  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ .
- NE:** Envoltura nuclear.
- NGF:** Factor de crecimiento nervioso.
- NIGER:** Nigericina.
- L:** Luminiscencia al el tiempo t.
- LB:** Luria Broth.
- L<sub>TOTAL</sub>:** Luminiscencia total.
- P2xR:** Receptor de ATP P2x.
- PBS:** Tampón fosfato salino.
- PIP<sub>2</sub>:** Fosfatidil - inositol, 4, 5 – bisfosfato.
- PKA:** Proteína quinasa A.
- PKC:** Proteína quinasa C.
- PLA:** Fosfolipasa A.
- PLC:** Fosfolipasa C.
- PLN:** Fosfolamban.
- PMCA:** ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática.
- PMSF:** Fluoruro de fenilmetil sulfonilo.
- PS:** Presenilina.
- PTP:** Poro de transición mitocondrial.
- PROP:** Propionato.
- Q-PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa, cuantitativa.
- RE:** Retículo endoplásmico.
- ROC:** Canal de calcio operado por receptores.
- RS:** Retículo sarcoplásmico.
- RyR:** Receptor de rianodina.
- SERCA:** ATPasa de calcio del retículo (sarco) endoplásmico.
- SDS:** Dodecilsulfato sódico.
- SFB:** Suero fetal bovino.

## **ABREVIATURAS.**

---

**siRNA:** RNA pequeño de interferencia.

**SMOC:** Canal operado por segundos mensajeros.

**SLN:** Sarcolipina.

**SOC:** Canales operados por depósitos de calcio intracelulares.

**SOCE:** Entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  operada por depósitos intracelulares.

**SPCA:** ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  de la vía secretora.

**STIM:** Molécula de interacción con el estroma.

**t<sub>1/2</sub>:** tiempo de semirelajación.

**TAE:** Tris-acetato-EDTA.

**TBH:** 2, 5-Di (tert-butil)-1,4-benzohidroquinona.

**TBE:** Tampón Tris/Borato/EDTA.

**TBS:** Tampón salino con *Tween*.

**Tg:** Tapsigargina.

**tGo:** *trans*-Golgi.

**TGN:** *Trans Golgi Network*.

**TGN46:** Proteína 46 del *trans Golgi network*.

**TM:** Trans membrana.

**TMA:** Trimetilamina.

**TPC:** *Two pore channel*.

**tRE:** Retículo endoplásmico de transición.

**TRP:** Receptor de potencial transitorio.

***Tween 20:*** Monolaurato de polietilen sorbitan.

**V<sub>0</sub>:** Velocidad inicial.

**VOC:** Canal de calcio operado por voltaje.

**VS:** Vesícula de secreción.

**YFP:** Proteína fluorescente amarilla.

**WB:** *Western blot*.

**RESUMEN.**

En esta Tesis se estudia la dinámica del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) en los principales depósitos intracelulares, retículo endoplásmico (RE) y aparato de Golgi (Go) en dos modelos celulares humanos, las células HEK293 y las HeLa, y su contribución a la génesis de señales de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Se han diseñado y construido tres nuevas sondas de  $\text{Ca}^{2+}$  derivadas de la fotoproteína aequorina con secuencias de direccionalidad que permiten hacer medidas en diferentes microdominios del Go y el RE de las células vivas, tanto por fotoluminiscencia como por fluorescencia.

En el RE de las células HEK293 hemos podido demostrar la coexistencia de dos ATPasas de  $\text{Ca}^{2+}$ , SERCA2b y SERCA3d. Esta última es responsable de un componente atípico de la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  en RE, que es resistente a la tert-butilhidroquinona (TBH) y cuya función es desconocida. El Inositol 1, 4, 5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) es capaz de movilizar el  $\text{Ca}^{2+}$  de este compartimento. Las células HeLa expresan SERCA3 muy escasamente (20 veces menos que las HEK293) y tampoco muestran captación de  $\text{Ca}^{2+}$  resistente a TBH en su RE, de modo que el depósito de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE es homogéneo en las células HeLa. La captación de  $\text{Ca}^{2+}$  resistente a TBH se induce por sobreexpresión de SERCA3d en las células HeLa.

El Go como reservorio de  $\text{Ca}^{2+}$  se ha estudiado con especial detalle utilizando sondas dirigidas específicamente a las zonas *cis* (cGo) y *trans* (tGo) del mismo. Estos compartimentos difieren por su sensibilidad a la taspigargina y a la TBH y por la expresión de la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  de la vía secretora (SPCA1). El cGo es un compartimento homogéneo, capaz de acumular  $\text{Ca}^{2+}$  a concentraciones próximas a 150  $\mu\text{M}$  vía SERCA y con muy poca expresión funcional de la SPCA. El tGo está compuesto por dos subcompartimentos, tGo1 y tGo2. El tGo2 que supone el 75 % de tGo, lo consideramos un compartimento de transición con muy poca expresión de SPCA y un nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  relativamente bajo (40  $\mu\text{M}$ ). El tGo1 supone el 25 % de tGo, posee actividad SPCA y acumula  $\text{Ca}^{2+}$  a gradientes cercanos a 200  $\mu\text{M}$ . La matriz de tGo1 no tiene continuidad difusional con tGo2, por lo que pensamos que podría estar compuesto por vesículas situadas en el extremo más *trans* del Go. La captación de  $\text{Ca}^{2+}$  por tGo1 es de mucha mayor afinidad que en el RE o en los otros compartimentos de Go, por lo que este compartimento mantiene alto su contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  incluso cuando baja el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico a niveles que ocasionan el vaciamiento de los otros depósitos intracelulares. El mantenimiento del alto contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  en este compartimento parece esencial para el procesamiento de proteínas en el Go.



## **1. INTRODUCCIÓN.**

---

### **1 INTRODUCCIÓN.**

#### **La señalización intracelular mediada por calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ).**

Una de las principales ideas unificadora de la Biología es que, a pesar de la enorme diversidad de seres vivos que habitan en la Biosfera, todos ellos están compuestos de células; asimismo, todas las células comparten propiedades de organización estructural y funcional. La adaptación de la célula a los cambios del medio, empleando señales intracelulares que le permita responder a estas variaciones, es una de sus principales propiedades. La señalización intracelular supone la participación de mensajeros cuya concentración varíe a través del tiempo y permita generar respuestas rápidas y específicas.

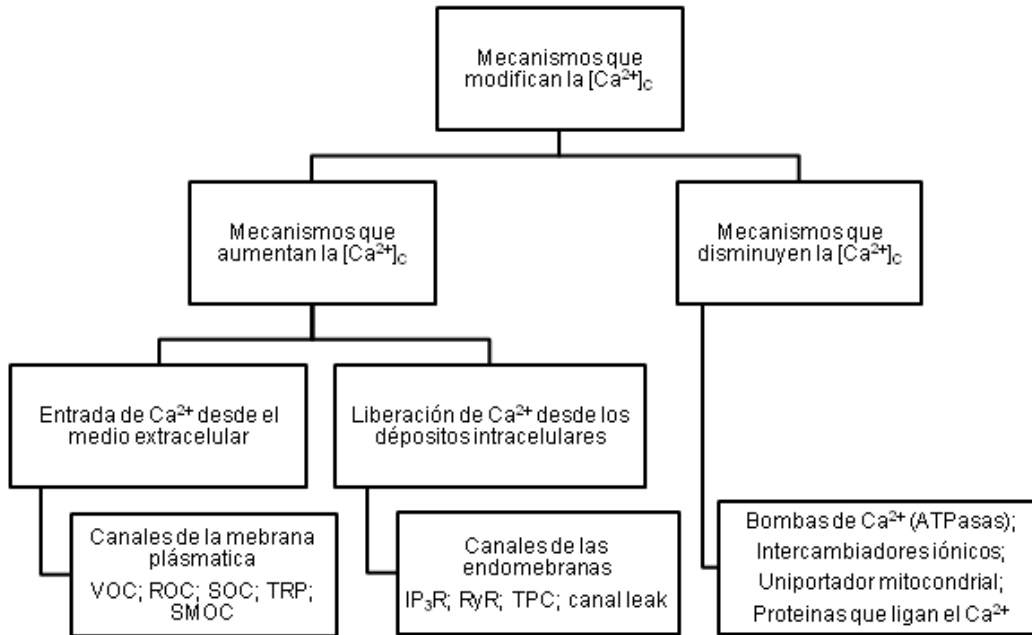
*Lo más bello de la señalización celular es que las diferentes vías de señalización se combinan y adaptan para controlar diversos aspectos de los procesos celulares a muy diferentes escalas y espacios temporales (Berridge, 2012)*

Quien cumple de buena manera este papel de mensajero es el ión calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). La señalización mediada por  $\text{Ca}^{2+}$  resulta clave para múltiples funciones, adaptaciones y respuestas de la célula como la contracción muscular (Tsugorka y cols., 1995), la excitabilidad neuronal (Albensi, 2007), la secreción de neurotransmisores (Maruyama y Petersen, 1994), la muerte celular (Bernardi y Rasola, 2007) y la expresión génica (Dolmetsch y cols., 2001). La señalización intracelular mediada por  $\text{Ca}^{2+}$ , a diferencia de otros mensajeros intracelulares, está controlada por procesos biofísicos. La membrana plasmática facilita la formación de un gradiente electroquímico manteniendo la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ) a niveles de  $10^{-7}$  M. Del mismo modo, en el interior de la célula también se forman gradientes de concentración por la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en los distintos orgánulos. (Clapham, 2007).

#### **1.1 Mecanismos que modifican la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ .**

En la célula existe un equilibrio controlado entre los mecanismos que producen elevaciones de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  y los que la disminuyen (ver Esquema). Las elevaciones de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  son consecuencia de los flujos de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana plasmática y de la liberación desde los orgánulos intracelulares;

mientras que la acción de las ATPasas, los intercambiadores, las proteínas que ligan  $\text{Ca}^{2+}$  y la función tamponadora mitocondrial son responsables de la disminución de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ . La señal transitoria de  $\text{Ca}^{2+}$  (pico de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , **Fig. I1**) es la acción secuencial de los mecanismos que aumentan la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , y los que restauran la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  de reposo (Berridge y cols., 2000; Carafoli, 2004).



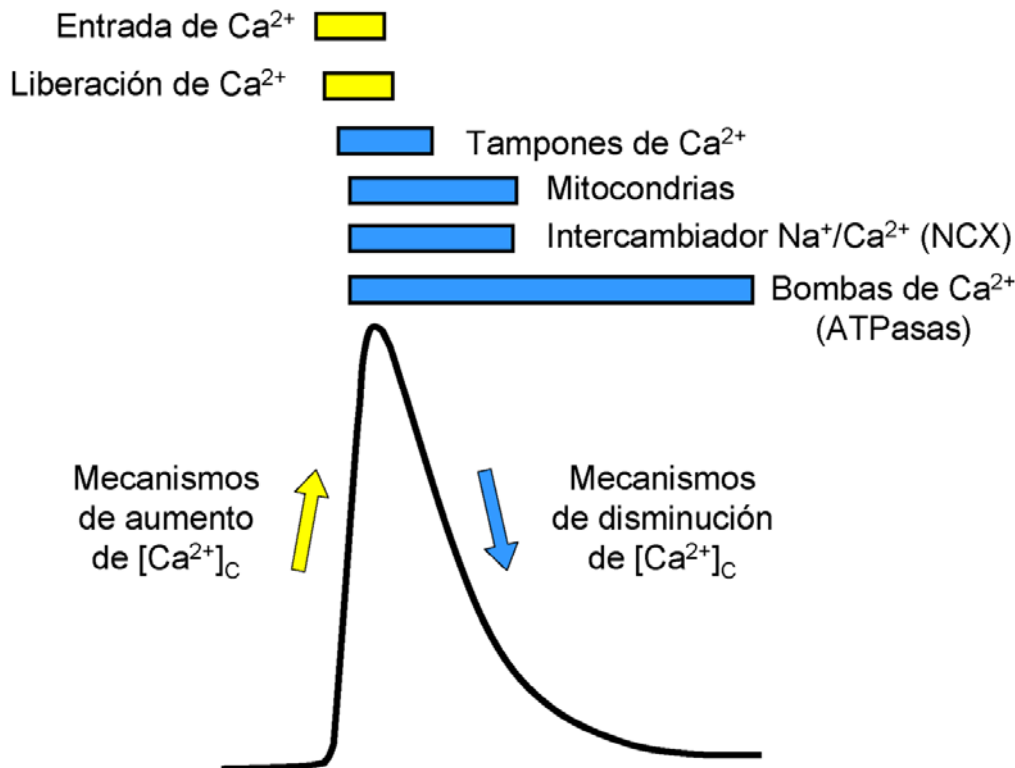
**Esquema-resumen de los mecanismos que modifican la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ .** Mecanismos que aumentan y disminuyen la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ .

## 1.2 Mecanismos que aumentan la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ .

### 1.2.1 Entrada de $\text{Ca}^{2+}$ desde el medio extracelular: VOC, ROC, SOC, TRP y, SMOC.

El gradiente electroquímico de  $\text{Ca}^{2+}$  entre el citosol y el medio extracelular supone una diferencia de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  de cuatro órdenes de magnitud, entre el citosol ( $10^{-7}$  M en condiciones de reposo) y el medio extracelular ( $10^{-3}$  M). Esta diferencia de concentraciones sumada a la diferencia de potencial de la membrana plasmática (negativo en el lado intracelular) y a la acción de un estímulo, permite la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a favor del gradiente electroquímico desde el medio extracelular hacia el citosol a través de distintos canales de  $\text{Ca}^{2+}$  ubicados

## 1. INTRODUCCIÓN.



**Figura 11. Los mecanismos de aumento y disminución de  $\text{Ca}^{2+}$  generan picos transitorios del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (picos de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ).**

La fase de aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  (pico de activación), es producto de la entrada o de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  (barras amarillas) y finaliza con los mecanismos que disminuyen  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ . Una vez que los mecanismos que incrementan  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  han sido inactivados, operan de manera secuencial una serie de reacciones (tampones, captación mitocondrial, intercambiador NCX y ATPasas de  $\text{Ca}^{2+}$  (bombas), de los depósitos intracelulares y de la membrana plasmática), que disminuyen la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  y la llevan a nivel de reposo (barras azules). Durante la fase de aumento del  $\text{Ca}^{2+}$ , éste se une rápidamente a los tampones de  $\text{Ca}^{2+}$  o es absorbido por la mitocondria. Los tampones y la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial ayudan a dar forma a la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  y permiten que se generen transitorios muy rápidos filtrando los efectos tóxicos [figura modificada de (Berridge, 2012)].

en la membrana plasmática. Existen distintos tipos de canales que permiten la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y lo hacen mediante la apertura del propio canal o por la activación de otros más apropiados (entrada secundaria de  $\text{Ca}^{2+}$ ). En esta tesis describimos 5 familias y los clasificamos según los mecanismos que controlan su activación: canales operados por voltaje (**VOCs**<sup>1</sup>), canales operados por receptor (**ROC**s<sup>2</sup>), canales operados por depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares (**SOC**s<sup>3</sup>), canales **TRP**<sup>4</sup> y, finalmente, canales operados por segundos mensajeros (**SMOC**s<sup>5</sup>).

<sup>1</sup> VOC: Voltage Operated Chanel.

<sup>2</sup> ROC: Receptor Operated Chanel.

<sup>3</sup> SOC: Store Operated Chanel.

<sup>4</sup> TRP: Transient receptor potential.

<sup>5</sup> SMOC: Second Messenger Operated Chanel.

### 1.2.1.1 Canales de $\text{Ca}^{2+}$ activados por voltaje (VOCs).

Los VOCs se encuentran en células excitables como las neuronas, las células musculares y las secretoras, y regulan procesos tales como la neurotransmisión, la contracción muscular y la secreción, respectivamente. La despolarización de la membrana plasmática provoca la apertura del canal, lo que permite la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular al citosol siguiendo su gradiente electroquímico. La despolarización mantenida ocasiona, con mayor o menor rapidez dependiendo del subtipo de canal, la inactivación del mismo. De esta forma la repolarización hace que el canal se cierre, impidiendo el paso de  $\text{Ca}^{2+}$ . La repolarización es también necesaria para pasar del estado inactivado al cerrado, concluyendo así el ciclo apertura-cierre. En las células musculares esqueléticas, la despolarización de la membrana determina la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo sarcoplásmico (el equivalente al retículo endoplásmico en el músculo). En el corazón, la activación de los VOCs causa un pequeño aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]$  en las proximidades del retículo sarcoplásmico, que se amplifica por la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  (CICR) en el retículo sarcoplásmico (Bers, 2002; Reuter, 1979; Tsien, 1983).

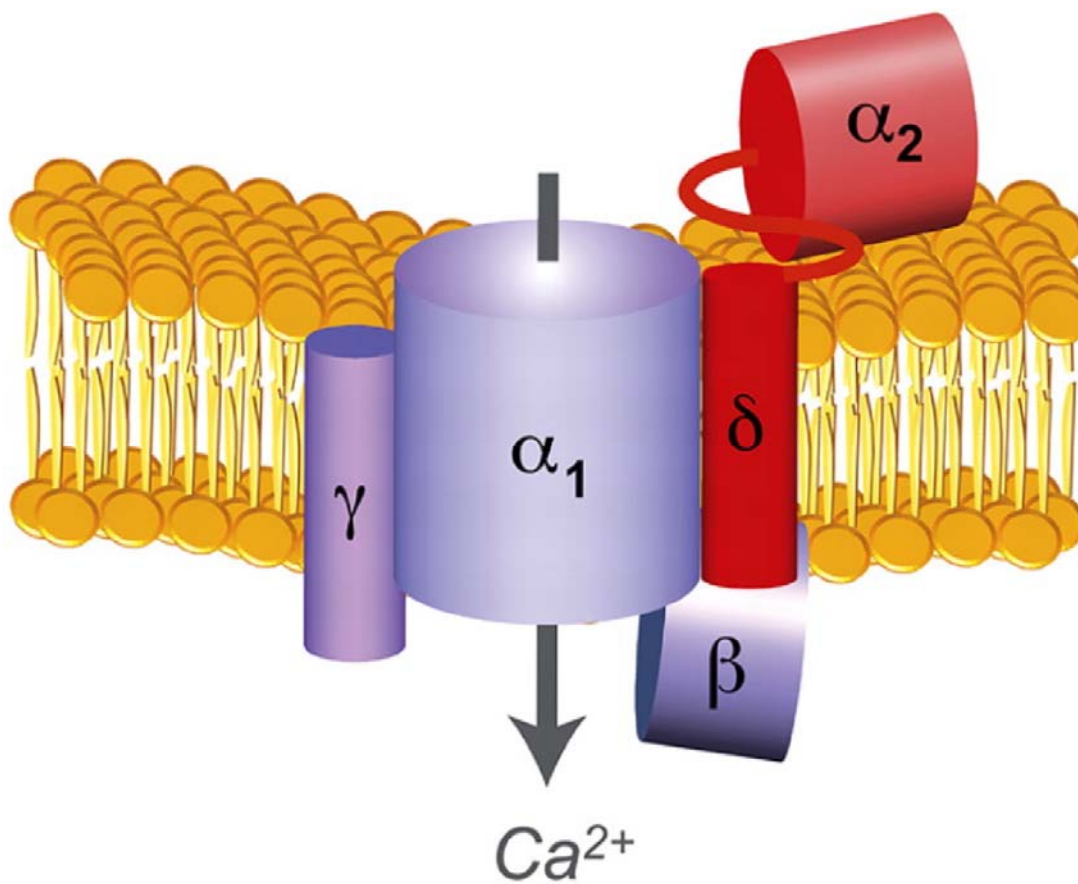
Los VOC están compuestos por múltiples subunidades diferentes ( $\alpha_1$ ,  $\beta$  y  $\alpha_2\delta$ ) (**Fig. I2**). La subunidad  $\alpha_1$  es la principal, la más grande (190 kDa), conforma el poro conductor de iones, y exhibe 6 segmentos transmembrana diferentes (TM 1-6) en donde el dominio TM 4 está altamente conservado y cumple la función de sensor del voltaje (Catterall, 1991). En los mamíferos, la subunidad  $\alpha_1$  está codificada por al menos 10 genes distintos (CACNA1A-J) dando lugar a una gran diversidad de subtipos de subunidades  $\alpha_1$ , que generan una gran variabilidad farmacológica y electrofisiológica. El resto de subunidades ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha_2\delta$ ) también presenta gran diversidad genética, que confiere a los VOC mayor variabilidad, si cabe. La subunidad  $\beta$  tiene un tamaño aproximado de 55 kDa y existen cuatro genes (CACNB 1-4) que la codifican. Es una proteína intracelular que contiene un dominio guanilato quinasa GK, que se une a la subunidad  $\alpha_1$  y regula su actividad, y un dominio SH3. La subunidad  $\gamma$ , de 33 kDa, se compone de cuatro hélices que atraviesan la membrana y existen 8 genes que codifican para esta subunidad (CACNG1-8). La subunidad  $\alpha_2\delta$  está codificada por 4 genes (CACNA2D1-4) (Serysheva y cols., 2002). Tiene una sola región transmembrana con una porción intracelular corta, que sirve para anclar la proteína en la membrana plasmática.

Los distintos tipos de canales activados por voltaje se pueden clasificar según distintos parámetros. Uno de ellos son sus propiedades biofísicas, como la

## 1. INTRODUCCIÓN.

---

cinética de apertura, el umbral de activación, la conductancia y la inactivación. También se clasifican según sus propiedades farmacológicas como la sensibilidad a agonistas o antagonistas. Otro tercer tipo de clasificación es más bien funcional, dividiéndolos en canales con umbral de activación alto o bajo.



**Figura 12. Organización estructural de los canales de  $Ca^{2+}$  voltaje-dependientes (VOC).**

La subunidad  $\alpha_1$  contiene el poro, el sensor de voltaje, los sitios de unión a  $Ca^{2+}$  y los sitios de unión a fármacos moduladores, tales como las dihidropiridinas. La subunidad  $\alpha_2$  contiene numerosos sitios de glicosilación y está unida mediante enlaces disulfuro a la subunidad  $\alpha_2\delta$ , que tiene una sola región de transmembrana. La subunidad  $\gamma$  es otra proteína transmembrana. Por último, hay una subunidad  $\beta$  intracelular, que es diana de algunas de las vías de señalización moduladoras [figura modificada de (Khosravani y Zamponi, 2006)].

En mamíferos hay diez miembros de la familia de los VOCs que han sido caracterizados y se subdividen en tres subfamilias como se describe en la siguiente **Tabla I1** (Catterall, 2011; Catterall y cols., 2005; Ertel y cols., 2000).

**Tabla 1. Clasificación de los VOCs.**

Tipo	Voltaje	Subunidad $\alpha 1$ (nombre del gen)	Sub-unidades asociadas	Muy a menudo encontrada
Canal de calcio tipo L ( <i>"Long Lasting"</i> AKA <i>"DHP Receptor"</i> )	HVA ( <i>High voltage activated</i> ) Umbral de activación -30 mV	Ca <sub>v</sub> 1.1 (CACNA1S) Ca <sub>v</sub> 1.2 (CACNA1C) Ca <sub>v</sub> 1.3 (CACNA1S) Ca <sub>v</sub> 1.4 (CACNA1F)	$\alpha_2\delta$ , $\beta$ , $\gamma$	Músculo esquelético, músculo liso, osteoblastos, miocitos ventriculares (también llamados receptores de DHP), dendritas neuronales de corteza
Canal de calcio tipo P /Q ( <i>"Purkinje"</i> )	HVA ( <i>High voltage activated</i> ) Umbral de activación -30 mV	Ca <sub>v</sub> 2.1 (CACNA1A)	$\alpha_2\delta$ , $\beta$	Neuronas de Purkinje y granos del cerebelo.
Canal de calcio tipo N ( <i>"Neural"/"Non-L"</i> )	HVA ( <i>High voltage activated</i> ) Umbral de activación -30 mV	Ca <sub>v</sub> 2.2 (CACNA1B)	$\alpha_2\delta$ , $\beta_1$ , $\beta_3$ , $\beta_4$ , posiblemente $\gamma$	En todo el cerebro y sistema nervioso periférico
Canal de calcio tipo R ( <i>"Residual"</i> )	<i>Intermediate voltage activated</i> ) Umbral de activación -30 mV	Ca <sub>v</sub> 2.3 (CACNA1E)	$\alpha_2\delta$ , $\beta$ , posiblemente $\gamma$	Células granulares del cerebelo y otras neuronas
Canal de calcio tipo T ( <i>"Transient"</i> )	<i>Low-voltage activated</i> Umbral de activación -60 a -70 mV	Ca <sub>v</sub> 3.1 (CACNA1G) Ca <sub>v</sub> 3.2 (CACNA1H) Ca <sub>v</sub> 3.3 (CACNA1I)		Neuronas, células con actividad marcapaso, osteocitos

## **1. INTRODUCCIÓN.**

---

La nomenclatura unificada de los VOCs se basa en la definida para los canales de  $K^+$ . Los VOCs se denominan utilizando el símbolo químico del principal ion permeable ( $Ca^{2+}$ , Ca) y el principal regulador fisiológico (voltaje, v) como subíndice. Se asigna un número para cada subfamilia de genes de la subunidad  $\alpha_1$  del canal  $Ca_v$  (1 al 3). Por último, dentro de cada subfamilia, se asigna un número en función del orden de descubrimiento.

La familia de  $Ca_v1$  ( $Ca_v1.1$  a  $Ca_v1.4$ ) conduce corrientes de  $Ca^{2+}$  de tipo L (**Tabla 1**) y se caracteriza por su activación dependiente de una gran despolarización (-30 mV). Presenta una elevada conductancia a  $Ca^{2+}$  y una inactivación lenta dependiente de voltaje y son sensibles a dihidropiridinas.

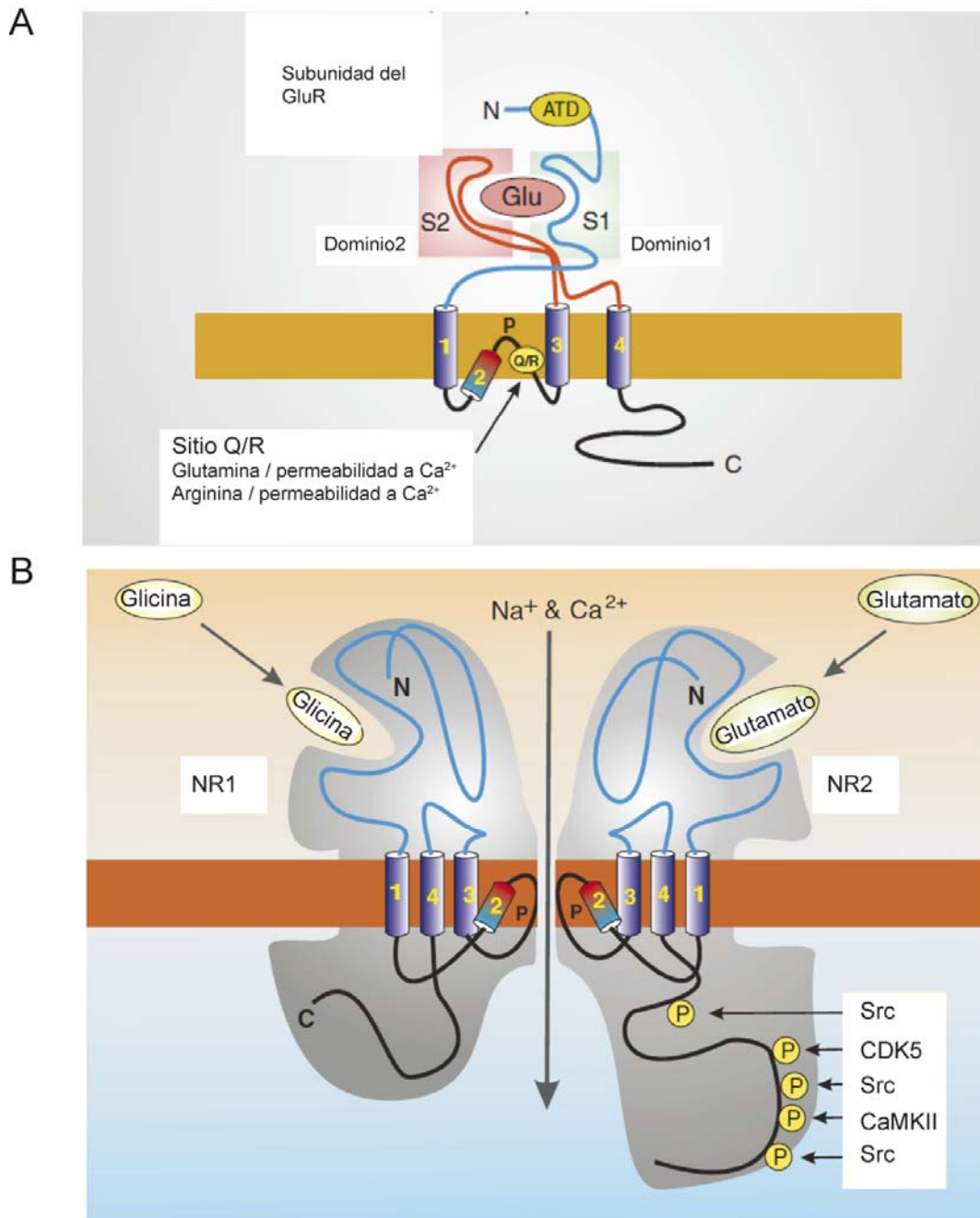
La familia  $Ca_v2$  ( $Ca_v2.1$  a  $Ca_v2.3$ ) conduce corrientes de tipo P/Q, N o R (**Tabla 1**). Se activan como consecuencia de una gran despolarización (-30 mV). Son insensibles a dihidropiridinas pero sensibles a toxinas como la  $\omega$ -conotoxina GVIA, la  $\omega$ -agatoxina VIA y la SNX-482.

La familia  $Ca_v3$  ( $Ca_v3.1$  a  $Ca_v3.3$ ) conduce corrientes de tipo T (**Tabla 1**). Son canales de baja conductancia que se activan por despolarizaciones débiles (-60 a -70 mV) y producen corrientes de corta duración, ya que se inactivan rápidamente. Son insensibles a dihidropiridinas pero sensibles a toxinas tales como la curtoxina y el mibefradil.

### **1.2.1.2 Canales de $Ca^{2+}$ activados por receptor (ROCs).**

La activación de los ROCs está mediada por la unión de un agonista, ya sea hormona, péptido o nucleótido, al propio canal-receptor o bien a un receptor adyacente. Esta activación puede generar cuatro tipos de respuestas: la apertura del canal con la consecuente entrada de  $Ca^{2+}$  al citosol; la entrada de  $Na^+$  y la consecuente despolarización de la membrana y activación secundaria de los VOCs (entrada de  $Ca^{2+}$  secundaria); la generación de un segundo mensajero que, a su vez, activa un canal tipo SMOC; y, en algunos tipos celulares, combinaciones de estas respuestas.

Existen 3 grupos principales de ROC: **el receptor de glutamato (GluR), el receptor de ATP P2X (P2XR) y el receptor nicotínico de acetil colina (nAChR).**



**Figura I3. Organización estructural típica de un receptor de glutamato (GluR) de tipo ionotrópico.**

Los tres subtipos de GluR ionotrópicos, N-metil-D-aspartato (NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilisoazol-4-propiónico (AMPA) y kainato, tienen la misma organización estructural. (A) El receptor funcional es un tetrámero formado por cuatro subunidades homólogas. Cada subunidad contiene cuatro dominios TM y dos dominios extracelulares (a los que se une el glutamato). (B) El NMDAR es un tetrámero compuesto por subunidades NR1 y NR2. La subunidad NR1 presenta una zona de unión a glicina y forma parte del poro. La subunidad NR2 posee una zona de unión a glutamato, forma parte del poro y, a diferencia del NR1, tiene un extremo C-terminal muy largo con numerosos sitios de fosforilación sujetos a la acción de quinasas que regulan la actividad del receptor [figura modificada de (Berridge, 2012)].



## 1. INTRODUCCIÓN.

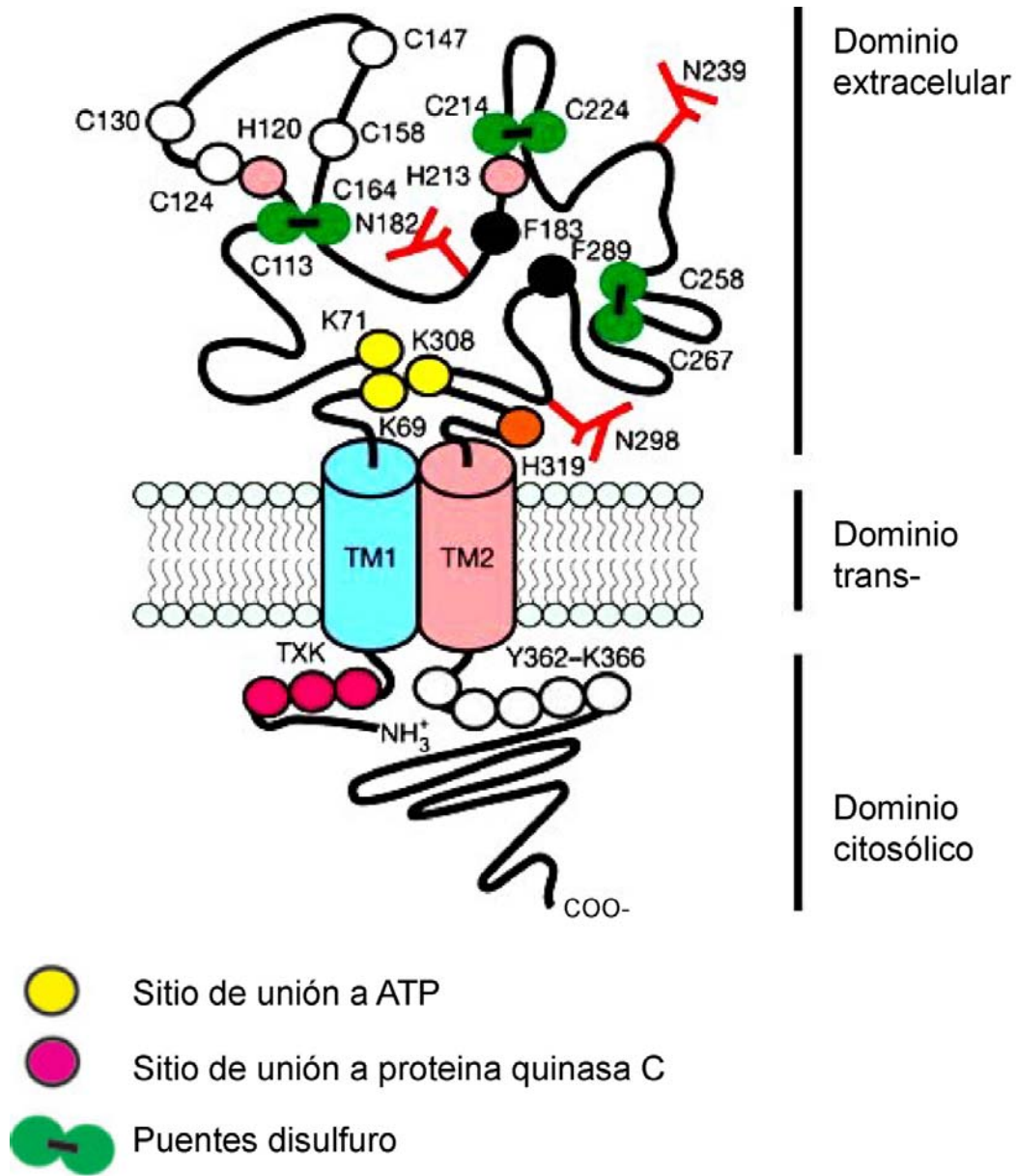
---

Los **receptores ionotrópicos de glutamato (GluR)** (**Fig. I3**) tienen una organización estructural en tetrameros, cada subunidad tiene 4 dominios transmembrana (TM 1-4) y, en el dominio TM 2, se forma el poro. Entre los dominios TM 2 y TM 3 existe una zona llamada Q/R, rica en residuos de glutamina, que determina la permeabilidad a  $\text{Ca}^{2+}$ . El sitio de unión a glutamato está formado por la interacción de dos dominios extracelulares: el 1, que es parte de la región N-terminal del dominio TM 1, y el TM 2, que es parte de la región enlazante entre los dominios TM 3 y TM 4. El extremo C-terminal es citosólico y puede fosforilarse por la proteína quinasa A (PKA) y por la quinasa II dependiente de calcio-calmodulina (CaMKII) (Zhorov y Tikhonov, 2004).

Existen distintas subunidades que al combinarse en forma de tetrámeros puede generar una gran diversidad de canales funcionales distintos. Particularmente la subunidad del sitio de unión a glutamato es variable y puede interactuar con moléculas parecidas a glutamato. De hecho, tres familias de estos receptores toman los nombres de los compuestos que los activan: el N-metil-D-aspartato (**NMDA**), que activa los receptores de NMDA; el  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5metil-4-isoxazol-4-propionato (**AMPA**), que activa los receptores AMPA; y el **kainato**, que activa los receptores de kainato (Stawski y cols., 2010).

Los **receptores de NMDA** son altamente permeables al  $\text{Ca}^{2+}$  y están conformados por dos subunidades NR1, que constituyen esencialmente el poro, y dos subunidades NR2. La apertura del canal depende de la unión del glutamato y la glicina. La glicina se une a la subunidad NR1, mientras que el glutamato interactúa con la subunidad NR2. La apertura del canal consta de dos fases: la primera, en la cual se despolariza la membrana y se elimina el  $\text{Mg}^{2+}$  que bloquea el canal, y la segunda, en la cual el glutamato se une al receptor y el canal se abre. Los receptores de NMDA son muy importantes en las funciones de aprendizaje y la adquisición de memoria (Albensi, 2007; Paoletti y Neyton, 2007).

Los **receptores AMPA** están formados por 4 subunidades (GluR1-4) con distintas propiedades funcionales dependiendo de la combinación de subunidades y con GluR2 como subunidad clave para la permeabilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  (Midgett y Madden, 2008; Nakagawa, 2010; Sukumaran y cols., 2012). Estos canales presentan permeabilidad a  $\text{Na}^+$  que permite la entrada de este catión y la despolarización de la membrana, que finalmente resulta en la activación de los VOC y la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Están localizados principalmente en las sinapsis de neuronas excitatorias y en los astrocitos que forman parte de la sinapsis tripartita.



**Figura I4. Organización estructural del receptor purinérgico P2X1 humano.**

El receptor P2X tiene dos dominios transmembrana, TM 1 y TM 2, con los extremos N y C-terminales que se extienden hacia el citoplasma. Hay un extenso bucle extracelular, que contiene el sitio de unión a ATP, con dos residuos hidrófobos (Phe-185-291), que se unen al anillo de adenina y residuos cargados (Lys-68, Arg-292 y Lys-309) que interactúan con los fosfatos. La integridad estructural del dominio extracelular se mantiene mediante enlaces disulfuro. El extremo N-terminal es citoplásmico y contiene una treonina, que puede ser fosforilada por la proteína quinasa C (PKC). El extremo C-terminal también mira hacia el citoplasma. El canal P2X funcional es una estructura trimérica [figura modificada de (Khakh y North, 2006)].

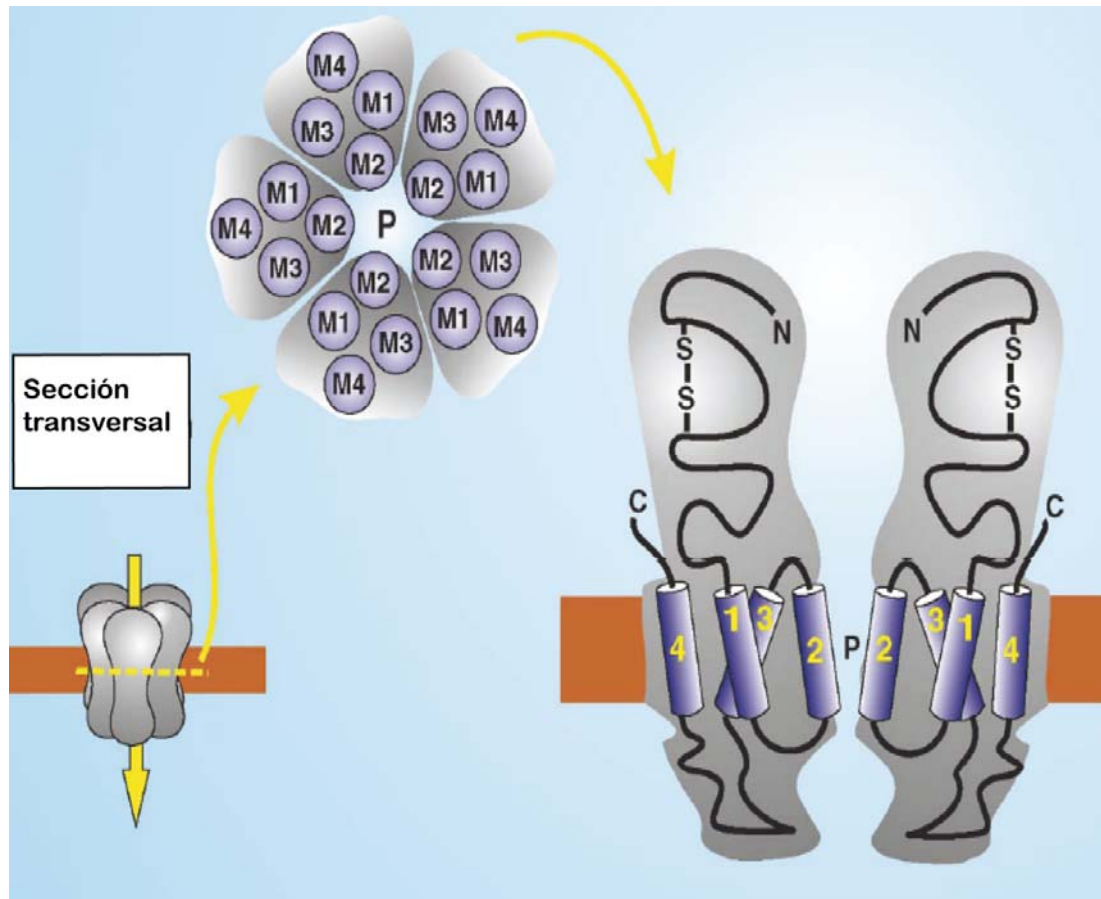
## **1. INTRODUCCIÓN.**

---

Finalmente, los **receptores de kainato** están principalmente distribuidos en el cerebro (corteza, hipocampo y cerebelo). Presentan escasa permeabilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  pero inducen la entrada secundaria de  $\text{Ca}^{2+}$  por activación de los VOC, al igual que los receptores AMPA. Existen cinco tipos de subunidades de receptores de kainato: GluR5, GluR6, GluR7, KA1 y KA2; y que se pueden combinar de distintas maneras para formar tetrámeros. Las subunidades GluR5-7 pueden formar homotetrámeros o heterotetrámeros, mediante combinaciones entre las subunidades GluR y KA. Por el contrario, la subunidades KA1-2 no forman homotetrámeros. La permeabilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  del receptor de kainato depende principalmente de la subunidad GluR6 (Egebjerg y Heinemann, 1993). Por otra parte, a diferencia de los receptores AMPA, los receptores de kainato juegan un papel minoritario en la señalización de las sinapsis; no obstante, participan en la plasticidad sináptica afectando a la respuesta a posteriori de la célula estimulada (Contractor y cols., 2011; Dingledine y cols., 1999; Huettner, 2003).

**Los receptores de ATP de tipo P2X (P2XR) (Fig. I4)** responden a ATP induciendo la entrada directa de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del canal y, mediante despolarización de la membrana, indirectamente, por la apertura de los VOCs. Se han descrito hasta siete subunidades distintas con propiedades diferentes que pueden combinarse formando heterotrimeros. Estos canales se disponen con los dos extremos N- y C-terminal hacia el citosol y con dos dominios transmembrana conectados por un gran bucle extracelular que alberga el sitio de unión al ATP. De modo análogo a los receptores de NMDA, la apertura del canal depende además, de la unión de tres moléculas de glicina (Egan y cols., 2006; Kaczmarek-Hajek y cols., 2012; Vial y cols., 2004).

**Los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) (Fig. I5)** responden a acetilcolina (y a nicotina, pero no a muscarina) y controlan procesos, tanto del sistema nervioso central como del sistema nervioso periférico. Normalmente son permeables a  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , sin embargo, algunos tienen una considerable permeabilidad a  $\text{Ca}^{2+}$ . Los nAChRs forman pentámeros con combinaciones de subunidades que dan lugar a distintos canales, que se distinguen por sus particulares valores de permeabilidad a  $\text{Ca}^{2+}$ . Cada una de las cinco subunidades tiene cuatro segmentos de transmembrana que permiten el anclaje y la formación del poro del canal. Existen dos tipos principales de nAChR, uno responsable del acoplamiento excitación-contracción y otro, que participa en la sinapsis neuronal. Los nAChR pueden transmitir información mediante dos mecanismos: por despolarización de la membrana producto de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  en células excitables y, a través de activación de vías de señalización dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , esta última tanto en células excitables como en no excitables (Leonard y Bertrand, 2001; Miyazawa y cols., 2003; Rossman, 2011).



**Figura 15. Organización estructural de los receptores nicotínicos de acetilcolina nAChR.**

El nAChR es un receptor típico de bucle-cisteína. Es un pentámero que contiene al menos dos subunidades  $\alpha$  junto con diferentes combinaciones de las otras subunidades. Una sección transversal del canal a el nivel de la membrana (parte superior izquierda) revela que cada subunidad se compone de cuatro segmentos que abarcan la membrana (M 1-M 4), con M 2 frente al poro (P). La organización de las dos subunidades en sección longitudinal (parte inferior derecha) ilustra la forma en que el segmento M 2 forma el poro, P. El extremo N-terminal se extiende hacia el lado extracelular y contiene el bucle de cisteína. El extremo C-terminal es también extracelular [figura modificada de (Berridge, 2012)].

### 1.2.1.3 Canales operados por depósitos (SOC) y la entrada capacitativa.

La mayor parte del  $\text{Ca}^{2+}$  utilizado en señalización proviene de la liberación desde el retículo endoplásmico (RE), que al tener una capacidad finita, ejerce su función a través de mecanismos de transporte que garantizan su relleno. En respuesta al vaciamiento del RE la célula emplea los denominados canales operados por depósitos (SOC), que se abren y permiten el paso de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular restaurando los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en este depósito. El proceso por el

## **1. INTRODUCCIÓN.**

---

que se activan los canales tras el vaciamiento de los depósitos intracelulares, principalmente el RE, se conoce como entrada capacitativa o SOCE<sup>6</sup> (Putney, 1986, 1990).

Hasta la fecha, el canal de Ca<sup>2+</sup> que mejor recopila las propiedades biofísicas descritas en la SOCE es el canal Orai1 (**Fig. I6**). Éste posee cuatro segmentos transmembrana que conforman el poro. Tanto las regiones N- como C-terminal se ubican en la cara citosólica, que participaría en el acoplamiento entre el vaciamiento del RE y la apertura del canal (Peinelt y cols., 2006; Prakriya y cols., 2006; Yeromin y cols., 2006). La proteína de la membrana del RE, STIM1<sup>7</sup> (**Fig. I6**) a través de una región del N-terminal, situada en el lumen del RE, detectaría la disminución de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>RE</sub> y la región del extremo C-terminal interaccionaría directamente con Orai1, provocando su apertura (Liou y cols., 2005; Roos y cols., 2005).

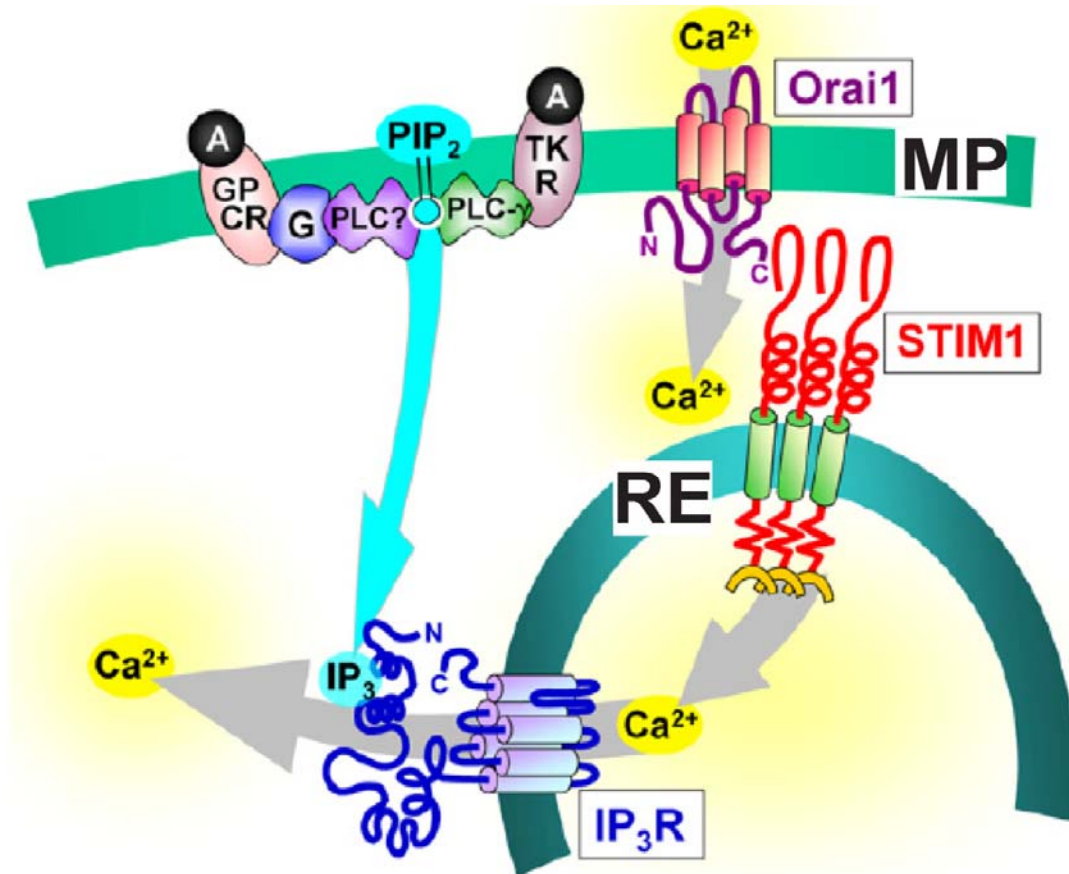
El mecanismo responsable de la entrada capacitativa mediada por STIM1 y Orai, se resume en cuatro pasos. (1) Tras la disminución de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>RE</sub>, STIM1 oligomeriza en una zona concreta de la membrana del RE, debido a que posee un dominio luminal que funciona como sensor de Ca<sup>2+</sup> en el lumen del RE. (2) La porción de membrana del RE donde se concentra STIM1 se desplaza hacia la membrana plasmática. (3) En la membrana plasmática ocurre el reclutamiento de Orai1. La estrecha aproximación de la membrana de RE con la membrana plasmática conduce a la acumulación de Orai1 en forma de tetrámeros, que es la forma activa del canal de Ca<sup>2+</sup>. (4) Finalmente, se produce la apertura del canal y la entrada de Ca<sup>2+</sup> mediada por la interacción de STIM1 y Orai1 (Cahalan, 2009; Lewis, 2007; Putney, 2010)

Anteriormente al descubrimiento de Orai, se había propuesto los canales TRPC como los canales implicados en la entrada capacitativa y sigue siendo un tema controvertido (Berridge, 1997; Parekh y Penner, 1997).

---

<sup>6</sup> SOCE: Store Operated Calcium Entry

<sup>7</sup> STIM1:Stromal Interacting Molecule



**Figura I6. Componentes moleculares de la entrada de Ca<sup>2+</sup> operada por depósitos intracelulares (SOC<sub>2</sub>, por *Store-Operated Channels*), también llamada entrada capacitativa.** La entrada de Ca<sup>2+</sup> sucede a través de la proteína Orai1, que tiene cuatro regiones transmembrana con los extremos N-y C-terminales que miran hacia el citoplasma y participan en el proceso de activación por acoplamiento a proteínas intracelulares. La proteína STIM1, situada en el retículo endoplásmico, tiene un dominio de mano EF que detecta el nivel de Ca<sup>2+</sup> en el lumen del RE. Cuando se vacía el RE (por ejemplo, en respuesta a un aumento del inositol 1,4,5-trisfosfato (IP<sub>3</sub>)), baja la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>RE</sub>, STIM1 se desliga del Ca<sup>2+</sup>, se agrega y migra hacia las regiones del RE que se enfrentan a la membrana plasmática (uniones MP-RE, con las dos membranas muy cercanas) e interacciona con Orai1, formándose agregados e iniciándose la entrada de Ca<sup>2+</sup> [figura modificada de (Hewavitharana y cols., 2007)] .

## **1. INTRODUCCIÓN.**

---

### **1.2.1.4 Canales de potencial transitorio (TRP).**

Estos canales presentan una permeabilidad no selectiva a cationes. Se conocen al menos 28 variedades y son capaces de responder a estímulos como la temperatura, el contacto, los estímulos nocivos, la osmolaridad y el pH (Putney, 2004). En mamíferos, los canales TRP están codificados por 23 genes diferentes y se han descrito siete subfamilias: **TRPC**<sup>8</sup>, **TRPM**<sup>9</sup>, **TRPV**<sup>10</sup>, **TRPA**<sup>11</sup>, **TRPP**<sup>12</sup>, **TRPML**<sup>13</sup> y **TRPN**<sup>14</sup> (Ramsey y cols., 2006). Una de las principales características de esta familia de canales es que tienen baja conductancia y pueden permanecer abiertos durante largos periodos de tiempo. En general, se ensamblan en tetrámeros que conforman el canal; cada subunidad del tetrámero posee seis dominios transmembrana y los extremos C y N-terminales están orientados hacia el citosol (**Fig. 17**) (Clapham, 2007; Ramsey y cols., 2006).

Dentro de la superfamilia TRP, cabe destacar los **TRPC**, **TRPM** y **TRPV** (**Fig. 17**) por su implicación en la señalización por  $Ca^{2+}$ . Los canales **TRPC (1-7)** tienen en su extremo N-terminal repeticiones de anquirina y se sabe que requieren de la actividad de fosfolipasa C. También se han implicado, en la señal de  $Ca^{2+}$  responsable de la entrada capacitativa (Ambudkar y cols., 2007), de proporcionar la señal de  $Ca^{2+}$  responsable de la proliferación de células musculares lisas y de la señal de  $Ca^{2+}$  de la reacción acrosómica (Yildirim y Birnbaumer, 2007).

Los **TRPM (1-8)** se caracterizan por tener los extremos N y C-terminal muy largos y, algunos miembros de esta subfamilia, se distinguen en que funcionan a la vez como canales y enzimas (**Fig. 17**). La permeabilidad de estos canales es variable y permite el paso de otros cationes monovalentes (Guinamard y cols., 2011). Debido a la especial sensibilidad a  $Ca^{2+}$ , tanto en la activación como en inactivación, se ha implicado a esta familia como canal marcapasos en la inspiración-espирación respiratoria (Mironov, 2008).

Los **TRPV (1-6)** son canales de  $Ca^{2+}$ , que típicamente poseen entre tres y cuatro repeticiones de anquirina en la región N-terminal. Responden a estímulos,

---

<sup>8</sup> TRPC: Transient Receptor Potential Canonical.

<sup>9</sup> TRPM: Transient Receptor Potential Melastine.

<sup>10</sup> TRPV: Transient Receptor Potential Vanilloid.

<sup>11</sup> TRPA: Transient Receptor Potential Ankyrin.

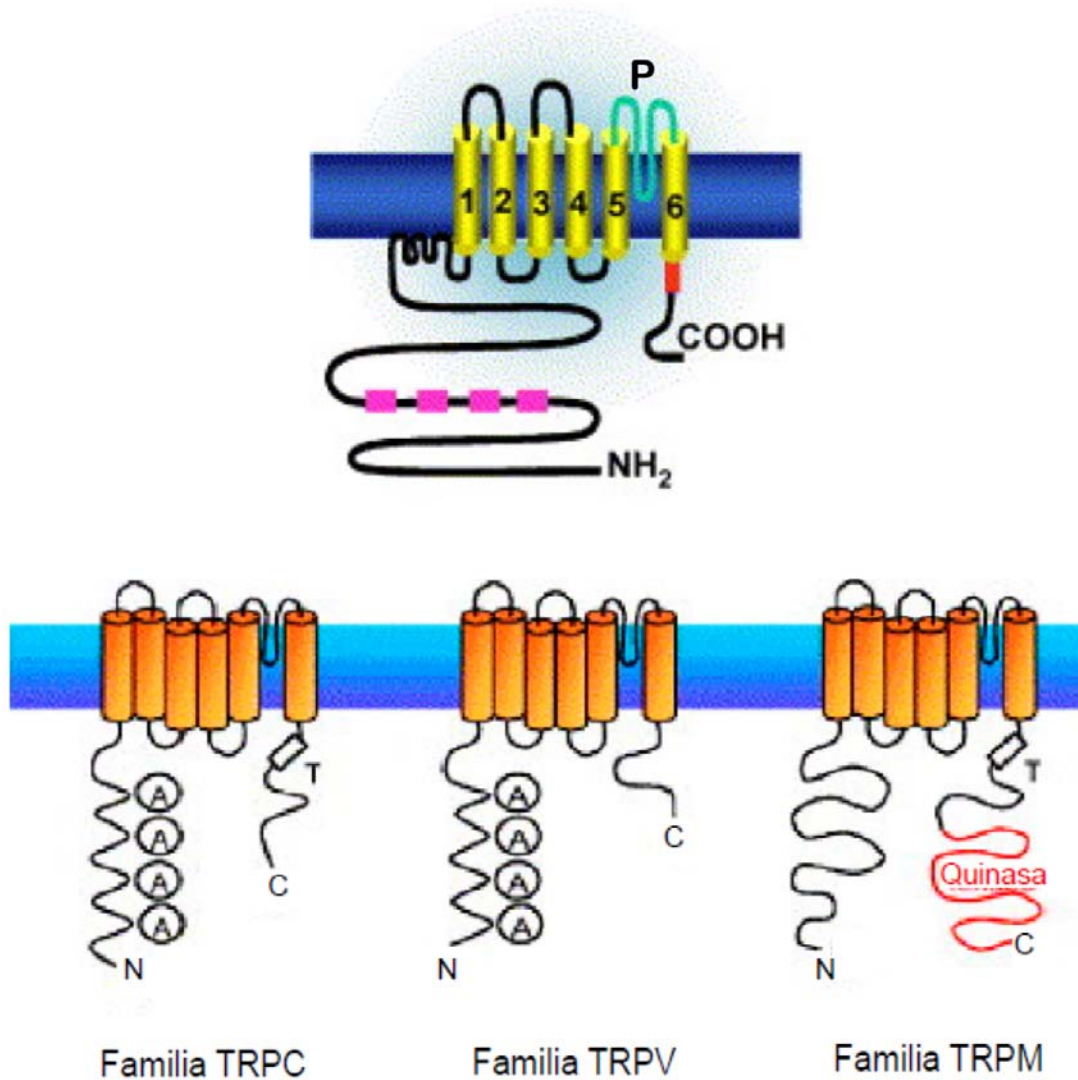
<sup>12</sup> TRPP: Transient Receptor Polycystin.

<sup>13</sup> TRPML: Transient Receptor Mucolipin.

<sup>14</sup> TRPN: Transient Receptor No mechanoreceptor.



sensoriales como el calor, químicos como la capsaicina y a mediadores inflamatorios (Vay y cols., 2012).



**Figura 17. Organización estructural de la familia de los canales TRP.**

Todos los TRP tienen la misma estructura básica (ver el panel superior), que consta de seis dominios transmembrana con los extremos N- y C-terminales situados en el citoplasma. Entre el quinto y el sexto dominio transmembrana, que están muy conservados en todos los homólogos, hay un bucle que forma el poro (P). La mayor parte de las diferencias entre las tres familias se encuentran dentro de los extremos N- y C-terminales. Los TRPC y TRPV son bastante similares en cuanto a que contienen tres o cuatro repeticiones de anquirina (A). Los TRPM se caracterizan por tener los extremos N- y C-terminales muy largos. El dominio C-terminal contiene la actividad enzimática (región roja) en algunos de los canales [figura modificada de (Spassova y cols., 2004)].



## **1. INTRODUCCIÓN.**

---

### **1.2.1.5 Canales operados por segundos mensajeros (SMOC).**

Estos canales de  $\text{Ca}^{2+}$  se activan por segundos mensajeros generados en distintas cascadas de señalización, como los **CNGC**<sup>15</sup>, activados por nucleótidos cíclicos, y los, **ARC**<sup>16</sup>, activados por el ácido araquidónico (Bird y cols., 2004). En una sección posterior se tratará la función de los segundos mensajeros en la activación de canales de endomembranas.

Los **CNGC** son canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , y en menor medida de  $\text{Na}^+$ , que desempeñan un papel importante en la transducción sensorial del gusto, la visión y la audición. En mamíferos existen seis genes que codifican para los CNGC y estos se pueden agrupar en dos familias: los CNGA y los CNGB. El canal es un tetrámero que puede resultar de diferentes combinaciones de subunidades con sus particulares características. Las subunidades CNGA1-CNGA3 componen el canal mientras que la subunidades CNGA4 y CNGB tienen una función moduladora. Las regiones N-terminal de las subunidades moduladoras poseen un sitio de unión a CaM (Bradley y cols., 2005; Trudeau y Zagotta, 2002).

Los **ARC** son canales altamente selectivos a  $\text{Ca}^{2+}$  y son activados por el ácido araquidónico, que es el producto de la fofolipasa  $A_2$  ( $\text{PLA}_2$ ). La activación de los ARC está regulada por la fosforilación y defosforilación del receptor: la fosforilación por la proteína quinasa A (PKA) activa el canal, mientras que la defosforilación mediada por la fosfatasa calcineurina lo inactiva (Shuttleworth, 2012). Estos canales se han identificado en células de la parótida y en células acinares pancreáticas.

### **1.2.2 Liberación de $\text{Ca}^{2+}$ desde los depósitos intracelulares: $\text{IP}_3\text{R}$ , RyR, TPC y canal de fuga (*leak*).**

La capacidad de la célula de almacenar el  $\text{Ca}^{2+}$  en diversos orgánulos intracelulares, mediante sistemas de bombeo, facilita la formación de compartimentos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares. La apertura y cierre de canales permeables al  $\text{Ca}^{2+}$  de las membranas de los orgánulos intracelulares permiten el rápido incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_C$ . Los orgánulos descritos como depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$

---

<sup>15</sup> CNGC: Cyclic nucleotide-gated channel.

<sup>16</sup> ARC: Araquidonic acid-regulated channel.

son el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, los lisosomas y los gránulos ácidos, cada uno de ellos con una combinación propia de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en sus membranas. La activación de estos canales es mediada por segundos mensajeros que se detallaran en cada caso.

### 1.2.2.1 Receptor de inositol 1, 4, 5-trifosfato ( $\text{IP}_3\text{R}$ ).

La hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato ( $\text{PIP}_2$ ) es uno de los eventos más relevantes en la transducción de señales y da como resultado la activación de los canales  $\text{IP}_3$  de los orgánulos intracelulares y la consecuente liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  (**Fig. I6**). Muchos agonistas, mediante la activación de proteínas G, estimulan la fosfolipasa C (PLC) que genera como segundo mensajero  $\text{IP}_3$ .

En mamíferos se han descrito tres isoformas  $\text{IP}_3\text{R}$  (I-III) codificadas por tres genes diferentes (De Smedt y cols., 1994; Maranto, 1994; Mignery y cols., 1989). Los tres tienen estructuras primarias y propiedades muy similares; aunque, se expresan en distintos tipos celulares y en diferentes proporciones.

El  $\text{IP}_3\text{R}$  se configura como tetrámero, bien como homo o heterotetrámero, y en cada subunidad pueden diferenciarse tres regiones principales (**Fig. I8**): un dominio transmembrana, que forma el poro; un dominio de modulación y un dominio de unión al  $\text{IP}_3$ ; estos dos últimos citosólicos. El dominio transmembrana (TM) tiene seis subdominios (TM 1-6) y el poro se forma entre los TM 5 y 6 (Galvan y cols., 1999). La región citosólica consta de una cadena muy larga, con dos dominios interconectados, el dominio de unión a  $\text{IP}_3$ , en el extremo N-terminal, y el dominio de modulación, que está unido al dominio de transmembrana 1. La zona de unión al  $\text{IP}_3$ , en el extremo N-terminal, se extiende entre los residuos 226 y 578 e incluye una secuencia conservada de 10 aminoácidos de arginina y lisina que desempeñan un papel crucial en la unión al ligando. El dominio de modulación tiene dos funciones: en primer lugar, tiene que transmitir el cambio conformacional inducido por la unión de  $\text{IP}_3$  y  $\text{Ca}^{2+}$  a la región de transmembrana y así abrir el poro y, en segundo lugar, es la región de unión de muchos moduladores, con secuencias consenso para la fosforilación, la unión de nucleótidos como el ATP y de proteínas como la CaM y FKBP (Taylor y cols., 2004).

La apertura del canal es el resultado de la unión del  $\text{IP}_3$  y del  $\text{Ca}^{2+}$  al receptor. El  $\text{IP}_3$  es generado por la activación de la cascada acoplada a proteínas G. La

## 1. INTRODUCCIÓN.

---

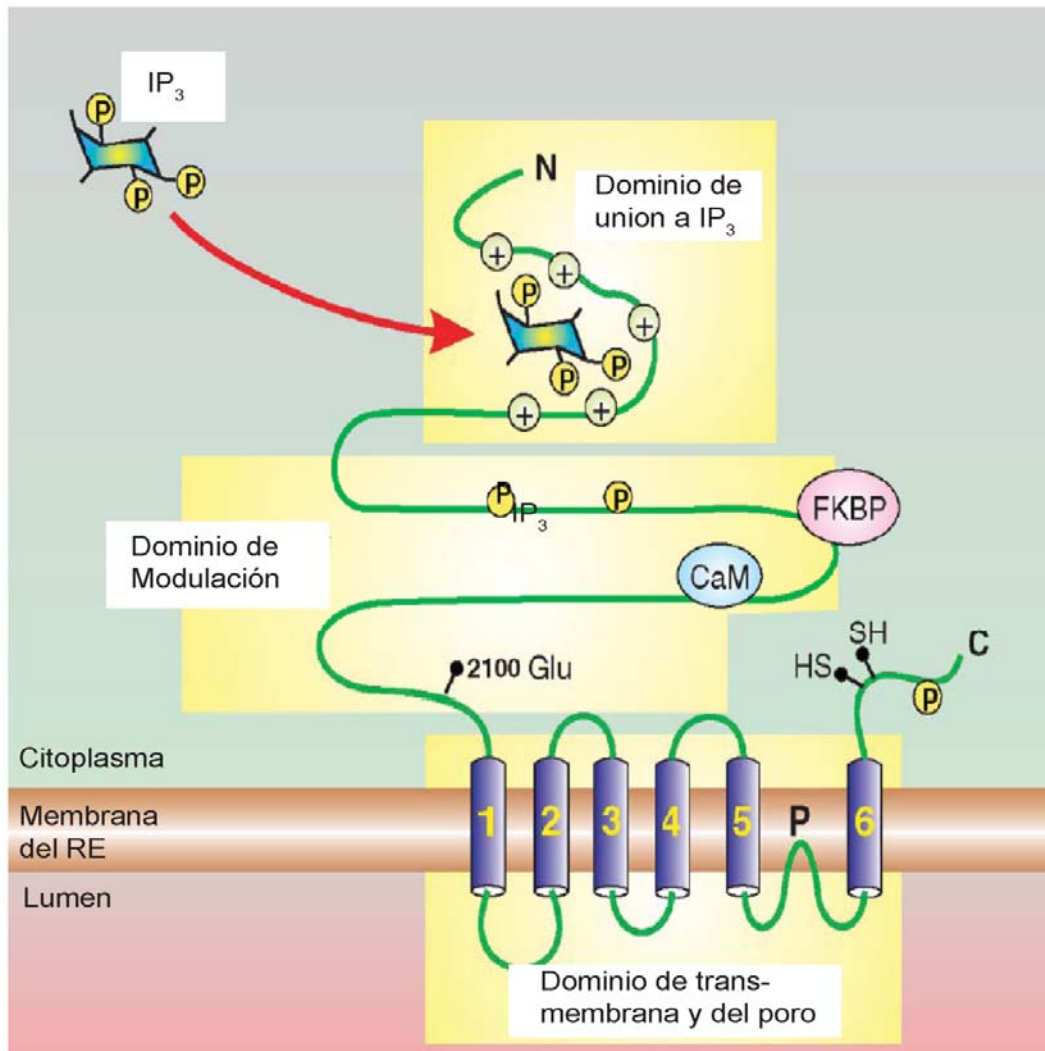
proteína  $G_q$  activa a la enzima PLC $\gamma$  y ésta hidroliza un fosfolípido de membrana, el fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP $_2$ ), obteniéndose como productos IP $_3$  y DAG (Berridge y Irvine, 1984).

El mecanismo de cooperación entre los dos mensajeros intracelulares, el IP $_3$  y el Ca $^{2+}$ , consiste en que el IP $_3$  se une al receptor e induce un cambio conformacional que sensibiliza al sitio de unión a Ca $^{2+}$ , facilitando la unión del mismo y provocando eventualmente la apertura del canal. Además, el Ca $^{2+}$  ejerce una modulación bimodal del canal: en presencia de IP $_3$  bajas [Ca $^{2+}$ ] activan el canal, mientras que [Ca $^{2+}$ ] mayores de 300 nM inactivan el canal (Bezprozvanny y cols., 1991). El aumento de la [Ca $^{2+}$ ] $_c$  por la liberación de Ca $^{2+}$  a través de un IP $_3$ R puede, a su vez, facilitar la activación de otros IP $_3$ R cercanos, en un mecanismo de retroalimentación positiva. El doble control, por parte de Ca $^{2+}$  e IP $_3$ , sobre los IP $_3$ R genera un tipo específico de señalización conocido como oscilaciones de Ca $^{2+}$ , crucial para multitud de funciones de señalización mediadas por Ca $^{2+}$ . A este respecto, se sabe que los tipos IP $_3$ RI y el II son los encargados de generar las oscilaciones de Ca $^{2+}$  citosólico (Miyakawa y cols., 1999).

Las modificaciones covalentes como fosforilaciones o defosforilaciones pueden ejercer un efecto regulador sobre el IP $_3$ R, activándolo o inactivándolo rápidamente. En este grupo de moduladores se encuentran distintas quinasas, como la CaMKII, la PKG o la PKA (Koller y cols., 2003). El inhibidor mejor conocido del IP $_3$ R es la heparina, que compite con el IP $_3$  por el sitio de unión al receptor (Kasri y cols., 2004).

En mamíferos los IP $_3$ R se expresan de forma ubicua, pero el nivel de expresión de cada isoforma varía en relación al estado del desarrollo del individuo, el tipo celular o la respuesta a distintos estímulos (Barrans y cols., 2002; Cai y cols., 2004; Kasri y cols., 2006). Se ha descrito que el IP $_3$ RI se expresa de forma mayoritaria en células de Purkinje del cerebelo, el IP $_3$ RIII en células  $\beta$ -secretoras de insulina (Taylor y cols., 1999) y la isoforma IP $_3$ RII en cardiomiocitos (Lipp y cols., 2000). En células HeLa se expresan las tres isoformas del IP $_3$ R (Hattori y cols., 2004; Missiaen y cols., 2004b).

En el contexto de esta tesis, destacamos dos agonistas que activan los IP $_3$ Rs, la acetilcolina (ACh) o su análogo carbamilcolina (CCh) que se unen a **receptores muscarínicos de ACh (M1-M3)** con la consecuente producción de IP $_3$  y liberación de Ca $^{2+}$  desde los depósitos intracelulares de células HeLa o HEK293, entre otras (Short y cols., 2000); y el ATP, que también tendría un efecto similar en este tipo de células uniéndose a **receptores purinérgicos de tipo P2Y**, acoplados a la formación de IP $_3$  (Smit y cols., 1993).



**Figura 18. Organización estructural del receptor de inositol-trisfosfato (IP<sub>3</sub>R).**

El IP<sub>3</sub>R puede dividirse en tres dominios funcionales (cuadros de color amarillo). El dominio transmembrana tiene seis subdominios transmembrana (TM) con un dominio del poro (P) situado entre TM 5 y TM 6. Hay una cola C-terminal citosólica corta, que contiene dos grupos tiol altamente conservados. La región N-terminal es larga y contiene el dominio de unión a IP<sub>3</sub>, que está conectado a TM 1 a través del dominio modulador, al que pueden unirse la calmodulina (CaM) o el factor de transcripción FKBP, una proteína que liga FK506 y que actúa como chaperona plegadora de proteínas. El receptor funcional, capaz de ser permeado por Ca<sup>2+</sup>, es un tetrámero [figura modificada de (Berridge, 2012)].

## 1. INTRODUCCIÓN.

---

### 1.2.2.2 Receptor de Rianodina (RyR).

Los RyRs están presentes en la membrana del RE y RS, tienen una estructura parecida a los IP<sub>3</sub>Rs y comparten con ellos algunas características funcionales. En mamíferos existen tres genes distintos, cada uno para una isoforma del receptor (RyR1, RyR2, RyR3). Las 3 variantes comparten alrededor de un 70% de identidad de secuencia aminoacídica, pero tienen la posibilidad de generar más variantes mediante *splicing*<sup>17</sup> (Rossi y Sorrentino, 2002). Estos receptores deben su nombre al alcaloide rianodina, al que se unen con gran afinidad, y que tiene un efecto estimulador a concentraciones bajas e inhibidor a altas dosis (Buck y cols., 1992). Son proteínas muy grandes que contienen más de cinco mil aminoácidos con un peso molecular aproximado de 2,2 MDa. Su estructura cuaternaria está formada por tetrámeros y cada monómero posee zonas de unión al Ca<sup>2+</sup>, a la CaM y al ATP. Una quinta parte del RyR es la que forma el poro, que está embebida en la membrana del RE (**Fig. 19**), mientras que el resto de la proteína forma una especie de cabeza citoplasmática de aproximadamente 20 nm de diámetro, que abarca casi completamente la distancia entre la membrana plasmática y la membrana del RE, como ocurre en el acoplamiento excitación-contracción (Hamilton, 2005). El poro conductor está conformado por los dominios transmembrana de cada monómero. Predicciones de la estructura de los RyR proponen que cada monómero de los RyR contiene de 4 a 6 dominios transmembrana hacia el extremo C-terminal (Du y cols., 2002).

En la regulación de los canales RyR participan numerosos factores y proteínas citosólicas como la CaM, la PP2<sup>18</sup>, la PP2A<sup>19</sup>, la FKBP<sup>20</sup> y la PKA, así como también proteínas del lumen del retículo (calsequestrina, junctina y triadina) que interactúan con la región luminal del RyR. La calmodulina actúa de dos maneras dependiendo de la [Ca<sup>2+</sup>] presente: a bajas concentraciones de Ca<sup>2+</sup> (10<sup>-7</sup> M), actúa como activador de los RyR1; mientras que a altas concentraciones de Ca<sup>2+</sup>, la calmodulina actúa como inhibidor (Tripathy y cols., 1995).

El **RyR1** se expresa principalmente en el músculo esquelético donde la función principal es el acoplamiento excitación-contracción. El proceso de excitación-contracción depende de la apertura de los canales Ca<sub>v</sub>1.1 de la membrana plasmática de los túbulos T, que hacen contacto directamente con la gran cabeza

---

<sup>17</sup> *Splicing*: Mecanismo de corte y empalme de un gen.

<sup>18</sup> PP2: Fosfo Protein 2.

<sup>19</sup> PP2A: Fosfo Protein 2A.

<sup>20</sup> FKBP: FK506 Binding Protein.

citoplasmática de los RyR1 (Du y cols., 2006). El RyR1 actúa como sensor de voltaje, que detecta la despolarización de la membrana y, a través de un cambio conformacional (y sin entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ ), provoca la apertura del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  del RyR. La función del canal está regulada por FKBP2, que parece estabilizar el estado cerrado del canal. El RyR1 también se ha descrito en algunas neuronas, como las de Purkinje en el cerebelo.

El **RyR2** es el principal canal de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  presente en algunos tipos celulares, tales como el músculo liso, el músculo cardíaco, las células cromafines y algunos tipos de neuronas. La función de los RyR2s se ha estudiado extensamente en el músculo cardíaco, donde la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  es la responsable de la contracción. El RyR2 es un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  cuya activación es dependiente de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (con el subsecuente aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_C$  en las proximidades de canal), un proceso conocido como liberación de calcio inducida por calcio (CICR)<sup>21</sup>. De esta manera, una pequeña entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , a través de un canal L operado por voltaje de la membrana plasmática, es amplificada por el CICR e induce una gran liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  contenido en el RE (Alonso y cols., 1999; Fabiato, 1983).

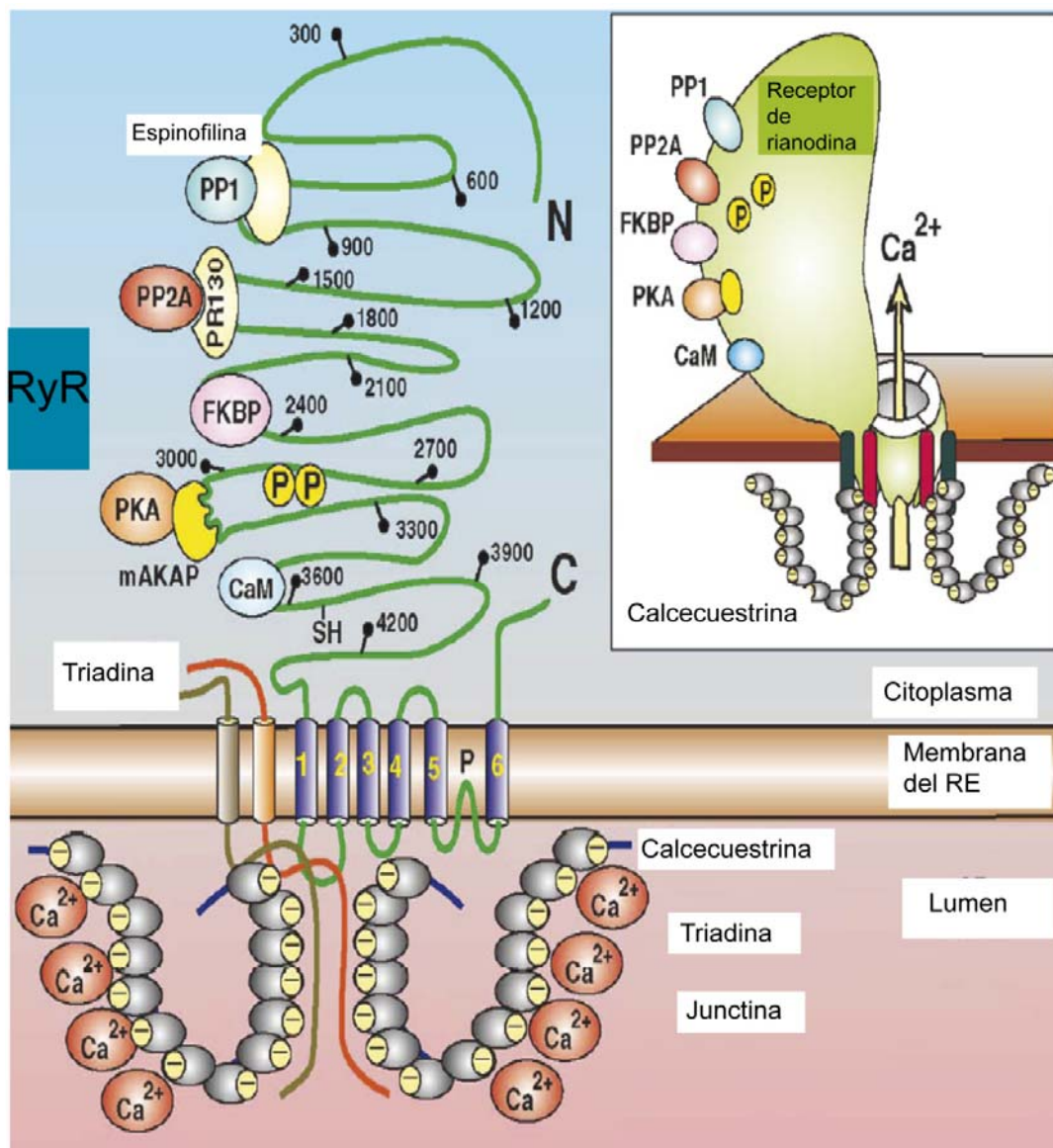
Aunque el **RyR3** se haya ampliamente distribuido en todos los tejidos, es el más desconocido de todos los RyR. Se ha descrito su presencia en las células intersticiales de Cajal, donde podría desempeñar un papel en la iniciación de las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólicas marcapasos en estas células (Lanner y cols., 2010). Parece que el RyR3 podría estar presente en muchas células no excitables.

La cafeína se usa frecuentemente como agonista ya que activa los RyRs. Actúa aumentando el tiempo medio de apertura del canal y reduciendo el umbral de sensibilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  (Rousseau y cols., 1988). El efecto neto resulta en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE a las  $[\text{Ca}^{2+}]_C$  de reposo, sin que sea necesario un aumento para disparar la liberación, como en el CICR.

---

<sup>21</sup> CICR: Calcium Induce Calcium Release.

## 1. INTRODUCCIÓN.



**Figura 19. Organización estructural del receptor de rianodina tipo 2 (RyR2).**

El RyR2 es un tetrámero. En la región C-terminal de cada subunidad hay seis dominios transmembrana y entre los dominios 5 y 6 se forma el poro (P). La gran región N-terminal, que asoma hacia el citosol, forma una cabeza bulbosa que funciona como un andamio para unirse a un gran número de componentes regulatorios tales como: la calmodulina (CaM); la proteína quinasa A (PKA); la FK506 *binding protein* (FKBP), la proteína fosfatasa 2 A (PP2A) y la proteína fosfatasa 1 (PP1). Otra región del RyR2 se orienta hacia el lumen del RE e interactúa con el  $Ca^{2+}$  y proteínas reguladoras tales como: la calceuestrina, la triadina y la junctina [figura modificada de (Berridge, 2012)].

### 1.2.2.3 Canal TPC.

El canal **TPC**<sup>22</sup> (**Fig. I10**) debe su nombre a los dos poros que se deducen de su estructura primaria. Está formado por dos subunidades, cada una con seis segmentos transmembrana (S1-6) interconectados por un bucle a otros seis segmentos, estructura típica de canales activados por voltaje. Hasta la fecha se han descrito tres subtipos de TPC (1, 2 y 3) que se expresan preferentemente en los gránulos ácidos como el lisosoma (TPC2) y el endosoma (TPC1 y TPC3) (Zhu y cols., 2009). El primero se activa con el ácido nicotínico-adenin dinucleótido fosfato (NAADP), que provoca la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  contenido en este orgánulo. La señal de  $\text{Ca}^{2+}$  provocada por NAADP es de naturaleza bifásica, con una primera fase de liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  desde el lisosoma y una segunda fase de amplificación resultado del CICR en el RE (Calcraft y cols., 2009; Patel y Docampo, 2010).

Actualmente la naturaleza del canal TPC es objeto de gran controversia, con datos contradictorios en la literatura. En este sentido, recientemente se ha propuesto que el canal TPC sería una canal de  $\text{Na}^+$  en lugar de  $\text{Ca}^{2+}$  (Wang y cols., 2012).

### 1.2.2.4 Canal de fuga (*leak*).

El nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE en el estado estacionario se alcanza cuando se igualan el flujo de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del transporte activo (llevado a cabo por la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico, SERCA) y la salida pasiva o *leak*, siguiendo el gradiente electroquímico del  $\text{Ca}^{2+}$ . En estas condiciones, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ ) se mantiene constante. El *leak* desde el RE es el más enigmático de los procesos que participan en la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ . Su substrato físico es aún desconocido y se pone de manifiesto por un descenso paulatino en la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$  cuando disminuye  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{C}}$ . Este fenómeno se puede observar también con inhibidores de las SERCAs. (Camello y cols., 2002). Como se ha mencionado ya, en la actualidad no se conoce la entidad molecular que explique la salida pasiva de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE, aunque se han propuesto hasta 7

---

<sup>22</sup> TPC: Two Pore Chanel.



## 1. INTRODUCCIÓN.

candidatos distintos: el translocón (también descrito como SEC61) (Lang y cols., 2011), la SERCA, (Camello y cols., 2002), la Bcl-2 (Pinton y cols., 2000) la presinilina (Supnet y Bezprozvanny, 2011; Tu y cols., 2006), la proteína Bax, la panexina (D'Hondt y cols., 2011) y, finalmente, el canal TRPC (Brinkmeier, 2011). Como hemos mencionado, y aunque los datos no están claros, se ha propuesto que la bomba SERCA, mediante un mecanismo inverso, contribuiría considerablemente a la salida pasiva del RE en algunos tipos celulares (Du y cols., 1996). El resto de candidatos comparten la capacidad de formar poros con permeabilidad a cationes en la membrana del RE. En algunos casos, como la presinilina, se ha sugerido su participación en enfermedades como el Alzheimer, que se vería así como consecuencia de un defecto de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  (Tu y cols., 2006).

### 1.3 Mecanismos que disminuyen la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ .

Existe una gran variedad de bombas y transportadores responsables de la retirada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citoplasma, que permiten a la célula volver al estado de reposo tras su activación. Estos sistemas tienen dos funciones importantes: en primer lugar, se encargan de mantener rellenos de  $\text{Ca}^{2+}$  los depósitos intracelulares y en segundo lugar, se ocupan de mantener los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  de reposo en el citosol. Son sistemas de bombeo de  $\text{Ca}^{2+}$ , que pueden clasificarse en cinco tipos; **PMCA**<sup>23</sup>, **SERCA**<sup>24</sup>, **SPCA**<sup>25</sup>, **MCU**<sup>26</sup> y **NCX**<sup>27</sup>. La PMCA y el NCX se localizan en la membrana plasmática, mientras que el resto lo hace en orgánulos intracelulares. Es importante destacar también que MCU no es estrictamente un transportador, sino un canal de membrana localizado en la mitocondria, pero que, al menos funcionalmente, debe incluirse en este grupo porque colabora con la eliminación del  $\text{Ca}^{2+}$  del citosol, especialmente en circunstancias en que la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  es muy elevada. Un grupo aparte y especial de mecanismos que pueden colaborar en la amortiguación de cargas de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico es el de las **proteínas tamponadoras de  $\text{Ca}^{2+}$**  que presentan gran afinidad y selectividad por ese catión y que colaboran en el mantenimiento de los niveles del  $\text{Ca}^{2+}$  en reposo, amortiguando en el tiempo y en el espacio tanto las subidas como las bajadas de  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ .

---

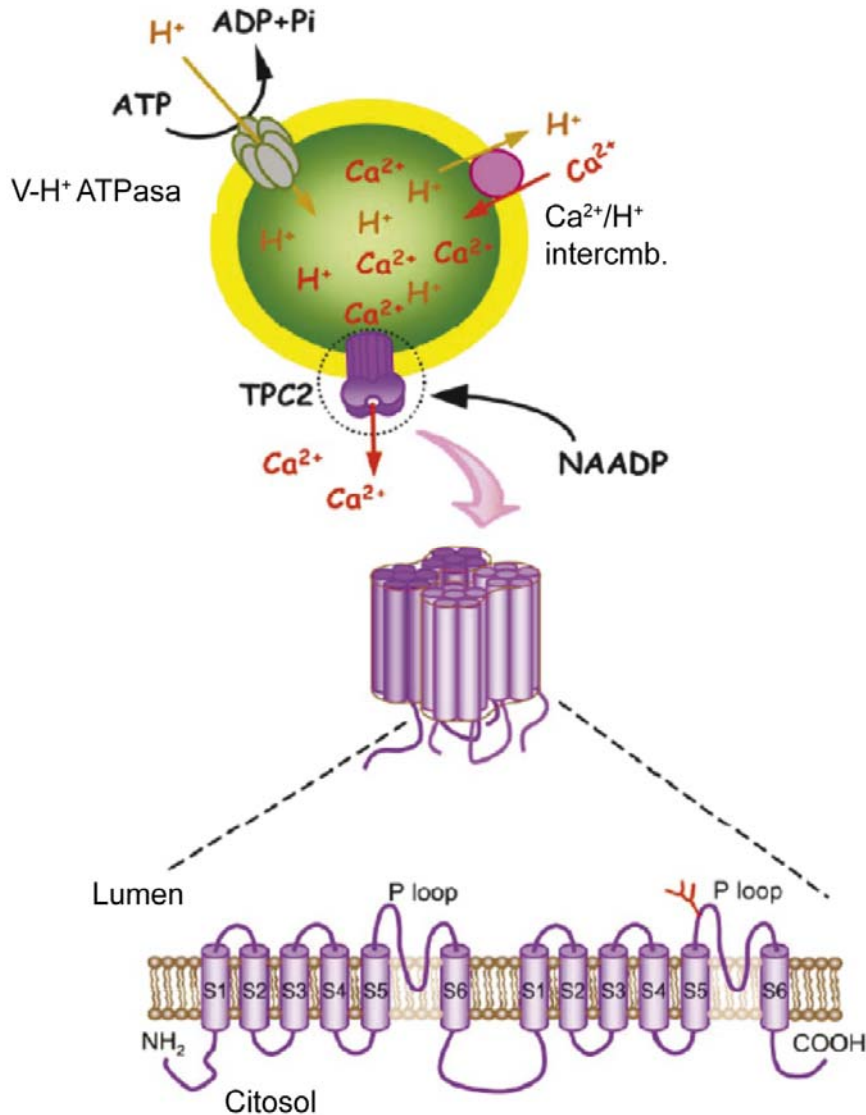
<sup>23</sup> PMCA: Plasmatic Membrane Calcium ATPase.

<sup>24</sup> SERCA: Sarco Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase.

<sup>25</sup> SPCA: Secretory Protein Calcium ATPase.

<sup>26</sup> MICU: Mitochondrial Calcium Uniporter.

<sup>27</sup> NCX: Natrium Calcium Exchangers.



**Figura I10. Canal TPC2, bomba  $V\text{-H}^+\text{ATPase}$  e intercambiador  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  de los lisosomas.**

En la parte superior se esquematiza la organización de las bombas ( $V\text{-H}^+\text{ATPase}$ ), que bombea protones, con gasto de  $\text{ATP}$ , al interior de las vesículas lisosomales, los intercambiadores ( $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ ), que permiten la acumulación vectorial de  $\text{Ca}^{2+}$ , y los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{TPC2}$ ), que permiten la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol. En la parte inferior, se muestra la estructura del canal de  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{TPC2}$ . El canal puede activarse por  $\text{NAADP}$  (ácido nicotínico-adeninucleótido-fosfato). Cada subunidad tiene doce segmentos transmembrana y dos bucles ( $\text{P}$  loop) [figura modificada de (Galione y cols., 2009)].

## **1. INTRODUCCIÓN.**

---

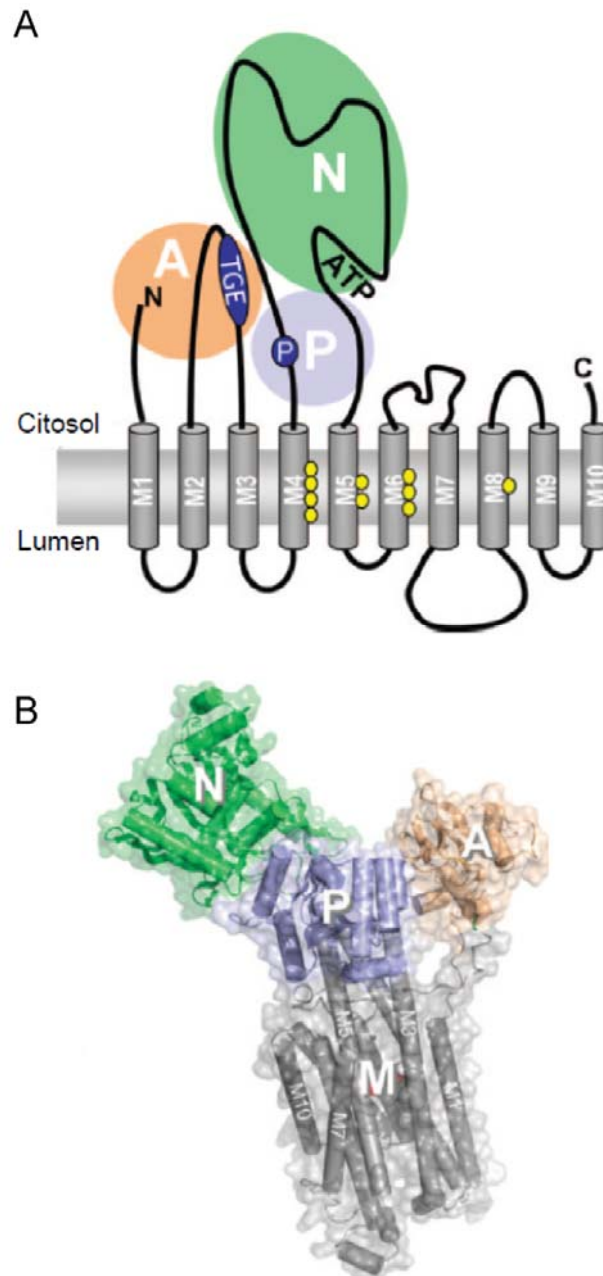
### **1.3.1 Bombas (ATPasas) de $\text{Ca}^{2+}$ : PMCA, SERCA y SPCA.**

En mamíferos se encuentran tres grupos de bombas ATPasas: la PMCA, la SERCA y la SPCA, pertenecientes a la superfamilia de las ATPasas de tipo P. Se designan de esta manera por el mecanismo de la reacción, en el cual el fosfato terminal del ATP se transfiere transitoriamente al residuo de aspartato del sitio activo de la enzima, formando así un intermediario fosforilado en su ciclo de transporte iónico. Estas ATPasas transportan  $\text{Ca}^{2+}$  y otros cationes a través de las membranas biológicas en contra de su gradiente electroquímico, usando como energía la hidrólisis del ATP. Todas ellas tienen baja capacidad y alta afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que les permite seguir bombeando a bajas concentraciones de este ión, asegurando así el mantenimiento de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  de reposo en el citosol y la alta  $[\text{Ca}^{2+}]$  de los depósitos intracelulares (Carafoli y Brini, 2000; Vangheluwe y cols., 2009).

#### **1.3.1.1 ATPasa de $\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática (PMCA).**

La familia de las PMCAs está codificada por cuatro genes que codifican 4 isoformas (PMCA 1-4), de un peso molecular de 138 kDa. A su vez, a partir de cada isoforma se derivan numerosos tipos, por *splicing*, que se designan, por ejemplo: PMCA1a, PMCA1b, etc (Strehler y Zacharias, 2001). Todos los tipos de PMCA comparten una gran especificidad por  $\text{Ca}^{2+}$  y son capaces de transportar una molécula de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citosol hacia el medio extracelular, movimiento que está acompañado por el paso de un ión de  $\text{H}^+$  hacia el citosol. Este cotransporte genera una diferencia de cargas, de ahí el carácter electrogénico y su contribución al potencial de membrana (Hao y cols., 1994).

Las isoformas de PMCA 1 y 4 se localizan en la mayoría de los tipos celulares mientras que las PMCA 2 y 3 están más restringidas a neuronas y a células musculares esqueléticas (Greeb y Shull, 1989; Huang y cols., 2010; Stahl y cols., 1992). Una de las consecuencias de la diversidad de PMCAs es que cada tipo celular puede expresar bombas con diferentes velocidades de transporte que permitan generar transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  con una cinética acorde a sus necesidades y función. Por ejemplo, el músculo esquelético expresa la PMCA3f, una de las más rápidas, mientras que en células Jurkat se expresa la PMCA4b, la más lenta.



**Figura I11. Organización estructural de bomba de  $Ca^{2+}$  del RE tipo 1a (SERCA1a).**

En (A) se muestra un modelo en 2D de la SERCA1a con sus 10 dominios de membrana (M 1-M 10) y los principales dominios implicados con el bombeo: el dominio unión a nucleótidos N, el dominio de fosforilación P, el dominio activador A. Se puede observar también los residuos conservados TGE, implicados en la defosforilación. Los iones  $Ca^{2+}$  se unen entre las hélices M 4 y M 6, entre M 5 y M 6, y en M 8. Los círculos amarillos indican el número de residuos que se unen a  $Ca^{2+}$  de cada subdominio. En (B) se muestra la estructura tridimensional de SERCA1a. [Figura modificada de (Toyoshima y cols., 2000)].

## **1. INTRODUCCIÓN.**

---

A pesar de la gran diversidad de isoformas de PMCA, todos los miembros poseen una estructura común similar a la SERCA (**Fig. I11**), con diez dominios transmembrana, y con los extremos N- y C-terminal hacia la cara citosólica. Poseen dos bucles en el lado citosólico, entre los dominios TM 2 y TM 3 y otro entre los TM 4 y TM 5. Este último es particularmente significativo, ya que contiene dos dominios importantes: el dominio de fosforilación (P), con su residuo conservado de aspartato que cambia de estado fosforilado a defosforilado durante el ciclo de la bomba; y el dominio de unión a nucleótidos (N), en donde se une el ATP (Carafoli, 1994). La actividad de la PMCA puede regularse mediante el sistema  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM, que puede permanecer unido a la bomba durante un tiempo, incluso después de que los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  han disminuido. Este mecanismo permite generar una especie de “memoria”, de tal forma que la bomba pueda responder más rápidamente frente a otro transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  (Benaim y cols., 1984).

### **1.3.1.2 ATPasa de $\text{Ca}^{2+}$ del retículo (sarco) endoplásmico (SERCA).**

La ATPasa SERCA está codificada por tres genes que generan tres isoformas (SERCA 1-3), de aproximadamente 110 kDa, y mediante *splicing* pueden dar lugar a numerosas isoformas con diferentes propiedades y distribución celular. Todas son responsables del relleno de los orgánulos que funcionan como depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , principalmente el RE. El movimiento iónico de esta bomba, al igual que la PMCA anteriormente descrita, es de carácter electrogénico, siendo capaz de transportar dos iones de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citosol hacia el lumen de los orgánulos, en intercambio por dos iones de  $\text{H}^+$  hacia el citosol (Yu y cols., 1993).

Cada isoforma de SERCA se expresa preferentemente en un tejido distinto, por ejemplo, SERCA1a se expresa específicamente en el músculo esquelético del adulto, mientras que SERCA1b lo hace en el músculo esquelético fetal. La SERCA2a se encuentra principalmente en el músculo cardíaco adulto y la SERCA2b tiene una expresión ubicua en todos los tejidos. La SERCA3, que presenta hasta 6 isoformas (SERCA3a-f), se expresa en todos los tejidos no musculares (Periasamy y Kalyanasundaram, 2007; Wu y cols., 1995).

La estructura y mecanismo de acción de las ATPasas de tipo P es, a grandes rasgos, similar en todos sus tipos. En la actualidad la mejor descrita es la SERCA1a cuya estructura cristalina fue la primera descrita, hace ya más de una década (Toyoshima y cols., 2000). Hoy se han descrito al menos una veintena de

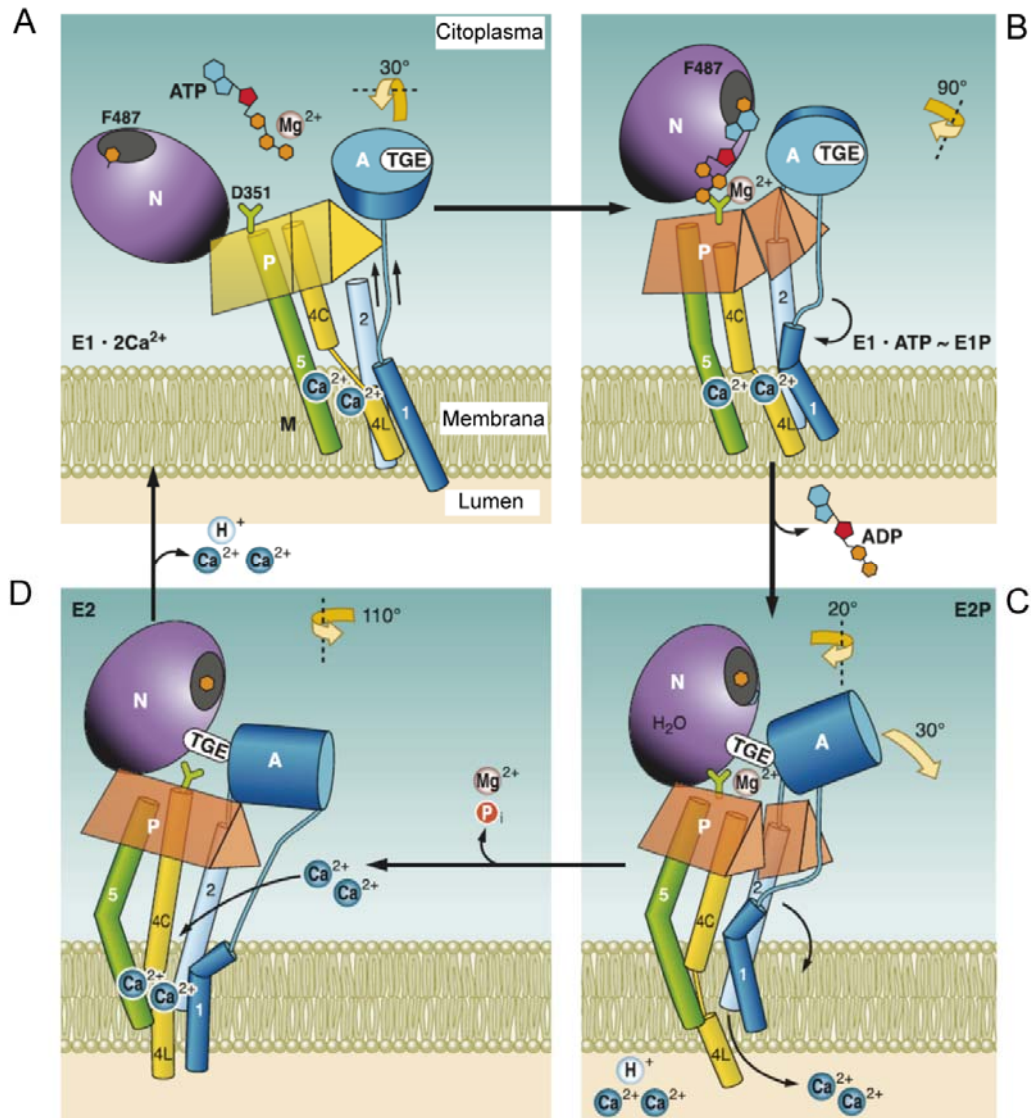
estructuras cristalinas correspondientes a los distintos estados de la reacción cíclica de transporte.

En la SERCA1a (**Fig. I11**) se aprecian distintos dominios. En primer lugar, el dominio de membrana (M), compuesto por 10 hélices que atraviesan la membrana (M 1-M 10), posee residuos específicos con átomos de oxígeno que facilitan la coordinación del  $\text{Ca}^{2+}$ . En segundo lugar, el dominio activador (A) situado en el lado citosólico, es el más pequeño de todos los dominios, se compone de unos 110 aminoácidos situados entre M 2 y M 3 y su función es la de controlar el movimiento del sistema. Además, posee un motivo con los aminoácidos TGE capaz de controlar la reacción de defosforilación. En tercer lugar, el dominio de fosforilación (P) situado en la cara citosólica también, contiene el residuo catalítico del aspartato (D135) junto con una serie de secuencias altamente conservadas de residuos DKTGTLT, común para todas las ATPasas de tipo P. Finalmente, el dominio de unión a nucleótidos (N), que sobresale hacia el citosol y es el más grande de todos, está conectado al dominio P por una región peptídica de bisagra, que permite el acercamiento de ambos dominios y así la transferencia del grupo fosfato desde el ATP al residuo aspartato del dominio P (MacLennan y Green, 2000; Vangheluwe y cols., 2009). Esta transferencia conlleva un cambio conformacional de los dominios M permitiendo el paso del  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citoplasma hacia el lumen del retículo.

El estudio de la estructura y sus variadas conformaciones condujo a la descripción detallada del mecanismo de transporte de la bomba SERCA1a (**Fig. I12**). Se distinguen dos estados principales: el E1, de alta afinidad; y el E2, de baja afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$ . El ciclo catalítico se inicia con el paso del estado **E2** al estado **E1·2Ca<sup>2+</sup> (D→A)**, que es producto de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y su unión a los dominios M1 y M2, que tienen residuos con siete átomos de oxígenos que se coordinan con el  $\text{Ca}^{2+}$ , característico de los sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  de alta afinidad. El segundo paso transforma el estado **E1·2Ca<sup>2+</sup>**, pasando por el estado intermedio **E1~P·2Ca<sup>2+</sup>**, en el estado de alta energía **E1·ATP~E1P (A→B)**, resultado del enlazamiento de los dominios P y N y la fosforilación del dominio P en el residuo D135 tras la hidrólisis de ATP, que provoca el cierre del sitio de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  producto del cambio de orientación del dominio A. El tercer paso implica el cambio del estado de alta energía **E1·ATP~E1P** al estado intermedio de baja energía **E2~P (B→C)**, liberando el  $\text{Ca}^{2+}$  que se intercambia por  $\text{H}^+$ , la reorientación del dominio (A) abre la vía de salida del  $\text{Ca}^{2+}$  al lumen. Finalmente, el cambio de estado **E2~P** a **E2 (C→D)** que reinicia el ciclo, con la defosforilación del dominio P que comienza con la entrada de una molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  al dominio P,

## 1. INTRODUCCIÓN.

provocando una nueva rotación del dominio A reposicionando los dominios M1 y M2 (Toyoshima, 2008).



**Figura I12. Ciclo de reacción de SERCA.**

El ciclo de la bomba consiste en una serie de reacciones bioquímicas durante las cuales la bomba cambia entre dos estados conformacionales: un estado E1, en que el sitio de unión a  $Ca^{2+}$  se enfrenta al citoplasma, y un estado E2, donde el sitio de unión a  $Ca^{2+}$  ha cambiado al lado opuesto (luz del RE) y el  $Ca^{2+}$  se libera a la luz. Durante cada ciclo, se bombean dos iones  $Ca^{2+}$  en intercambio por 3  $H^+$ . Se destaca el residuo D351 implicado en la reacción de fosforilación [figura modificada de (Brini y Carafoli, 2009)].

Una de las señas de identidad de ATPasas tipo P es su regulación, lo que les permite adaptarse a las circunstancias cambiantes. La forma más directa de regulación son los propios niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  y de ATP. La SERCA es, además, sensible a la regulación por diferentes proteínas reguladores, tales como el fosfolamban (PLN) y la sarcolipina (SLN). El PLN es una pequeña proteína transmembrana de 52 aminoácidos y que defosforilada se une a SERCA e inhibe su actividad, mientras que cuando está fosforilada por PKA o por CaMKII no se une a SERCA y ésta se activa (MacLennan y Kranias, 2003). La SLN se asemeja a PLN en la región transmembrana pero difiere en la zona citoplasmática. El PLN se expresa preferentemente en las células del músculo cardiaco y la SLN en las células musculares esqueléticas (Vangheluwe y cols., 2005).

### 1.3.1.3 ATPasa de $\text{Ca}^{2+}$ de la vía secretora (SPCA).

La ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  de la vía secretora, denominada SPCA, también pertenece al grupo de las ATPasas de tipo P y es responsable de parte del relleno de  $\text{Ca}^{2+}$  del aparato de Golgi (Go). El gen de la SPCA fue inicialmente descrito en levaduras y se denominó *pmr1*<sup>28</sup> por su homología con otro gen llamado *pma1*<sup>29</sup> (Rudolph y cols., 1989). Los análisis de secuencias revelaban casi un 30% de homología entre el gen *pmr1* y el de la SERCA. Posteriormente, se sugirió que *pmr1* codificaba una ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  semejante a la SERCA y a la PMCA.

En humanos el gen homólogo de *pmr1* es el ATP2C y existen dos tipos (ATP2C1 y ATP2C2) capaces de generar las proteínas SPCA1 y SPCA2, respectivamente. Además, el gen ATP2C1 puede generar cuatro variantes más mediante *splicing* con diferencias en sus extremos C-terminales (SPCA1a-d) (Hu y cols., 2000a; Sudbrak y cols., 2000). La SPCA tiene un tamaño aproximado de 104 kDa. Análogamente a SERCA, contiene una región citosólica con un dominio P, uno A, uno N y uno transmembrana formado por 10 hélices (M 1-M 10) (**Fig. 111**). Poseen un único sitio de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ , también capaz de unirse a otro catión divalente como el  $\text{Mn}^{2+}$  (Dode y cols., 2005). La SPCA (1-2) se localiza principalmente en el Go. Por otra parte, la distribución tisular de SPCA1 es más ubicua mientras que SPCA2 se expresa principalmente en tejidos de carácter secretor (Faddy y cols., 2008; Wootton y cols., 2004). Las distintas isoformas de SPCA1 (a-d) poseen diferencias en la velocidad de recaptación y en la afinidad

---

<sup>28</sup> *Pmr1*: Plasma membrane related 1.

<sup>29</sup> *Pma1*: Plasma membrane ATPase.



## **1. INTRODUCCIÓN.**

---

por  $\text{Ca}^{2+}$  que responderían a una adaptación a la función de la enzima. Así, la SPCA1 se localiza en el Go de células poco secretoras, con una velocidad de recaptación más baja y una afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  muy alta (Van Baelen y cols., 2003). Al contrario, en células secretoras, en donde se forman vesículas con alto contenido de  $\text{Ca}^{2+}$ , se expresa SPCA2, que tiene una velocidad de recaptación mayor y una afinidad menor a  $\text{Ca}^{2+}$  (Vanoevelen y cols., 2005a).

Una particularidad de la SPCA1 es que la pérdida de una copia funcional del gen (ATP2C1) causa la enfermedad de Hailey-Hailey, un trastorno de la piel que surge a edad adulta y causa vesículas y erosiones recurrentes en las áreas de flexión articular (Missiaen y cols., 2004a). En distintos pacientes se han identificado 13 tipos de mutaciones diferentes del gen ATP2C1, que incluyen mutaciones sin sentido, inserciones, deleciones y mutaciones en la zona de *splicing* (Sudbrak y cols., 2000).

### **1.3.1.4 Propiedades cinéticas de SERCA y SPCA.**

Las ATPasas, SERCA y SPCA, poseen parámetros cinéticos distintos que permiten distinguirlas unas de otras. Estos parámetros cinéticos proporcionan información como la concentración de saturación de cada enzima y la velocidad máxima de reacción. En esta tesis nos enfocamos en algunas de estas propiedades cinéticas tanto de SERCA y como de SPCA. En la **Tabla 2** se han recopilado los valores de afinidad relativa por el  $\text{Ca}^{2+}$  y la velocidad máxima de algunas de las isoformas de SERCA y SPCA a partir de los datos disponibles en la literatura (Brini y Carafoli, 2009; Dode y cols., 2005; Lytton y cols., 1992; Periasamy y Kalyanasundaram, 2007; Vangheluwe y cols., 2009).

**Tabla 2. Características cinéticas de las ATPasas de Ca<sup>2+</sup> SERCA y SPCA.**

ATPasa	n <sub>H</sub> *	K <sub>0,5</sub> en μM	Velocidad
SERCA1a	2,1	0,44 ± 0,01	+++
SERCA2a	2,2	0,38 ± 0,01	++
SERCA2b	1,7	0,27 ± 0,03	+
SERCA3	1,8	1,1 ± 0,1	+
SPCA1a	1,18	0,041 ± 0,003	+
SPCA1b	0,90	0,017 ± 0,003	+
SPCA1d	0,98	0,037 ± 0,004	+
SPCA2	N.D	0,025 aprox.	++

\* Coeficiente de Hill.

### 1.3.1.5 Inhibidores de PMCA, SERCA, y SPCA.

El vanadato es un inhibidor inespecífico capaz de inhibir todas las ATPasas de tipo P. Además, existen inhibidores de alta afinidad, específicos para la SERCA, como la taspigargina (Tg), el ácido ciclopiazónico (CPA) y la 2,5-di-ter-butilhidroquinona (TBH). Recientemente se ha descrito también un inhibidor específico de SPCA el 2-hidroxi-3-ter-butyl-5-metil-fenil-metano (bis-fenol) (Lai y Michelangeli, 2012).

La Tg, una lactona extraída de la planta *Thapsia garganica*, es el inhibidor más específico de SERCA. Se une a la SERCA a concentraciones subnanomolares, en una región entre los dominios M 3, M 5 y M 7, estabiliza el movimiento entre ellas y favorece el estado E2 de forma irreversible. Aunque la afinidad de la Tg es alta para todas las isoformas, ésta puede variar entre los distintos tipos de SERCA (**Tabla 3**).

El ácido ciclopiazónico (CPA) es una toxina y la 2,5-ter-butyl-hidroquinona (TBH) un compuesto sintético. Ambos inhiben a la SERCA estabilizando su estado E2 y alterando los dominios M 1, M 2 y M 4. A diferencia de la Tg, la inhibición puede ser revertida con un aumento de las concentraciones de ATP o de Ca<sup>2+</sup>. En la **Tabla 3** se resumen los parámetros cinéticos (K<sub>d</sub>, IC<sub>50</sub>) de cada inhibidor sobre las distintas ATPasas y sus isoformas.

## 1. INTRODUCCIÓN.

Tabla 3. Potencia de los inhibidores Tg, CPA y TBH sobre la actividad de las distintas ATPasas (Lai y Michelangeli, 2012; Vangheluwe y cols., 2009).

Inhibidor	ATPasa	Tipo de ensayo	Potencia
Tapsigargina	SERCA 1	Recaptación de <sup>45</sup> Ca % fosforilación Actividad de ATPasa	Inhibición máxima = 25 – 100 nM IC <sub>50</sub> = 0,03 nM K <sub>i</sub> = 0,2 nM
	SERCA 2	Recaptación de <sup>45</sup> Ca Actividad de ATPasa	Inhibición máxima = 25 – 100 nM K <sub>i</sub> = 1,3 nM
	SERCA 3	Recaptación de <sup>45</sup> Ca Actividad de ATPasa	Inhibición máxima = 25 – 100 nM K <sub>i</sub> = 12 nM
	SPCA 1	% de fosforilación	IC <sub>50</sub> = 28 μM
	SPCA 2	% de fosforilación	IC <sub>50</sub> = 2 μM
CPA	SERCA1	Actividad ATPasa	K <sub>i</sub> = 0 90 nM
	SERCA2	Recaptación de <sup>45</sup> Ca Actividad ATPasa	IC <sub>50</sub> = 0,7 – 1,6 μM K <sub>i</sub> = 2,5 μM
	SERCA 3	Actividad ATPasa	K <sub>i</sub> = 0,6 μM
	SPCA 1	Recaptación de <sup>45</sup> Ca	IC <sub>50</sub> = 165 - 337 μM
	SPCA2	N.D	N.D
TBH	SERCA 1	Actividad ATPasa	K <sub>i</sub> = 7 μM
	SERCA 2	Recaptación de <sup>45</sup> Ca Actividad ATPasa	IC <sub>50</sub> = 1 – 1,4 μM K <sub>i</sub> = 2,6 μM
	SERCA 3	Actividad ATPasa	K <sub>i</sub> = 1,7 μM
	SPCA 1	Recaptación de <sup>45</sup> Ca	IC <sub>50</sub> < 1 mM
	SPCA 2	N.D	N.D
Bis-Fenol	SERCA2	Actividad ATPasa	IC <sub>50</sub> =62 μM
	SPCA1	Actividad ATPasa	IC <sub>50</sub> =0,013μM

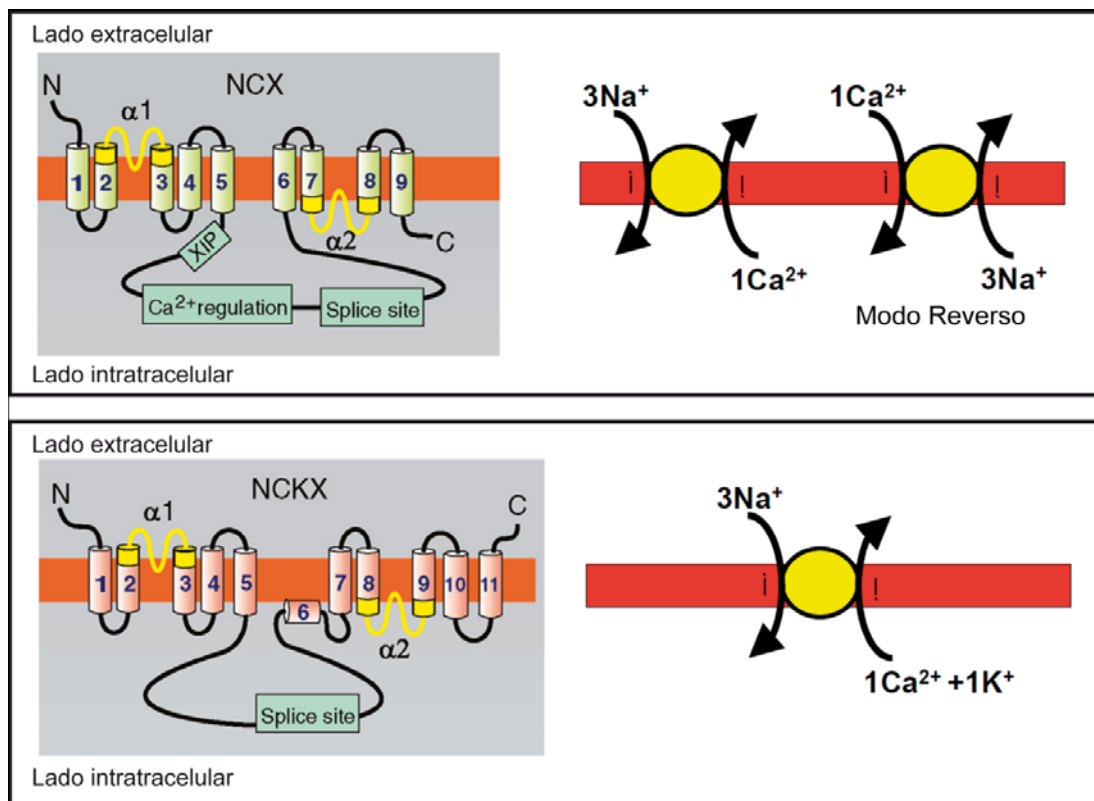
### 1.3.2 Intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) y $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCKX).

El NCX es, junto a la ATPasa PMCA, el principal sistema de extrusión del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico al medio extracelular, especialmente relevante en el corazón. Intercambia 1 ión de  $\text{Ca}^{2+}$  por 3 iones de  $\text{Na}^+$  utilizando el gradiente electroquímico de este último como energía para conducir el  $\text{Ca}^{2+}$  en contra de su gradiente (Reeves y Hale, 1984; Reuter y Seitz, 1968). Existen tres genes que codifican tres isoformas del intercambiador NCX (1-3) y mediante *splicing* son capaces de generar varios tipos más. Todos ellos comparten propiedades cinéticas y funcionales (Li y cols., 1994; Nicoll y cols., 1996). Los NCX (**Fig. I13**) tienen un tamaño aproximado de 110 kDa y en su estructura se aprecian nueve dominios transmembrana (TM) y un segmento citoplasmático en bucle que une los TM 5 y TM 6. También tiene dos zonas llamadas  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{Na}^+$ , respectivamente (Nicoll y cols., 2013).

Los NCX tienen poca afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$  pero una gran capacidad para transportarlo en comparación con la PMCA. Esta propiedad le permite expulsar grandes cantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el interior de la célula (Carafoli y cols., 2001). Estos transportadores tienen gran importancia en las células cardiacas, en las que constituye el sistema predominante de extrusión de  $\text{Ca}^{2+}$  (Blaustein y Hodgkin, 1969). Al contrario, en células no excitables como las HeLa no se ha detectado su presencia (Low y cols., 1993)

Los NCKX fueron descubiertos por primera vez en los bastones retinianos y se diferencian de los NCX en que son capaces de intercambiar 1 ión de  $\text{Ca}^{2+}$  más 1 ión de  $\text{K}^+$  por de 4 iones de  $\text{Na}^+$ . Mientras que algunas de sus características estructurales se asemejan a los encontrados en NCX (**Fig. I13**), existen diferencias claras en sus secuencias. Las zonas  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  representan las zonas de unión de cationes durante la reacción de intercambio, además, poseen 11 dominios transmembrana con un bucle citoplasmático entre los dominios TM 5 y TM 6 (Altimimi y Schnetkamp, 2007).

## 1. INTRODUCCIÓN.



**Figura I13. Estructura y función de los intercambiadores Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> y Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>/K<sup>+</sup> (NCX y NCKX).**

La organización y funcionamiento de los NCX se muestra arriba y el de los NCKX se muestra abajo. Ambos tienen un gran bucle citoplasmático en el que se puede apreciar una región variable donde ocurre el *splicing*. Los NCX también tienen sitio de regulación por Ca<sup>2+</sup> y una región de unión a XIP, un inhibidor peptídico. Ambos intercambiadores tienen dos regiones ( $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ , que se muestran en amarillo) que contienen repeticiones  $\alpha$ , altamente homólogas, y se cree que son los sitios en los que los cationes se unen a los intercambiadores. Los NCX tienen dos modos de acción: el principal (extrusión de Ca<sup>2+</sup> si la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>C</sub> es alta) en el cual se intercambian 3 iones Na<sup>+</sup> del medio extracelular por 1 ión Ca<sup>2+</sup> del medio intracelular y el modo inverso. Los NCKX solo tienen un modo de acción (extrusión de Ca<sup>2+</sup>), en el cual se intercambian 3 iones Na<sup>+</sup> del medio extracelular por 1 ión de Ca<sup>2+</sup> más 1 ión de K<sup>+</sup> del medio intracelular [figura modificada de (Berridge, 2012)].

### 1.3.3 El uniportador de $\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial (MCU).

La captación del  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria se observó y caracterizó inicialmente en la década de los 60 en células de riñón de rata, cuyas mitocondrias acumulan grandes cantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  cuando éste se añade al medio (Deluca y Engstrom, 1961). Más tarde se encontró que, en reposo, la matriz mitocondrial contiene muy poco  $\text{Ca}^{2+}$ , concentraciones similares a las de  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , con valores comprendidos entre 50 y 100 nM; sin embargo, si la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  aumenta, se activa el uniportador mitocondrial y permite la entrada masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria que puede alcanzar concentraciones de cientos de micromolar (Babcock y cols., 1997; Montero y cols., 2000).

La captación mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  es un factor clave en el control de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a un estímulo. Gracias a su capacidad tamponadora de  $\text{Ca}^{2+}$ , las mitocondrias participan en la regulación de distintos procesos dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico como son la contracción o la secreción (Montero y cols., 2000). Por otro lado, en el interior de las mitocondrias el  $\text{Ca}^{2+}$  ejerce funciones reguladoras de la propia actividad mitocondrial, regulando la piruvato deshidrogenasa y otras dos enzimas limitantes del ciclo de Krebs. En presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  a concentraciones micromolares se estimula la respiración. Por otro lado, un aumento excesivo del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial puede llevar a la muerte celular al estimular la liberación de factores promotores de apoptosis, por lo que es importante regular la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  de las mitocondrias (Bernardi y Rasola, 2007).

La principal vía de entrada del  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria es a través del uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$ , que tiene como características principales el estar localizado en la membrana interna de la mitocondria y el ser activado por las elevaciones de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ . La entidad molecular del uniportador (MCU<sup>30</sup>) fue una incógnita durante décadas hasta que, dos laboratorios de forma independiente lograron identificarlo casi simultáneamente (Baughman y cols., 2011; De Stefani y cols., 2011). Esta proteína tiene un tamaño de 40 kDa, en su secuencia se han identificado 2 dominios transmembrana y comparte la misma distribución tisular que la proteína MICU1, recientemente caracterizada como regulador del uniportador (Perocchi y cols., 2010).

---

<sup>30</sup> MCU: Mitochondrial Calcium Uniporter.

## **1. INTRODUCCIÓN.**

---

Se han descrito una serie de fármacos que actúan como inhibidores del MCU como el rojo de rutenio y el Ru360 (Reed y Bygrave, 1974; Ying y cols., 1991). Algunos cationes divalentes como el  $\text{Sr}^{2+}$ , el  $\text{Mn}^{2+}$ , el  $\text{Ba}^{2+}$  y el  $\text{La}^{2+}$  compiten con el  $\text{Ca}^{2+}$  por el sitio de unión a MCU, ejerciendo así una inhibición competitiva (Carafoli y cols., 1965; Drahota y cols., 1965).

### **1.3.4 Proteínas que ligan $\text{Ca}^{2+}$ .**

El  $\text{Ca}^{2+}$  que entra al citosol se une mayoritariamente a proteínas fijadoras de  $\text{Ca}^{2+}$  y únicamente una pequeña proporción (alrededor de un 1%) se encuentra en estado libre. La capacidad amortiguadora de la célula es el resultado del cociente entre el  $\text{Ca}^{2+}$  ligado y libre en el citosol y permite comparar el efecto tamponador de cada célula (Burgoyne y Weiss, 2001). En la célula existen unas 200 proteínas distintas capaces de unirse al  $\text{Ca}^{2+}$  y de ejercer su función como efectores o como tamponadores de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Las proteínas que se unen al  $\text{Ca}^{2+}$  y actúan como amortiguadores pueden modificar la velocidad de difusión o la formación de gradientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y esto implica en que afectan dramáticamente al modelado de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  y a sus propiedades espacio-temporales (Burns y cols., 1994). La calretinina, la calbindina D-28 y la paralbúmina son algunos ejemplos de proteínas que se unen al  $\text{Ca}^{2+}$ .

La paralbúmina es una proteína amortiguadora lenta, es decir, que no responde a la aparición rápida de la mayoría de señales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, la paralbúmina se une al  $\text{Ca}^{2+}$  una vez que la señal ya ha aparecido y por lo tanto influye en la velocidad a la que se recuperan los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  de reposo. Esta proteína se expresa principalmente en el músculo esquelético, donde participa en el proceso de relajación.

La calbindina D-28K es uno de los principales tampones citosólicos. Es una proteína amortiguadora rápida que tiene una participación importante en la modulación de las propiedades espacio-temporales del transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$ . La calbindina juega un importante papel en neuronas, donde puede modular el tamaño del transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$ , que en este tipo celular está muy localizado.

La calretinina es una proteína estrechamente relacionada con la calbindina y que también puede modular el transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$ . Se encuentra principalmente en el citoplasma y también en lugares específicos de la célula facilitando la formación de microdominios de  $\text{Ca}^{2+}$ .

La calreticulina es una proteína de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  de baja afinidad que se encuentra dentro del lumen del RE. También se ha detectado en el núcleo, el citoplasma y en el medio extracelular, ya que puede ser secretada al medio extracelular durante los períodos de estrés celular. Su ubicación principal, sin embargo, es el lumen del RE, en el que funciona como el principal tampón de  $\text{Ca}^{2+}$ , manteniendo la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$  adecuada para el plegamiento de las proteínas (Berridge y cols., 2003).

La presencia de estas proteínas que ligan  $\text{Ca}^{2+}$  determina la capacidad amortiguadora de cada célula. Como ejemplo de células con capacidad amortiguadora de  $\text{Ca}^{2+}$  reducida se encuentran las células cromafines, que son capaces de generar grandes señales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Zhou y Neher, 1993). En el otro extremo, las células de Purkinje expresan grandes cantidades de paralbúmina y calbindina y, como consecuencia de ello, estas células tienen una gran capacidad endógena de amortiguación de  $\text{Ca}^{2+}$ .

### 1.4 Orgánulos intracelulares y su función como depósitos de $\text{Ca}^{2+}$ .

#### 1.4.1 Retículo endoplásmico (RE).

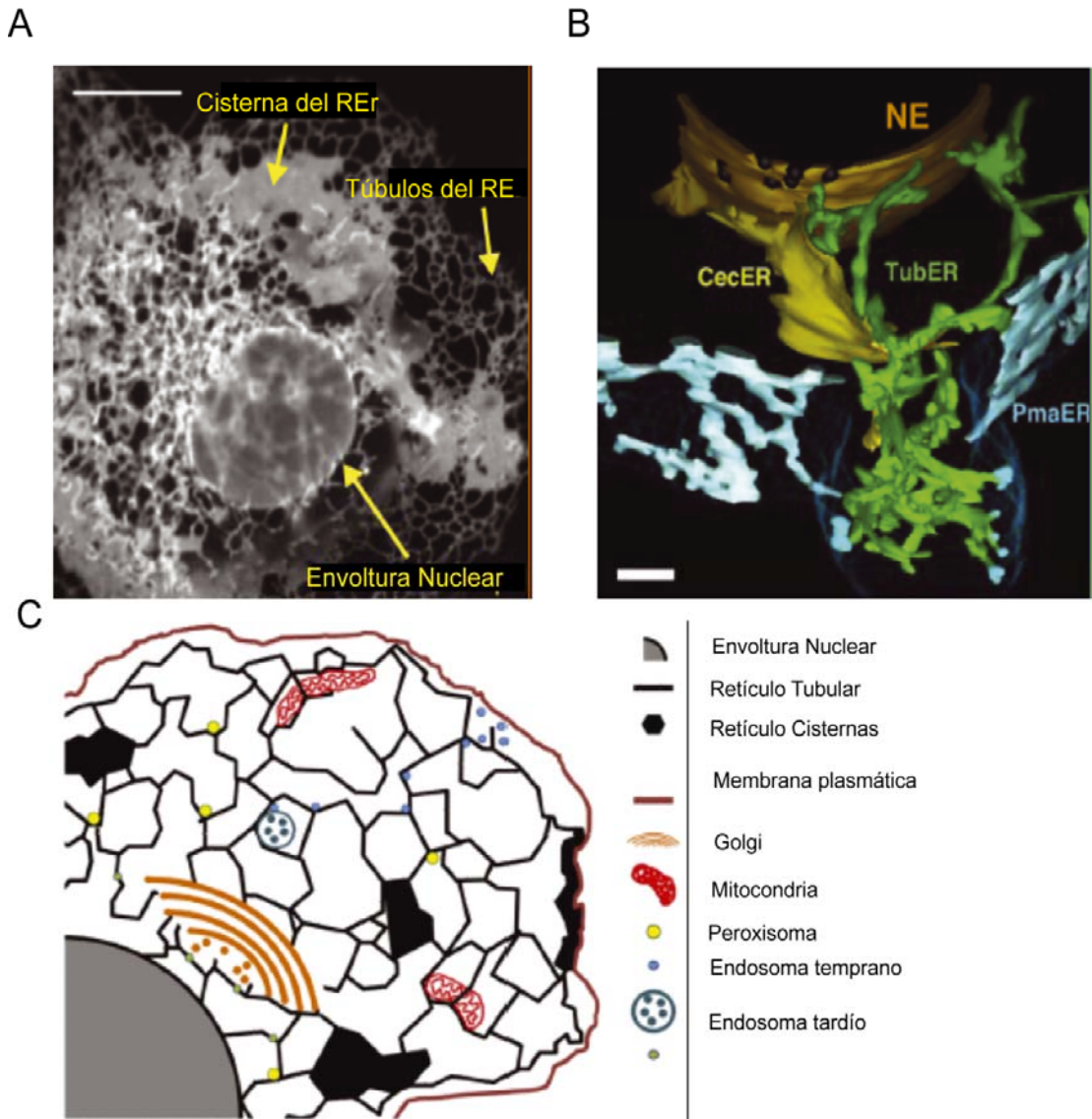
El RE realiza variadas funciones en la célula como la síntesis de lípidos, la síntesis y secreción de proteínas y el almacenamiento y liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  (Baumann y Walz, 2001). Es el orgánulo intracelular membranoso más grande de las células eucariotas y se extiende por toda la célula como una red de membranas continua que rodea un lumen único. El RE tiene diferentes regiones con diversas formas, unas planas y otras tubulares y, a su vez, mantiene una forma global que permite que otros componentes citoplasmáticos puedan difundir a lo largo de la célula. Algunas regiones del RE pueden distinguirse fácilmente mediante microscopía de fluorescencia, como son la envoltura nuclear ( $\text{NE}^{31}$ ), las cisternas citoplasmáticas y los túbulos interconectados, y todos ellos dan forma al conjunto del RE (**Fig. 114**). La NE es un dominio diferenciado del RE que se compone de dos membranas, una interna y otra externa, separadas por un espacio perinuclear y comunicadas entre si mediante poros (Hetzer y cols., 2005).

---

<sup>31</sup> NE: Nuclear envelope.



## 1. INTRODUCCIÓN.



**Figura 114. Dominios morfológicos del RE.**

(A) Células Cos-7 que expresan el marcador de membrana RE-GFP Sec61 $\beta$  para visualizar el RE. En estas células el RE es una red membranas continua que comparten un lumen común. Esta red está formada por la envoltura nuclear, cisternas y túbulos. En (B) se observa una reconstrucción tomográfica de microscopía electrónica que revela la organización en 3D del RE, en las células de levadura. Se pueden apreciar varias estructuras, la envoltura nuclear NE, la cisterna central (CecER) (ambas en amarillo), la red tubular (TubER) (en verde) y la asociación con la membrana plasmática (PmaER) (en azul). Hay que tener en cuenta que la NE es continua con la PmaER a través de dominios que son tanto tubulares y como cisternas. En (C) se muestra un modelo que representa los dominios tubulares y de cisternas del RE y los sitios de contacto con otros orgánulos [figura cosntruida a partir de (West y cols., 2011)].

El resto del RE nace de la membrana externa como una extensa red de cisternas y túbulos que se extiende por todo el citoplasma hasta la membrana plasmática. La diferencia entre las cisternas y los túbulos es su forma, que está determinada por la curvatura de sus membranas siendo más pronunciada en los túbulos debido a la presencia de una familia de proteínas llamada reticulones y las proteínas DP1/Yop1 (**Fig. I14**) (West y cols., 2011). La prevalencia de túbulos frente a cisternas puede variar entre los distintos tipos celulares, lo que sugiere que la forma del RE puede venir determinada por la función celular (Shibata y cols., 2006). Por ejemplo, las células secretoras, como las del páncreas, que deben sintetizar y secretar un gran número de proteínas, están favorecidas con regiones del RE en forma de cisternas que, a su vez, están enriquecidas de ribosomas en sus membranas. Por el contrario, el RE de las células musculares, que controlan rápidos movimientos de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la contracción está enriquecido de dominios en forma de túbulos, casi desprovistos de ribosomas. Actualmente no existe una evidencia clara para definir las regiones de forma funcional; sin embargo, se cree que los túbulos podrían constituir el sitio preferido para la formación de vesículas que se desplazaron hasta el Go (Hammond y Glick, 2000).

El RE, a través de su extensa membrana, mantiene contacto con casi todos los orgánulos intracelulares (**Fig. I14C**), destacando especialmente la estrecha relación que existe con el Go y con las mitocondrias.

Tradicionalmente, la relación entre el RE y el Go se ha descrito en el contexto del transporte vesicular de proteínas que se tratará con más detalle en una sección posterior. Además, cabe destacar una estructura llamada de transición del retículo (tRE), íntimamente relacionada con zonas del Go vinculadas al transporte retrogrado y anterogrado de proteínas. Por último, el RE y el Go parecen tener un estrecho contacto en regiones implicadas en el transporte de lípidos (transporte no vesicular), como el caso del fosfatidi-inositol que puede pasar directamente desde el RE al Go mediante la proteína NIR2, en zonas en donde la distancia entre RE y Go se reduce a 10 nm (Lev, 2010). La existencia de una interacción física entre el RE y la mitocondria se ha sugerido tras resultados de microscopía electrónica donde han observado distancias entre ambos orgánulos de unos 25 nm en algunas zonas (Csordas y cols., 2006; Rizzuto y cols., 1998). La mitocondria tiene la capacidad de captar en su interior entre el 25-50 % del  $\text{Ca}^{2+}$  liberado por el RE y gran parte de esto se debe a la estrecha distancia que existe en algunas zonas de la célula entre estos dos orgánulos (Rizzuto y cols., 1998). Recientemente, se han descritos diversas proteínas involucradas en la conexión entre el RE y la mitocondria, como son la mitofusina, DLP-1/DRP-1 y PACS-2

## **1. INTRODUCCIÓN.**

---

(Simmen y cols., 2005; Singaravelu y cols., 2011; Varadi y cols., 2004). Los sitios de contacto entre el RE y las mitocondrias facilitan una adecuada regulación de la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  del citosol. A su vez, la estrecha relación RE-mitocondria permite también que la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  regule la producción de ATP en la mitocondria (Csordas y cols., 2006).

El RE es el principal compartimento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  de la célula y su equivalente en las células musculares es el retículo sarcoplásmico (RS). Tiene gran importancia como reservorio de  $\text{Ca}^{2+}$ , alcanzando una concentración de casi  $10^{-3}$  M (Montero y cols., 1997). La acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE es producto de la actividad de SERCA y la liberación de este  $\text{Ca}^{2+}$  se produce tras la activación de dos receptores del RE: el  $\text{IP}_3\text{R}$  y el RyR (Bootman y cols., 2002; Cancela, 2001). La liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  del RE es activada por distintos agonistas extracelulares que inducen la formación intracelular de  $\text{IP}_3$ , o bien la entrada hacia el interior de la célula de una pequeña cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$ , con la consiguiente activación de los RyR. La modulación específica de la interacción entre cada agonista con su receptor confiere al RE la capacidad de provocar una liberación rápida y controlada de  $\text{Ca}^{2+}$ .

El  $\text{Ca}^{2+}$  contenido en el RE no se encuentra de forma libre, sino que está principalmente unido a proteínas ligadoras de  $\text{Ca}^{2+}$  que actúan como tampón uniéndose al  $\text{Ca}^{2+}$  con baja afinidad ( $K_d = 10^{-6}$  M), como por ejemplo la calreticulina; tratada en una sección anterior, la calnexina o la calsecuestrina.

La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE juega un papel protagónico en muchos procesos celulares en distintos tipos de células. Por ejemplo, en células marcapasos del nodo seno-auricular, el ritmo de los latidos viene determinado por oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico constantes procedentes del acoplamiento de los VOC y la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE a través de los RyR (Mangoni y Nargeot, 2008). En células musculares esqueléticas, el acortamiento del sarcómero y la consecuente contracción muscular son producto de la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  liberado desde el RE, tras la activación de los RyR, a la proteína troponina. La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE es consecuencia de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los VOCs, a su vez activados por la ACh liberada por las motoneuronas (Rome, 2006). En el terminal nervioso sináptico, la fusión vesicular y la consecuente exocitosis de neurotransmisores son producto de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE tras una despolarización (Bouchard y cols., 2003). En el soma de la neurona la activación de vías de señalización de fosfatasa y quinasas está acoplada a la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE (Berridge, 2002). Por último, la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  del RE en las dendritas se ha involucrado en la regulación de la respuesta post-sináptica y en la plasticidad sináptica (Park y cols., 2008).

### 1.4.2 El aparato de Golgi (Go).

El aparato de Golgi (Go) es un orgánulo presente en todas las células eucariotas y crucial para la realización de funciones como el procesamiento, la clasificación, el tráfico y la secreción de proteínas. El Go tiene una estructura claramente definida (**Fig. I15**) en sacos discoidales, apilados e interconectados llamados cisternas, dispuestos en forma de cintas en la proximidad del núcleo (Ladinsky y cols., 1999). Esta disposición, además, presenta una polaridad definida, con una cara *cis* (cGo) y otra *trans* (tGo), deducidas inicialmente a partir de la identificación de actividades enzimáticas presentes exclusivamente en cada una de las caras (Novikoff y cols., 1971).

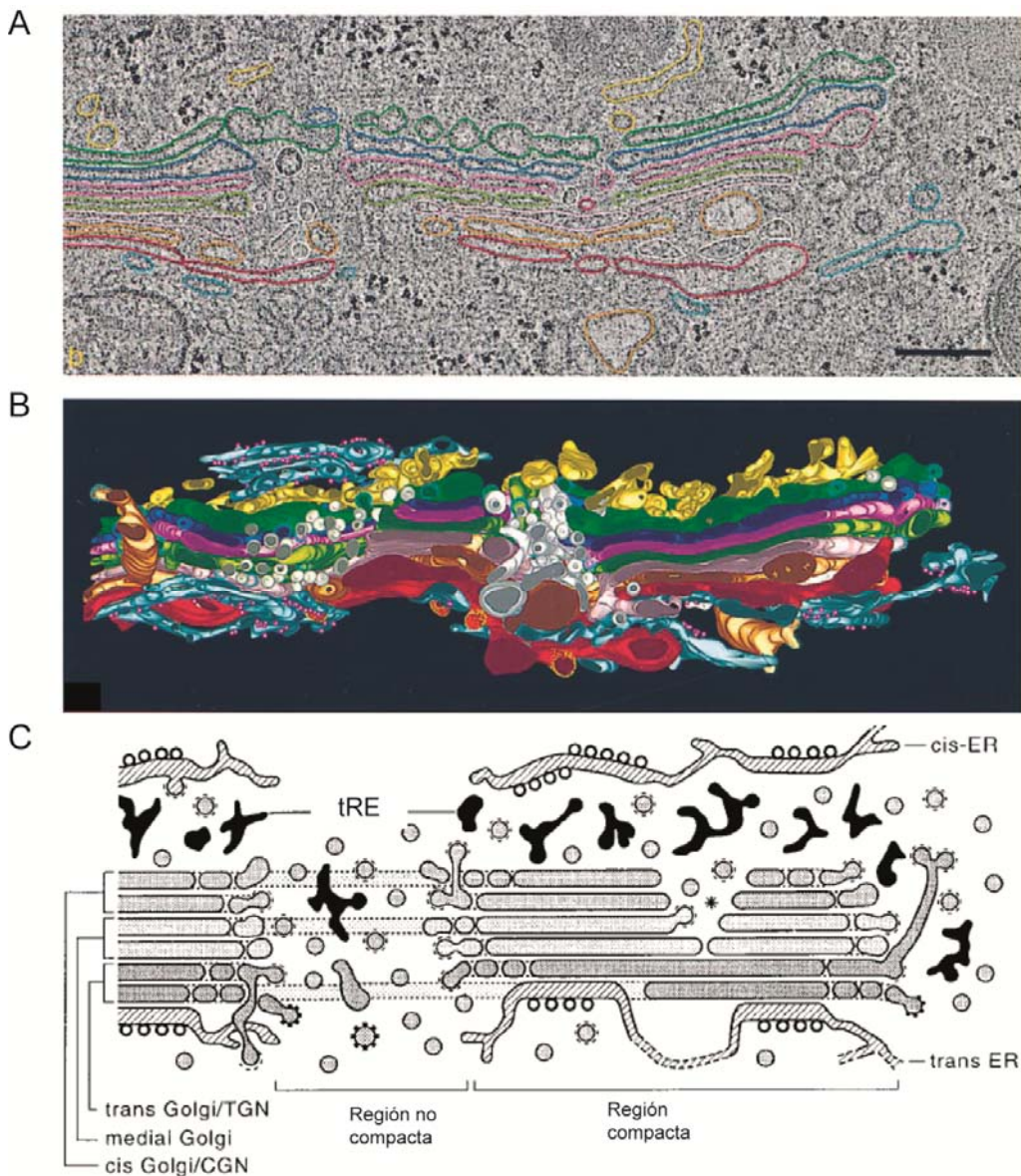
Un análisis detallado de la estructura del Go muestra diferencias en las distintas zonas del Go. En el cGo se aprecian fenestras de aproximadamente 60 nm que proporcionarían vías eficaces para la difusión de elementos de unas cisternas a otras; también se reconocen canales que conectan el cGo con el tGo. La presencia de vesículas en el cGo sugiere que esta región participa en el transporte vesicular anterógrado y retrógrado. Posteriormente se ha determinado que el cGo exhibe estructuras peculiares en forma de pocillos que permiten diferenciarlo del tGo (Rambourg y cols., 1996).

Por otra parte, la zona media del Go carece de muchos de los elementos distintivos del tGo y cGo. La zona intermedia es menos fenestrada y el tamaño de estas es intermedio comparado con el tamaño de las fenestras del tGo y cGo. Además, cuando se analiza su estructura desde el cGo al tGo se observa un gradiente en todos los elementos cuantificados. Finalmente, el tGo aparece mucho más heterogéneo, presentando cisternas con características diferentes con fenestras de distintos tamaños y volúmenes de cisternas variados. Una característica particular del tGo es que parte de sus cisternas, las más alejadas de la zona cGo, exhiben una morfología en brotes y un recubrimiento con clatrina (Klumperman y cols., 1998; Ladinsky y cols., 1999). Una subregión del tGo reticular, con presencia de vesículas y protuberancias, es la definida como TGN<sup>32</sup>, que está conectada a través de túbulos que permiten la clasificación y el envío de proteínas a través de las distintas vías de secreción (Griffiths y cols., 1995).

---

<sup>32</sup> TGN: Trans Golgi Network.

## 1. INTRODUCCIÓN.



**Figura 115. Modelo de la organización estructural del aparato de Golgi (Go).**

Reconstrucción tomográfica de una porción del Go de las células NRK. Los colores utilizados que representan los diferentes componentes de los modelos son los mismos en todas las figuras: RE (azul-gris), ribosomas (pequeñas esferas color púrpura), el tRE (amarillo), cisternas del Golgi (verde, púrpura, rosa, oliva, rosa, bronce y rojo) y vesículas libres (blanco). En (A) se muestra una sección tomográfica en la cual se delimitan con color las diferentes estructuras. Se aprecian principalmente elementos del Go (verde, rosa, oliva), en color amarillo el tRE y en azul la membrana del RE. En (B) se aprecia la modelación tomográfica en 3D de todo el plano Z de la muestra. Se pueden distinguir las cisternas del Go apiladas en contacto con elementos del tRE y el RE. En (C) un esquema de las estructuras derivadas de la representación tomográfica. La zona *cis* cercana al núcleo y la zona *trans* más alejada del núcleo (próxima a la membrana plasmática) [figura construida a partir de (Ladinsky y cols., 1999)].

En casi todos los organismos eucariotas el Go se compone de cisternas apiladas (**Fig. I15**), como hemos descrito, y cada cisterna contiene enzimas residentes que procesan secuencialmente proteínas y lípidos, moviéndose a través de ellas vectorialmente. El mecanismo de transporte de proteínas y lípidos en el Go es aún discutido, habiéndose propuesto hasta cinco modelos distintos. El de mayor consenso es el de maduración y progresión de cisternas. Según este modelo, las agrupaciones vesículo-tubulares proceden del RE y se fusionan formando la red de distribución del cGo, esta red madura progresivamente hasta formar primero una cisterna de cGo, después una cisterna medial y así sucesivamente. Así, en la cara cGo se están formando continuamente nuevas cisternas, que migrarían a medida que vayan madurando. Este modelo viene apoyado por observaciones de microscopia electrónica. (Glick y Luini, 2011; Nakano y Luini, 2010).

La estabilidad y la diversidad funcional de muchas proteínas recién sintetizadas dependen de su correcta glicosilación llevada a cabo en el Go. La estructura subcompartimentalizada del Go permite la optimización de las condiciones para que ocurra cada reacción de glicosilación de forma ordenada. Las distintas enzimas responsables de las reacciones de glicosilación se localizan en distintas cisternas, de tal forma que las enzimas que deben actuar tempranamente se localizan en cisternas del cGo y las enzimas que ejercen su acción tardíamente se localizan en las zonas más distales, como el tGo (Puthenveedu y Linsteadt, 2005).

Las primeras evidencias indirectas del Go como compartimento de alto contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  se remontan al año 1991, cuando se describió que una zona perinuclear de la célula era capaz de almacenar una pequeña fracción de  $\text{Ca}^{2+}$  (5% del total de la célula) (Chandra y cols., 1991). En la misma dirección, se publicaron varios artículos que describían la misma zona perinuclear con una significativa sensibilidad a  $\text{IP}_3$  (Hofer y cols., 1995; Zha y cols., 1995). Años más tarde se logró determinar directamente que el Go albergaba en su lumen altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $2 \cdot 10^{-4}$  M) y que gran parte de este  $\text{Ca}^{2+}$  sería almacenado gracias a la actividad de la bomba SERCA (Pinton y cols., 1998).

La acumulación activa de  $\text{Ca}^{2+}$  en el Go es también producto de otra ATPasa, la SPCA, que presenta propiedades diferentes a la bomba SERCA, como hemos descrito anteriormente (Van Baelen y cols., 2003). La bomba SPCA es también capaz de bombear  $\text{Mn}^{2+}$  al lumen del Go, que es requerido para numerosas reacciones enzimáticas que se realizan en este compartimento.

La movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  desde el lumen del Go hacia el citosol se produce, al igual que el RE, mediante receptores y canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo  $\text{IP}_3\text{R}$  y  $\text{RyR}$ ; sin embargo, los cursos temporales de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , de ambos depósitos, son



## **1. INTRODUCCIÓN.**

---

diferentes (Lissandron y cols., 2010; Missiaen y cols., 2004b). Se ha sugerido también que en células que expresan altos niveles de RyR, por ejemplo musculares y neuronales, el Go podría ser un candidato potencial para la activación mediante segundos mensajeros como el NAADP y la ADP ribosa cíclica (cADPr) (Pizzo y cols., 2011).

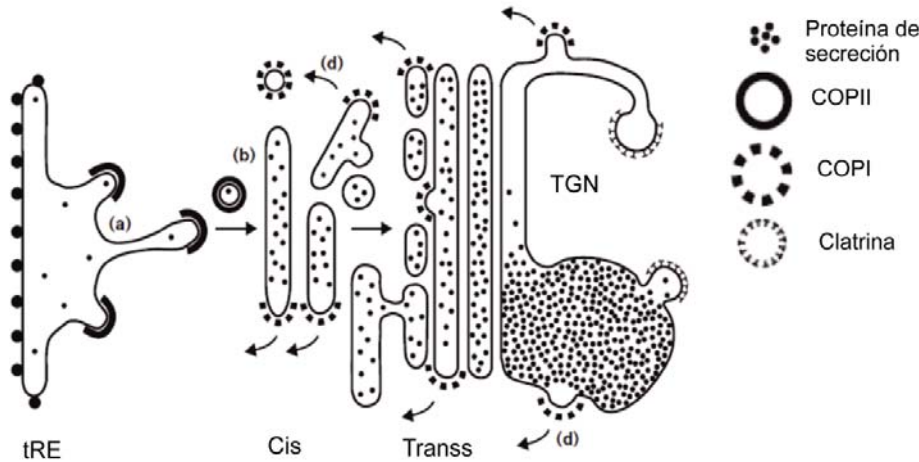
Del mismo modo que en el RE, el Go está equipado con proteínas en el lumen que se unen al  $\text{Ca}^{2+}$ . Cabe destacar que las proteínas de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  del Go no se encuentran en el RE y viceversa. La proteína de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  del Go más abundante y mejor caracterizada es CALNUC. Aunque esta proteína tiene una baja afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$ , su efecto tamponador se justifica por su gran abundancia (Lin y cols., 1999).

Del conjunto de elementos descritos se puede esperar que el Go se comporte como un depósito de  $\text{Ca}^{2+}$ , con bombas ATPasas y receptores-canales. En la última década se ha intentado entender la importancia de este depósito de  $\text{Ca}^{2+}$ . Se ha descrito que la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del Go puede modular la duración y el patrón de los incrementos de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  (Vanoevelen y cols., 2005b). Por otro lado, el  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado en el TGN, a través de la bomba ATPasa SPCA, tendría una estrecha relación con la secreción de proteínas (von Blume y cols., 2011). La alteración de la función como depósito de  $\text{Ca}^{2+}$  del Go se ha relacionado también con un tipo específico de afección de la piel conocida como Haley-Haley (Behne y cols., 2003).

### **1.4.3 Síntesis y tráfico de proteínas RE-Go y la señal de $\text{Ca}^{2+}$ .**

Las proteínas recién sintetizadas son transportadas desde el RE al Go, mediante el transporte anterógrado para ser secretadas; otras, en cambio, son devueltas al RE, mediante el transporte retrógrado (**Fig. I16**) (Spang, 2009). En el transporte anterógrado las proteínas se concentran y se empaquetan en vesículas. Cada proteína posee secuencias específicas de secreción que son reconocidas por un receptor específico del RE ubicado en su membrana. Tras el reconocimiento proteína-receptor, una proteína llamada COPII interactúa con este complejo induciendo la formación de la vesícula, proceso que es coordinado por la proteína clatrina; sin embargo, solo las proteínas bien ensambladas continúan por la vía de secreción, las que no son retenidas en el RE y capturadas por la proteína chaperona BiP (Gorelick y Shugrue, 2001). Las vesículas ya formadas, producto de la acción de COPII y clatrina, comienzan a fusionarse, proceso llamado fusión homotípica. Tras la fusión de vesículas se forma un compartimento de transición,

el tRE, separado y carente de las principales proteínas del RE (Appenzeller-Herzog y Hauri, 2006). Mediante la acción de quinesinas y microtúbulos, las vesículas del tRE, constantemente en formación, se desplazan hasta fusionarse con el cGo para verter su contenido.



**Figura I16. Esquema del transporte de proteínas desde el RE al AG.**

Después de la síntesis, las proteínas salen del RE (a) y esto ocurre en vesículas COPII (COP de *Coating Proteins*). Las vesículas se funden con la membrana del cGo y vacían su contenido en (b). Las proteínas se mueven progresivamente a lo largo del Golgi (de cis a trans; flecha) hasta alcanzar el tGo. Una vez en él las proteínas son clasificadas para la secreción o para la formación de vesículas COPI, implicadas en el transporte retrógrado [figura modificada de (Klumperman, 2000)].

En un paso siguiente, y producto del proceso de progresión y maduración de cisternas, las proteínas se concentran en el TGN en donde son seleccionadas y agrupadas en distintas vesículas (sorting), según sea el destino final de cada proteína. Se han descrito tres tipos de vesículas según el destino final de las proteínas: vesículas que continuarán la vía endosoma-lisosoma, vesículas de la vía constitutiva cargadas con proteínas que forman parte de la membrana plasmática y vesículas de secreción (Glick, 2000; Mellman y Warren, 2000).

El transporte de proteínas residentes del RE al Go induce el transporte retrógrado de estas proteínas para ser devueltas al RE. Estas proteínas son reconocidas por el receptor KDEL del Go y seguidamente se activa la proteína COPI que induce la formación de vesículas que retornan al RE (ver **Fig. I16**) (Klumperman, 2000).

En la actualidad existe escasa evidencia de que la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular es relevante para el tráfico de proteínas. Se ha sugerido que el gradiente de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  entre el RE, Go y el citosol es necesario para el correcto funcionamiento del transporte anterógrado y retrógrado. Ensayos con



## **1. INTRODUCCIÓN.**

inhibidores de SERCA, como la taspigargina, inducen tanto la acumulación de proteínas residentes del RE en el Go, como también la acumulación de proteínas de secreción en el Go (Di Jeso y cols., 1998; Ivessa y cols., 1995). Por otro lado, la inhibición de la expresión de SPCA por silenciamiento con siRNA<sup>33</sup> refleja que la modificación del contenido de Ca<sup>2+</sup> del Go también afecta a la secreción proteica (von Blume y cols., 2011).

### **1.4.4 Orgánulos ácidos (lisosomas y vesículas de secreción).**

#### **1.4.4.1 Lisosomas.**

Los lisosomas son orgánulos altamente ácidos, con un tamaño variable entre 0,1 y 1,2  $\mu\text{m}$ , que realizan un complejo grupo de funciones en las células eucariotas. El lumen de los lisosomas contiene enzimas hidrolíticas que sirven para degradar o procesar tanto macromoléculas exógenas (heterofagia) como endógenas (autofagia) (Saftig y Klumperman, 2009). Recientemente se ha descrito que los lisosomas pueden ser depósitos de Ca<sup>2+</sup> (Morgan y cols., 2011), función en la cual nos centraremos en esta sección.

Los lisosomas están rodeados por una única membrana en la cuál están incluidos una serie de transportadores iónicos que permiten mantener un complejo equilibrio electroquímico (**Fig. I10**). Cabe destacar la bomba de protones v-H<sup>+</sup>ATPAasa, descrita inicialmente en vacuolas, de ahí su nombre. Tiene un tamaño de 910 kDa, está compuesta por catorce subunidades y es capaz de transportar entre dos y cuatro protones hacia el lumen del lisosoma por cada molécula de ATP hidrolizada (Forgac, 2007).

En las membranas de los lisosomas se han descrito también intercambiadores de H<sup>+</sup> (**Fig. I10**), que participa conjuntamente con la v-H<sup>+</sup>ATPAasa en el transporte de protones y en el mantenimiento del pH, entre 4,5 y 6,5. Entre estos cabe mencionar los intercambiadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>.

La captación de Ca<sup>2+</sup> en el lisosoma depende de la fuerza motriz generada por el gradiente de protones en el lumen del lisosoma. Así es, como cualquier alteración en el pH, celular o del lumen lisosomal, provocará una alteración en la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> en el lisosoma. Un ejemplo de este fenómeno es la

---

<sup>33</sup> siRNA: small interference RNA

inhibición específica de la bomba  $v\text{-H}^+\text{ATPasa}$ , con bafilomicina A1, que disminuye la concentración de  $\text{H}^+$  del lumen del lisosoma, provocando así la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  y un aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ; de forma inversa, un incremento en la concentración de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  puede producir un aumento de la concentración de  $\text{H}^+$  en el lumen del lisosoma. Estos datos permitieron demostrar la existencia de un intercambiador  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  que impulsa la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el lumen del lisosoma (**Fig. 110**) (Hilden y Madias, 1989). Otras maniobras que impiden la recaptación de  $\text{Ca}^{2+}$  por parte del lisosoma son la utilización de bases como el  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , que facilitan la alcalinización directa de los lisosomas o la utilización de protonóforos como nigericina o monensina que disipan el gradiente de  $\text{H}^+$  (Churchill y cols., 2002; Fonteriz y cols., 1991; Styrz y Klempner, 1988).

Al igual que en el RE, del total del  $\text{Ca}^{2+}$  presente en el lumen de lisosoma solo una pequeña fracción está en forma libre, dado que la mayor parte del  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentra quelado por grupos aniónicos como fosfatos, sulfatos y carboxilatos (Morgan y cols., 2011).

El estudio de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el lisosoma ha cobrado especial interés recientemente con el hallazgo de que algunos tipos celulares aumentan la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  en respuesta a agonistas intracelulares como el NAADP o cADPr (Bezin y cols., 2006; Cancela y cols., 2000; Gerasimenko y cols., 2006b). Además, recientemente se ha descrito una nueva clase de canales, los  $\text{TPC}^{34}$  (**Fig. 110**), supuestamente localizados en la membrana del lisosoma, con especial permeabilidad a cationes como el  $\text{Ca}^{2+}$  o el  $\text{Na}^+$ , cuya caracterización ha llevado a formular la hipótesis de que tanto NAADP como cADPR ejercerían su función como ligandos específicos de este receptor (Brailoiu y cols., 2009; Calcraft y cols., 2009; Wang y cols., 2012; Zhu y cols.).

### 1.4.4.2 Vesículas de secreción.

Las vesículas de secreción (VS) son el último orgánulo en la vía de transporte de proteínas desde el RE-Go. Se fusionan con la membrana plasmática para verter su contenido al medio externo y comparten algunas de sus características con los lisosomas. Las VS poseen una membrana que los rodea y un lumen con carácter ácido y las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  registradas son de alrededor de  $100 \mu\text{M}$

---

<sup>34</sup> TPC: Two Pore Chanel

## **1. INTRODUCCIÓN.**

---

(Emmanouilidou y cols., 1999; Pozzan y cols., 1994; Rutter y cols., 1994). La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de las VS se ha documentado en varios artículos, en donde se ha propuesto la presencia de  $\text{IP}_3\text{R}$  y  $\text{RyR}$  (Blondel y cols., 1994; SantoDomingo y cols.; Yoo y Albanesi, 1990). El mecanismo de recaptación es también controvertido, habiéndose propuesto intercambiadores de tipo  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  (Goncalves y cols., 1998; Thirion y cols., 1999) e incluso ATPasas de tipo P como SERCA (SantoDomingo y cols., 2010).

### **1.4.5 Mitocondrias.**

Aunque las mitocondrias no son un depósito de  $\text{Ca}^{2+}$  como tal, ocasionalmente son capaces de acumular grandes cantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  en muchos tipos celulares. La cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  que este orgánulo puede acumular depende de la magnitud del transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Los detalles del mecanismo de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial se trataron en la sección 1.1.3. Y como mencionamos en esa sección una de las principales funciones que cumple la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial es transmitir la demanda del aumento metabólico induciendo la producción de ATP (Robb-Gaspers y cols., 1998). Por otro lado, un aumento excesivo del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial puede llevar a la muerte celular al estimular la liberación de factores promotores de apoptosis (Bernardi y Rasola, 2007).

La salida de  $\text{Ca}^{2+}$  de la mitocondria se produce principalmente a través del intercambiador mitocondrial  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Este intercambiador acopla el flujo de 3 iones de  $\text{Na}^+$  a favor de su gradiente electroquímico en intercambio por 1 ion de  $\text{Ca}^{2+}$  en contra de su gradiente (Jung y cols., 1995).

Otra vía de salida del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial es el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP), un canal no selectivo, de alta conductancia y dependiente de voltaje (Ichas y cols., 1997).

### **1.4.6 Heterogeneidad funcional de los depósitos de alto $\text{Ca}^{2+}$ .**

Como hemos descrito a lo largo de esta tesis, en las células no excitables la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se puede generar por la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares tales como el RE, el Go, los lisosomas y las vesículas de secreción (Brailoiu y cols., 2009; Calcraft y cols., 2009; Galione y cols., 2009; Gerasimenko

y cols., 2006a; Missiaen y cols., 2004b; Patel y Docampo, 2010; Pizzo y cols., 2011).

Además de la diversidad de orgánulos que ejercen su función como depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$ , cada uno de estos puede estar dividido heterogéneamente en distintos subcompartimentos. Se ha descrito que en ciertos tipos celulares, como la células HeLa, en el RE coexisten dos subcompartimentos, uno de alta  $[\text{Ca}^{2+}]$  y otro de baja  $[\text{Ca}^{2+}]$  (Montero y cols., 1997). En la misma dirección, en células HSG<sup>35</sup> se ha observado que un subcompartimento del RE, más cercano a la membrana plasmática, es el responsable de la reorganización de STIM1 y que el vaciamiento de este compartimento por si solo es capaz de activar la entrada capacitativa de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula (Ong y cols., 2007).

La heterogeneidad funcional también se ha descrito en plaquetas en base a la existencia de dos bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  con pesos moleculares distintos, diferentes patrones de fosforilación y distinta sensibilidad a inhibidores (Papp y cols., 1992). Estas dos bombas (ATPasas), que también se expresan en linfocitos, son SERCA2b y la SERCA3 (Wuytack y cols., 1994). Los estudios en plaquetas revelan la existencia de dos depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  capaces de acumular  $\text{Ca}^{2+}$  con una sensibilidad diferente a inhibidores: por una parte, en uno de los depósitos la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  fue completamente inhibida con Tg y no se vio afectada por TBH; mientras que la acumulación en el otro depósito es menos sensible a Tg, pero está completamente inhibida por TBH (Cavallini y cols., 1995). Estudios posteriores revelaron que el depósito insensible a TBH corresponde probablemente a orgánulos ácidos, como el lisosoma, que puede ser completamente vaciado con el péptido GPN, con el inhibidor de la bomba vacuolar  $\text{H}^+$ ATPasa bafilomicina o con el ionóforo  $\text{H}^+/\text{K}^+$  nigericina (Juska y cols., 2008). La distinta sensibilidad a Tg y TBH en plaquetas se explica por la expresión heterogénea de distintas isoformas de SERCA en los diferentes subcompartimentos (Lopez y cols., 2005). Sin embargo, otros estudios han descrito que SERCA1, 2 y 3 tienen similar sensibilidad a TBH, con un  $\text{IC}_{50}$  cercano al rango micromolar (Lape y cols., 2008; Wootton y Michelangeli, 2006). La explicación a estas observaciones contradictorias podría deberse a que en los distintos tipos celulares cada isoforma de SERCA se comporta de manera particular.

---

<sup>35</sup> HSG: Human submandibular gland.

## **1. INTRODUCCIÓN.**

---

Algunos autores sugieren que la distribución heterogénea a lo largo de las distintas zonas del Go (*cis*, *medial* y *trans*) de las distintas ATPasas de tipo P (Behne y cols., 2003), permitiría alcanzar distintas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en cada compartimento del Go. Esto solo es una especulación, ya que hasta la fecha solo se han registrado medidas de  $\text{Ca}^{2+}$  en el tGo. La contribución relativa de SERCA y SPCA a la acumulación del  $\text{Ca}^{2+}$  en el Go es aparentemente diferente en diversos tipos de células: por ejemplo, en los queratinocitos el silenciamiento de la SPCA1 provoca una reducción del 67% de la captación de  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que en las células HeLa el efecto de reducir el nivel de la SPCA1 en la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  es mucho menor (Callewaert y cols., 2003; Van Baelen y cols., 2003). Probablemente estos efectos específicos de cada tipo celular reflejan las contribuciones del cGo o el tGo a la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  total del Go.

El pH de los distintos orgánulos de la vía secretora constituye otro factor importante a destacar. En este sentido, se ha propuesto una relación inversa entre el gradiente de pH y el del  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado en los orgánulos a lo largo de la vía secretora (Pizzo y cols., 2011). Así, el RE, de pH neutro (Kim y cols., 1998), alcanzaría altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , cercanas a milimolar, mientras que los orgánulos de pH ácido como las vesículas de secreción tendrían la concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  menores, en el rango de pocas decenas de micromolar. Ente estos dos valores se situaría el Golgi, con un pH de 6,7 (Llopis y cols., 1998), y con valores intermedios de  $\text{Ca}^{2+}$ .

De forma análoga a las ATPasas, los distintos tipos canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , los  $\text{IP}_3\text{R}$  y los RyR también podrían distribuirse de forma heterogénea en las distintas zonas del RE o del Go. En este sentido, se ha descrito que la región del Go enriquecida en la bomba SPCA sería insensible a  $\text{IP}_3$  y contendría exclusivamente receptores de tipo RyR (Lissandron y cols., 2010). Estos resultados sugerirían una relación inversa entre la distribución de receptores  $\text{IP}_3\text{R}$  y bomba SPCAs en el Go (Vanoevelen y cols., 2004).

**2 OBJETIVOS.**

Como se ha descrito en la introducción, varios tipos de orgánulos, entre ellos el retículo endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi (Go), ejercen su función como depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . Puede que estos depósitos no sean homogéneos sino que presenten subdivisiones, tanto espaciales como funcionales, que permitan modular los parámetros espacio-temporales de la señalización por  $\text{Ca}^{2+}$ , añadiendo así importantes matices al proceso de señalización. Como objetivo general, nos hemos propuesto en esta Tesis estudiar la heterogeneidad de los depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE y el Go en dos tipos celulares que se usan con frecuencia como modelos celulares en el laboratorio, las células HeLa y las HEK293. Para llevar a cabo este proyecto hemos fijado los siguientes objetivos específicos.

- 1) Monitorizar la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelular inducida por agonistas fisiológicos en las células HeLa y HEK293, siguiendo tanto los cambios de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol como en el interior de los orgánulos intracelulares, particularmente RE y Go, y utilizando para ello sondas proteicas dirigidas específicamente a los orgánulos intracelulares (GECIs).
- 2) Disponemos de una sonda adecuada para las medidas de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE, pero la sonda de medida para Go y sus subcompartimentos *cis*- y *trans*- se desarrollarán en este proyecto y se caracterizará y determinará su funcionalidad en las condiciones en las que interesa hacer las medidas en los orgánulos intracelulares.
- 3) Utilizando las sondas específicas del RE estudiaremos su homogeneidad física y funcional con respecto a los mecanismos de captación y liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  y la acción de agonistas fisiológicos. Se estudiará particularmente la participación de la isoforma 3 de la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE (SERCA3).
- 4) Utilizando las sondas específicas del Go estudiaremos su homogeneidad física y funcional con respecto a los mecanismos de captación y liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  y la acción de agonistas fisiológicos. Se estudiará particularmente la participación de la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  - de la vía secretora (SPCA1).

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **3 MATERIALES Y MÉTODOS.**

#### **3.1 Cultivos celulares.**

##### **3.1.1 Células HEK293<sup>36</sup>.**

Esta línea celular (ATCC: CRL-1573) proviene de riñón fetal humano, su morfología es de tipo epitelial, crece de forma adherente y posee 64 cromosomas. Su tasa de duplicación celular es inferior a 24 horas.

Estas células se mantuvieron en cultivo en un medio DMEM<sup>37</sup>, suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) (Cambrex, DE-14-801F), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (LONZA, DE 17-602E). Las células HEK293T, que expresan el antígeno T del SV40, son resistentes a neomicina y se mantuvieron en cultivo en presencia de G-418 100 µg/ml. Esta línea celular se utilizó para las medidas del Ca<sup>2+</sup> citosólico con fura-2.

La línea HEK293-erGA, generada en nuestro laboratorio, deriva de la línea HEK293 y expresa de forma estable el gen de fusión Igy2b-EGFP-Aeq<sup>D119A</sup> (erGA). Estas células se cultivaron en presencia de G-418 200 µg/ml y se utilizaron para las determinaciones de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>RE</sub>.

##### **3.1.2 Células HeLa (Henrieta Lacks).**

Esta línea tumoral humana (ATCC: CCL-2), derivada de un adenocarcinoma del cuello de útero, tiene morfología epitelial y crece de forma adherente. Su tasa de duplicación es inferior a 24 horas. Estas células se mantuvieron en cultivo en un medio DMEM suplementado con un 10 % de SFB, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. En el laboratorio hemos generado tres líneas estables derivadas de HeLa: la primera expresa la construcción Igy2b-EGFP-Aeq<sup>D119A</sup> (erGA) y se utilizó para las determinaciones de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>RE</sub>; y las dos siguientes expresan los genes quiméricos GT-EGFP-Aeq<sup>D119A</sup> (tgoGA) y AGT-EGFP-

---

<sup>36</sup> HEK293: Human Embryonic Kidney.

<sup>37</sup> DMEM: Dulbecos Eagles Essential Medium.

Aeq<sup>D119A</sup> (cgoGA) para medir en los dos compartimentos *cis* y el *trans* del aparato de Golgi, respectivamente. Todas ellas se mantuvieron en G-418 200 µg/ml.

## 3.2 Plásmidos.

### 3.2.1 Mantenimiento y propagación de plásmidos.

Los vectores plasmídicos se transformaron en las siguientes cepas de E.Coli: XL2-Blue (Stratagen, Cat.Nº. 200130), XL10Gold (Stratagen, Cat.Nº. 200315) y DH5α (Invitrogen, Cat.Nº.18265-017), según el protocolo descrito en detalle en el manual de laboratorio *Molecular Cloning* (Sambrook, 2001). Se seleccionó una única colonia que se propagó en un medio líquido de Luria-Broth (LB) selectivo con 100 µg/ml de ampicilina, o bien 100 µg/ml canamicina, según la naturaleza del plásmido, a 37 °C y agitación a 250 r.p.m. La purificación del plásmido transformado se realizó según las especificaciones del kit comercial, JetStar™ Plasmid Purifications Kits (Nº Cat. 220020).

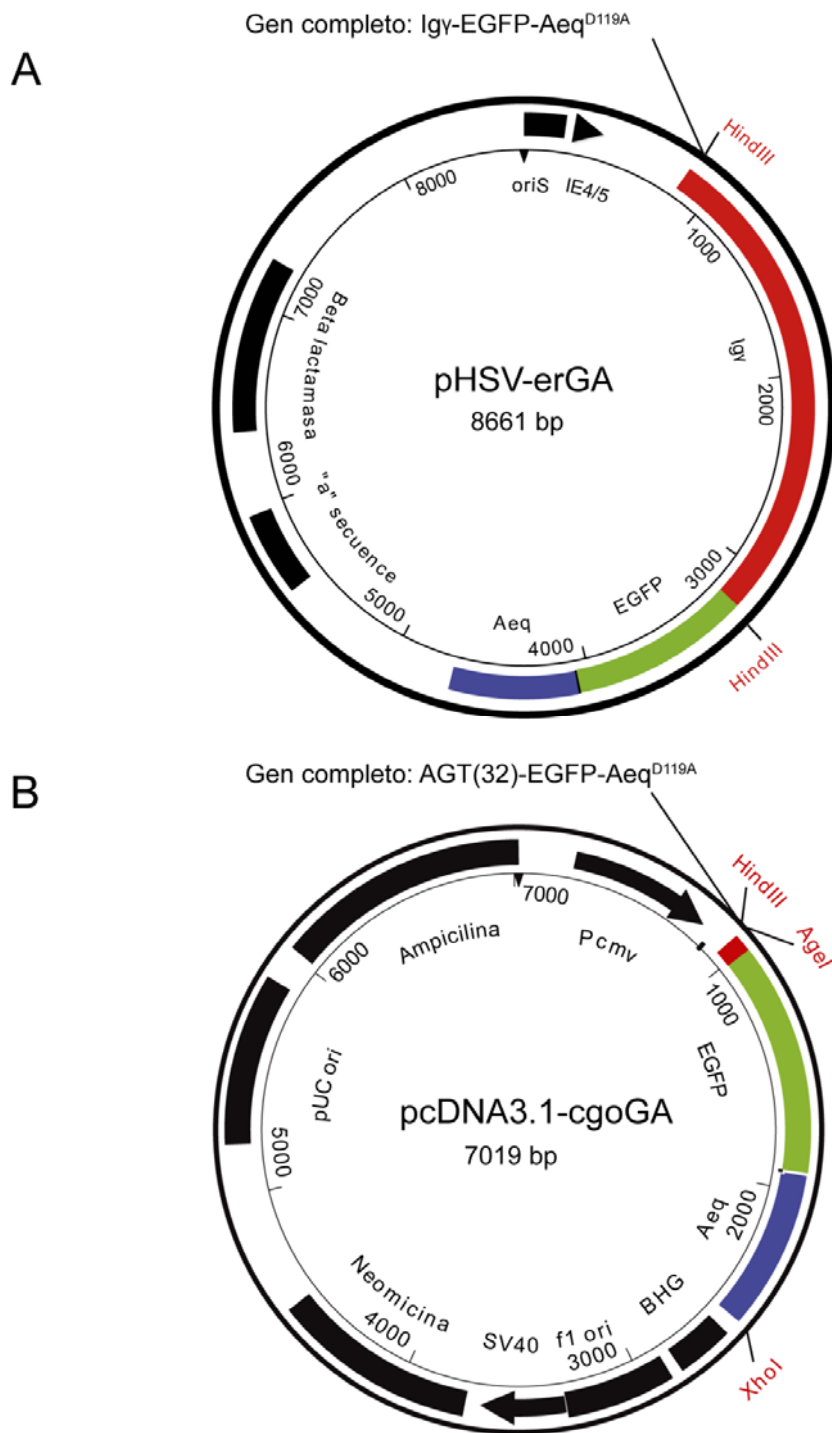
### 3.2.2 Vectores de expresión y clonación.

#### 3.2.2.1 Plásmidos derivados del vector pcDNA3.

El plásmido de expresión pcDNA3, de 5,4 Kb, posee el promotor IE del citomegalovirus humano (CMV) y está diseñado para obtener un elevado nivel de expresión en células eucariotas. Posee dos genes de resistencia a antibióticos: uno a ampicilina, para la selección de bacterias, y otro a neomicina para la selección de células eucarióticas. En este trabajo se utilizaron dos vectores derivados de este plásmido: uno que contiene la secuencia completa del gen humano de SERCA3d, el pcDNA3.1-SERCA3d, cedido por la Dra. Enouf (INSERM. Paris) (Bobe y cols., 2004); y el vector pcDNA3-C2(1-32)-EGFP, cedido por el Dr. El-Battari (INSERM, Marsella) (Zerfaoui y cols., 2002), que contiene la secuencia de direccionalidad al cGo correspondientes a 96 bp (32 aminoácidos) del gen de la β-1,6-N-acetilglucosamintransferasa y se fusionó con EGFP-Aeq<sup>D119A</sup>, como se describe a continuación.



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS.



**Figura M1. Vectores de expresión de las proteínas de fusión bioluminiscente erGA y cgoGA.**

En (A) el plásmido pHSV-erGA en el cual se aprecian sus principales elementos: el gen de la proteína de fusión erGA (IgY-EGFP-Aeq<sup>D119A</sup>, en rojo, verde y azul), el origen (oriS), el gen de la beta lactamasa, la secuencia "a" y el promotor (IE4/5). En (B) el plásmido pcDNA3.1-cgoGA y también se aprecian sus principales elementos: el gen de la proteína de fusión cgoGA (AGT(32)-EGFP-Aeq<sup>D119A</sup>, en rojo, verde y azul), el origen (f1 ori y pUC ori), los genes de resistencia a ampicilina y neomicina y el promotor (Pcmv).

El clonaje de pcDNA3.1-cgoGA (**Fig. M1B**) se inició con la purificación de la secuencia EGFP-Aeq<sup>D119A</sup> por PCR a partir del plásmido pHSV-erGA (**Fig. M1A**), con la combinación de los cebadores siguientes: sentido-5'-ATaccggtCGCAAGGGCGAGGAGCTG-3', que incluye la secuencia de *AgeI*, y antisentido-5'-CCgaattcTTAGGGGACAGCTCCACCG-3', que incluye la secuencia del enzima *EcoRI*. El inserto EGFP-Aeq<sup>D119A</sup> ya purificado fue digerido con *AgeI*. El vector pcDNA3.1-C2(1-32)-EGFP, que contiene la secuencia de direccionalidad a cGo, fue digerido con *XhoI* y rellenado con *Klenow*. A continuación se digirió con *AgeI* para eliminar la EGFP. El vector purificado se ligó con el inserto para dar el vector pcDNA3.1-cgoGA.

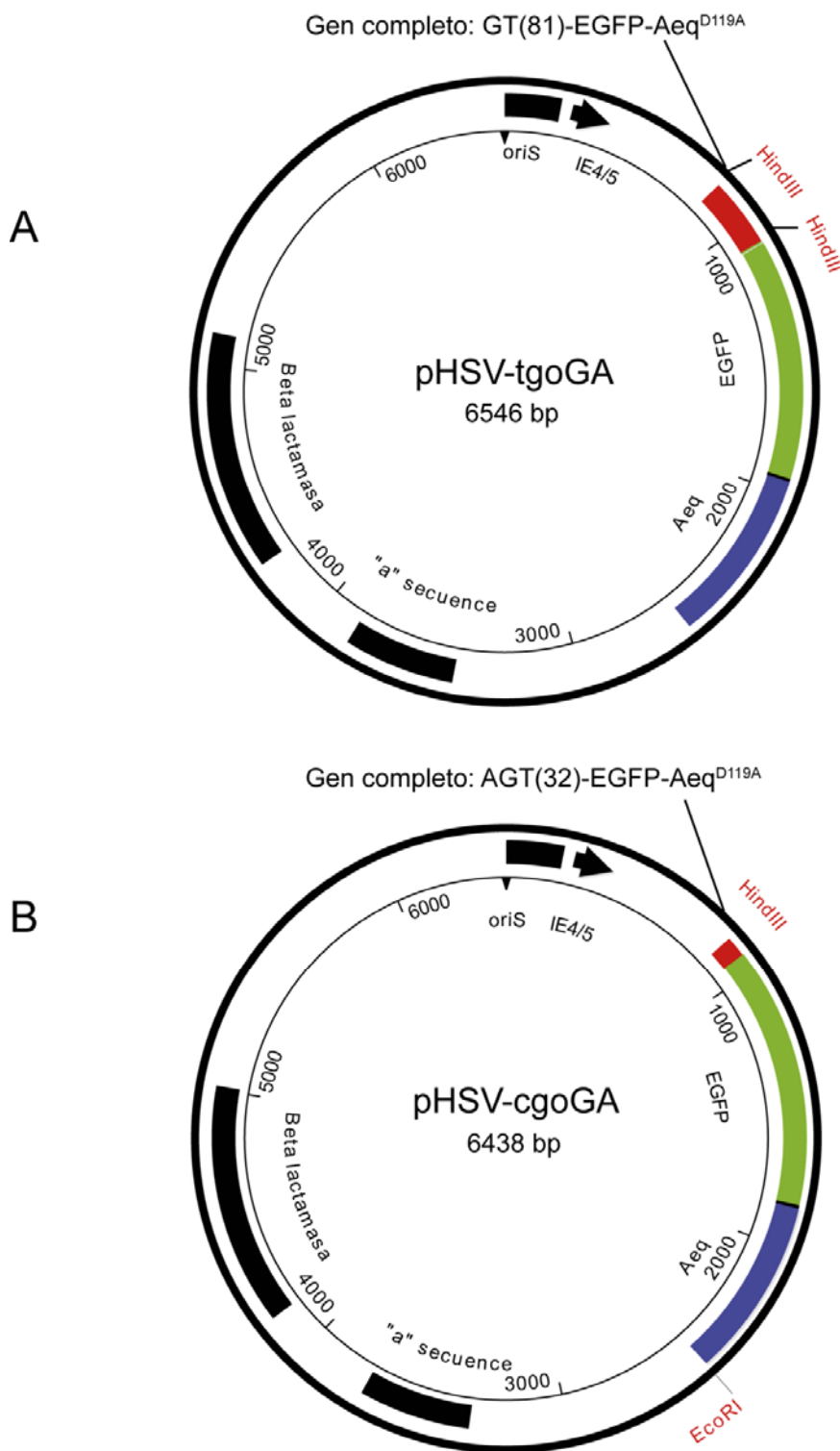
#### 3.2.2.2 Plásmidos derivados del vector pHSVpUC.

El vector pHSVpUC es un plásmido híbrido de 4,8 Kb que contiene tanto secuencias de procariontas como secuencias del Virus Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1). Entre las primeras se encuentran el origen de replicación bacteriano (*ori*) y el gen que le confiere resistencia a ampicilina. Como secuencias víricas se encuentran: el origen de replicación del virus herpes simplex (HSVoriS), el promotor del gen IE (*Immediate Early*) 4/5 del virus y la secuencia "a" del HSV-1, esencial para el empaquetamiento en partículas víricas infectivas en células permisivas. Este vector vacío se utilizó como control de transfección y para la clonación de los genes que describiremos a continuación.

El vector pHSV-erGA (**Fig. M1A**), que contiene el gen Igy2b-EGFP-Aeq<sup>D119A</sup> (erGA), fue clonado anteriormente en nuestro laboratorio (Alonso y cols., 1998). La secuencia de retención en el RE corresponde a 2,8 Kb del gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina- $\gamma$ -2b (Igy2b).

El vector pHSV-tgoGA (**Fig M2A**), que contiene el gen GT(81)-EGFP-Aeq<sup>D119A</sup> (tgoGA) dirigido al tGo, se clonó específicamente para este trabajo. La secuencia de direccionalidad al tGo corresponde a 243 pb (81 aminoácidos) del gen de la  $\beta$ -1,4 N-galactosiltransferasa (GT). Esta secuencia fue amplificada por PCR a partir del plásmido parental GT(81)-EYFP (Llopis y cols., 1998) con la siguiente combinación de cebadores: sentido-5'-CCCaagcttGCCACCATGAGGCTTC-3' y antisentido-5'-TAAagcttGGCCCCCTCCGGTCCG-3', ambos incluyen la secuencia *HindIII*. La PCR se realizó con la enzima polimerasa *Taq*, que añade una adenina a cada extremo del fragmento que permite la subclonación del mismo en el vector de clonación pGEM-T-Easy, paso intermedio que facilita la obtención de

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS.



**Figura M2. Vectores de expresión de las proteínas de fusión bioluminiscente tgoGA y cgoGA.**

En (A) el plásmido pHSV-tgoGA que contiene el gen de la proteína de fusión tgoGA (GT(81)-EGFP-Aeq<sup>D119A</sup>, en rojo, verde y azul). En (B) el plásmido pHSV-cgoGA que contiene el gen de la proteína de fusión cgoGA (AGT-EGFP-Aeq<sup>D119A</sup>, en rojo, verde y azul).

cantidades suficientes de DNA cuando se desea clonar fragmentos pequeños. Posteriormente, el fragmento se digirió con *HindIII* y se ligó con el vector receptor pHSV-erGA, también previamente digerido con *HindIII* para eliminar la secuencia de direccionalidad a RE (Igy2b). El plásmido resultante es el pHSV-tgoGA (**Fig. 2A**).

El vector pHSV-cgoGA (**Fig. M2B**), que contiene el gen AGT(32)-EGFP-Aeq<sup>D119A</sup> (cgoGA) dirigido al cGo, se generó a partir del pcDNA3-cgoGA (**Fig. M1B**). Se aisló la secuencia completa de AGT(32)-GFP-Aeq, mediante la digestión con *EcoRI* y *HindIII*, y se clonó en el vector pHSV-erGA, también previamente digerido con *EcoRI* y *HindIII*.

El vector pHSV-tgoGAP1 (**Fig. M3**) contiene el gen GAP1 dirigido al tGo usando la misma secuencia de direccionalidad que el gen tgoGA. El gen GAP1 se ha desarrollado recientemente en nuestro laboratorio (datos en proceso de publicación (Rodríguez-García, 2013)) y permite medir el Ca<sup>2+</sup> siguiendo los cambios de fluorescencia, en lugar de biolumiscencia como el gen GA descrito hasta el momento. Se purificó la secuencia de direccionalidad al tGo a partir del vector pHSV-tgoGA mediante digestión con *HindIII*. En paralelo, se aisló el vector a partir del pHSV-erGAP1, clonado anteriormente, escindiendo la secuencia de direccionalidad al RE (Igy) mediante digestión con *HindIII* y sustituyéndola, mediante ligación, por el fragmento *HindIII*-GT(81)-*HindIII*- previamente purificado.

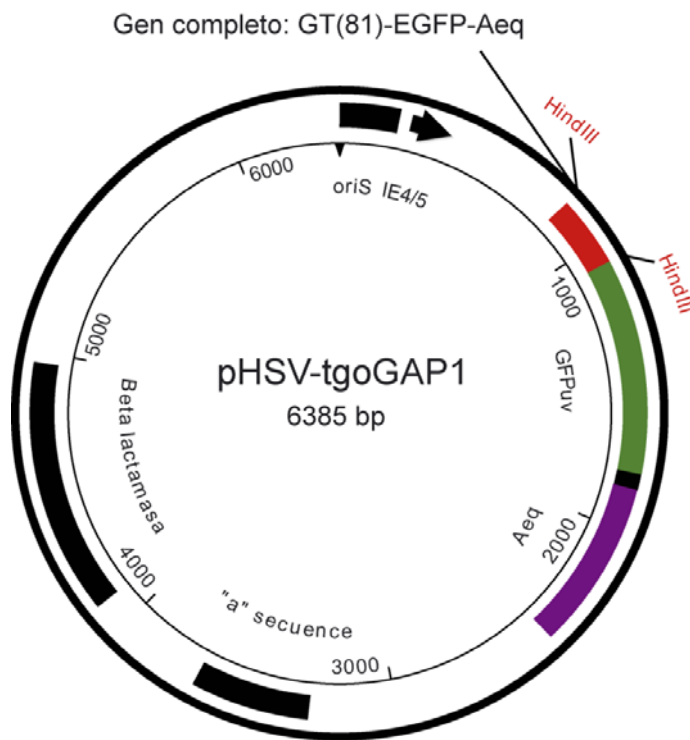
El vector pHSV-erTomato contiene el gen Igy2b-Tomato-Aeq<sup>D119A</sup> y es una variante de aequorina con direccionalidad al RE que en vez de tener fusionada la proteína fluorescente GFP tiene la *Tomato* (un tipo de proteína fluorescente roja). Este plásmido ya había sido clonado anteriormente en nuestro laboratorio (Manjarres y cols., 2008) y se utilizó en esta Tesis únicamente para los ensayos de colocalización.

#### 3.2.2.3 Plásmido PMT2hSPCA1.

El vector PMT2 es un plásmido de 4,9 Kb que contiene el promotor SV40. Además, posee resistencia a ampicilina y es comúnmente utilizado para la expresión génica en mamíferos. En este trabajo se ha utilizado el plásmido PMT2hSPCA1 que posee la secuencia completa del gen hSPCA1, cedido por el Dr. Wuytack (Universidad de Lovaina, Bélgica).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

---



**Figura M3. Vector de expresión de la proteína de fusión fluorescente tgoGAP1.**

En la figura se representa el plásmido pHSV-tgoGAP1 que contiene el gen de la proteína de fusión tgoGA (GT(81)-GFP-Aeq, en rojo, verde y violeta).

### 3.3 Transfecciones celulares.

#### 3.3.1 Generación de las líneas de HeLa estables.

En este trabajo se obtuvieron 3 líneas celulares derivadas de HeLa que expresan de forma estable los siguientes vectores: pHSV-tgoGA (**Fig. M2A**), pHSV-cgoGA (**Fig. M2B**) y pcDNA3.1-tgoGAP1 (**Fig. M3**). Los dos primeros se realizaron transfectando pHSV-tgoGA o pHSV-cgoGA en conjunto con el pcDNA3.1 vacío, que confiere el gen de resistencia a la neomicina.

La obtención de las líneas estables se inició con la siembra de  $10^6$  células HeLa en placas de 100 mm. Al día siguiente se cambió el medio de cultivo por 1,5 ml de medio OPTI-MEM (Gibco, 51985) y se procedió a la transfección como se describe a continuación:

(1) Línea estable HeLa-tgoGA: en un tubo eppendorf se mezclaron 1  $\mu\text{g}$  de pHSV-tgoGA, 1  $\mu\text{g}$  de pcDNA3.1 y 500  $\mu\text{l}$  de OPTI-MEM. En otro tubo se mezclaron 3  $\mu\text{l}$  de lipofectamina 2000 (Invitrogen, 11668-019) y 500  $\mu\text{l}$  de OPTI-MEM.

(2) Línea estable HeLa-cgoGA: en un tubo eppendorf se mezclaron 2  $\mu\text{g}$  de pHSV-cgoGA, 1  $\mu\text{g}$  de pcDNA3.1 y 500  $\mu\text{l}$  de OPTI-MEM. En otro tubo se mezclaron 6  $\mu\text{l}$  de lipofectamina 2000 y 500  $\mu\text{l}$  de OPTI-MEM.

(3) Línea estable HeLa-tgoGAP1: en un tubo eppendorf se mezclaron 1  $\mu\text{g}$  de pHSV-tgoGAP1 y 500  $\mu\text{l}$  de OPTI-MEM. En otro tubo se mezclaron 3  $\mu\text{l}$  de lipofectamina 2000 y 500  $\mu\text{l}$  de OPTI-MEM.

En los tres casos, y tras 5 minutos de incubación, se mezcló el contenido de los dos tubos y se añadió a las células. Al día siguiente las células se tripsinizaron, se centrifugaron a 300 r.c.f, durante 5 minutos, y se resuspendieron en 1 ml de medio DMEM sin suero. Las células se traspasaron a un tubo de citometría de flujo y se dejaron en hielo. Posteriormente, se sometieron al citómetro de flujo FACSAria configurado con la línea de láser a 488 nm para la selección de células que expresan la EGFP (tgoGA y cgoGA) y con la línea de laser a 407 nm para la selección de células que expresan la GFP (tgoGAP1). Tras pasar las muestras por el separador de células (*Sorter*), las fracciones EGFP o GFP<sub>UV</sub> positivas se sembraron en placas de 100 mm que contenían un medio completo suplementado con 800 mg/ml de G-418, con el objetivo de seleccionar las células que habían integrado establemente en su genoma los distintos plásmidos. Tras 10 a 15 días se seleccionaron los clones resistentes al tratamiento con G-418, mediante una punta de micropipeta cargada con una solución de tripsina. Las células así recogidas se sembraron en placas de 24 pocillos con medio completo y suplementado con 100 mg/ml de G-418. Tras observar la evolución de los clones, se seleccionaron aquellos que cumplían dos criterios: una correcta localización de la EGFP o GFP<sub>UV</sub> en el aparato de Golgi y una morfología celular no apoptótica. Estos clones se tripsinizaron y se traspasaron a una placa de 100 mm con medio completo suplementado con 100  $\mu\text{g}$  de G-418. Posteriormente, y con el fin de enriquecer las poblaciones de células EGFP y GFP positivas, los clones se sometieron a un segundo ciclo de citometría de flujo y de separación de células positivas, hasta obtener poblaciones 100 % de tgoGA, de cgoGA y de tgoGAP1. Los clones se mantuvieron en una atmósfera con un 5 % CO<sub>2</sub> y a 37°C. Cada 2-3 días se tripsinizaron con una solución de 0,25 % de tripsina-EDTA y se resembraron 10<sup>4</sup> células en una placa de 100 mm, con 10 ml de medio fresco de cultivo suplementado con 100  $\mu\text{g}$  de G-418.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

#### 3.3.2 Transfección celular para medidas de $\text{Ca}^{2+}$ por bioluminiscencia.

La preparación del ensayo comienza con la siembra de células sobre un cubreobjeto de 12 mm de diámetro previamente tratado con poli-L-lisina (Sigma, P-1274) (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) en una placa de 4 pocillos (NUNC). En experimentos piloto previos se optimizaron la densidad celular y la cantidad de DNA o de siRNA añadidos, según el tipo celular y los días *in vitro* antes de realizar las medidas de  $\text{Ca}^{2+}$ , como detalla la **Tabla 4**.

Tabla 4. Protocolos de transfección en los distintos tipos celulares.

Tipo celular	Nº de células	Tipo plásmido	Cantidad	Horas en cultivo tras la transfección
HeLa	$5 \cdot 10^4$	pHSV-erGA	0,2-0,5 $\mu\text{g}$	24-48
	$5 \cdot 10^4$	pHSV-erTomato	0,2-0,5 $\mu\text{g}$	24-48
	$5 \cdot 10^4$	pHSV-tgoGA	0,05-0,1 $\mu\text{g}$	24-48
	$5 \cdot 10^4$	pHSV-cgoGA	0,1-0,2 $\mu\text{g}$	24-48
	$5 \cdot 10^4$	pcDNA3.1-tgoGAP1	0,1-0,5 $\mu\text{g}$	24-48
HeLa	$7 \cdot 10^4$	<b>Co-transfección (3:1)</b> pHSV-erGA + pcDNA3.1-SERCA3d	0,1-0,3 $\mu\text{g}$	24-48
	$7 \cdot 10^4$		0,3-0,9 $\mu\text{g}$	24-48
HeLa-erGA HeLa-tgoGA HeLa-cgoGA	$2.5 \cdot 10^4$	<b>siRNA:</b> hSPCA1/Scramble	30-300 nM	48-72
HeLa-erGA HeLa-tgoGA HeLa-cgoGA	$5 \cdot 10^4$	pMT2-hSPCA1	0,2-0,4 $\mu\text{g}$	24-48
	$2 \cdot 10^4$	<b>siRNA:</b> hSPCA	30-300 nM	48-72
HEK293-erGA	$7 \cdot 10^4$	pcDNA3-SERCA3d	0,3-0,9 $\mu\text{g}$	24-48

La transfección consistió en la preparación de 2 tubos eppendorf, con las siguientes mezclas por cada pocillo a transfectar. En el primer tubo se añadió la cantidad indicada en la **Tabla 4** de DNA o siRNA y 50  $\mu\text{l}$  de OPTI-MEM. En el segundo tubo se agregaron 50  $\mu\text{l}$  de OPTI-MEM y 3  $\mu\text{l}$  de lipofectamine 2000 por cada  $\mu\text{g}$  de DNA del tubo 1 o 1  $\mu\text{l}$  de lipofectamine 2000 por cada pocillo transfectado con siRNA. Los tubos 1 y 2 se incubaron durante 5 minutos antes de mezclarse; a continuación, la mezcla se añadió a las células que permanecieron durante 5-6 horas en las transfecciones de DNA y 24 horas en las transfecciones de siRNA. Posteriormente, la mezcla se lavó sustituyéndose con el medio de cultivo completo previamente descrito.

#### 3.4 Medida de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ y la $[Ca^{2+}]_{GO}$ en poblaciones celulares por bioluminiscencia.

La mayor parte de las medidas de  $[Ca^{2+}]_{RE}$ ,  $[Ca^{2+}]_{tGO}$  y  $[Ca^{2+}]_{cGO}$  se realizaron en las líneas celulares estables o excepcionalmente en células transfectadas de modo transitorio, en cada caso como se indicó en la **Tabla 4**. Antes de realizar las medidas la apoaequorina debe reconstituirse con su cofactor, celenterazina nativa o n, según el tipo de experimento (Shimomura y cols., 1974; Shimomura y cols., 1993). Las medidas de bioluminiscencia en los depósitos de alto contenido en  $Ca^{2+}$  requieren el vaciamiento de estos antes de la reconstitución de la aequerina, según los protocolos siguientes. 1) Para las medidas de  $[Ca^{2+}]_{RE}$ , las células se incubaron durante 10 minutos en un medio con EGTA 0,5 mM y con inhibidores de ATPasas, bien TBH 10  $\mu$ M o Tg 0,05-1  $\mu$ M (Alvarez y Montero, 2002; Chamero y cols., 2008; Villalobos y cols., 2002). 2) Para las medidas de  $[Ca^{2+}]_{GO}$ , las células se incubaron en un medio con EGTA 0,5 mM y con los inhibidores de ATPasas, TBH 10  $\mu$ M o Tg 0,05-1  $\mu$ M; además, para asegurar el completo vaciamiento de los depósitos insensibles a los inhibidores de ATPasa se añadió ionomicina 200 nM. Posteriormente, la ionomicina se lavó con una solución libre de  $Ca^{2+}$  y con BSA al 1 %. A continuación, se añadió celenteracina n o nativa, para reconstituir la apo-aequerina, según se indique, en el medio anteriormente descrito durante 1-2 horas, a temperatura ambiente y en oscuridad. Las medidas de bioluminiscencia se realizaron con un sistema de perfusión que permite el intercambio rápido de soluciones con un flujo constante de 5-6 ml/min. Todos los experimentos se realizaron a temperaturas entre 22- 25 °C.

Utilizamos dos modelos celulares, células intactas o permeabilizadas con digitonina. En el primero, las células se perfundieron inicialmente con un medio externo estándar compuesto de (en mM): NaCl, 145; KCl, 5;  $MgCl_2$ , 1; EGTA, 0,5; glucosa, 10; HEPES-Na, 10; pH = 7,4. De este modo se lavó la celenterazina y los inhibidores de la ATPasas y, a continuación, se perfundió un medio con la misma composición pero reemplazando EGTA 0,5 mM por  $CaCl_2$  1 mM. Esta solución permite el rellenado de los depósitos intracelulares. En los experimentos con células permeabilizadas la perfusión se realizó con un tampón cuya composición remeda a la intracelular (medio interno estándar), que tiene la siguiente composición (en mM): KCl, 140;  $KH_2PO_4$ , 1; succinato disódico, 2; piruvato sódico, 2;  $MgCl_2$ , 1; Mg-ATP, 1; HEPES-Na, 20; pH = 7,0. La  $[Ca^{2+}]$  final se consiguió mezclando los tampones valorados que contienen EGTA 0,2 M y EGTA- $Ca^{2+}$  0,2 M, ambos a pH = 7,0 según los datos calculados por el programa



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

MaxChelator (Bers y cols., 1994) y cuyas concentraciones finales en el medio interno se indican en la **Tabla 5**.

**Tabla 5. Concentraciones relativas de EGTA y de EGTA-Ca (en mM) necesarias para obtener distintas concentraciones de calcio iónico ( $\text{Ca}^{2+}$  en nM).** Cálculos realizados para pH = 7,0; fuerza iónica = 0.15; temperatura, 25 °C.

$[\text{Ca}^{2+}]$ (nM)	0	20	50	100	200	300	500	1000
$[\text{EGTA}]_{\text{FINAL}}$ (mM)	2	1,91	1,78	1,6	1,34	1,13	0,9	0,58
$[\text{EGTA-Ca}]_{\text{FINAL}}$ (mM)	0	0,09	0,22	0,4	0,66	0,87	1,1	1,42

La monitorización de la bioluminiscencia se realizó en un luminómetro construido a tal efecto por Cairn Research Ltd. Éste, consta principalmente, de un fotomultiplicador, justo debajo de la placa de 4 pocillos, de 15 mm de diámetro donde se realizan las perfusiones. Los fotones se capturan integrando las lecturas cada segundo y se transforman en cuentas por segundo utilizando el programa AquisitionEngine (Cairn Research Ltd.), que se tratan después oportunamente.

Al final de cada experimento las células se lisaron durante unos 2 a 5 minutos con una solución que contenía 0,1 mM digitonina y  $\text{CaCl}_2$  en exceso (10 mM) con el fin de consumir toda la aequorina que quedaba hasta ese momento. Esto permite obtener el valor de luminiscencia total.

La conversión de los valores de  $L / L_{\text{TOTAL}}$  a valores de  $[\text{Ca}^{2+}]$  se deriva del siguiente algoritmo (Brini y cols., 1995):

$$[\text{Ca}^{2+}] \text{ (M)} = [(L / L_{\text{Total}} \cdot \lambda)^{1/n} + (L / L_{\text{Total}} \cdot (K_{\text{TR}}^{-1}))] / [K_{\text{R}} - (L / L_{\text{Total}} \cdot \lambda)^{1/n} \cdot K_{\text{R}}].$$

$K_{\text{R}}$ : es la constante de asociación de  $\text{Ca}^{2+}$ .

$K_{\text{TR}}$ : es la proporción de sitios en estado T frente a los sitios en estado R de las manos EF de la aequorina.

n: es el numero de sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ .

$\lambda$ : es la velocidad de consumo de la aequorina.

L: Luminiscencia en el tiempo.

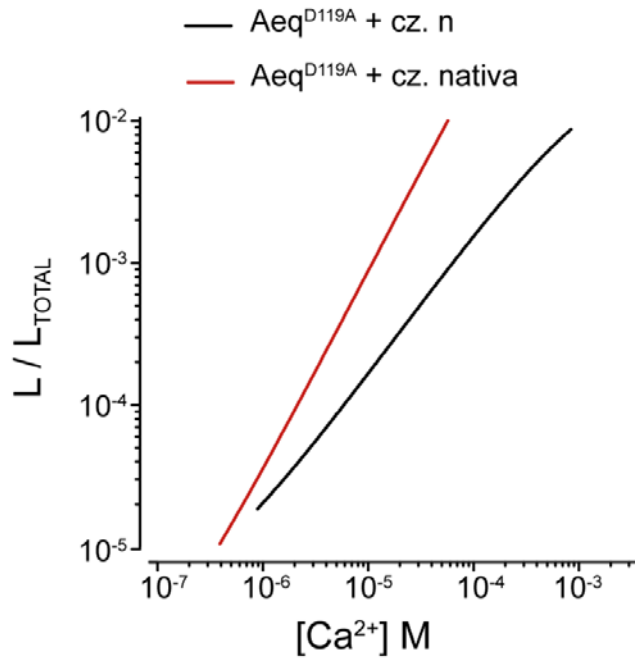
$L_{\text{TOTAL}}$ : Luminiscencia total.

Los valores de cada constante utilizados para cada combinación de aequorina-celenterazina (cz) utilizados en esta Tesis se muestran en la **Tabla 6**. Las curvas de calibración para ambas aequorinas ( $\text{Aeq}^{\text{D119A}} + \text{cz}$ . n a 22 °C y  $\text{Aeq}^{\text{D119A}} + \text{cz}$ .

nativa a 22 °C) derivadas del algoritmo anterior y las constantes de la **Tabla 6** se muestran en la **figura. M4**.

**Tabla 6.** Valores de las constantes utilizadas en los cálculos de  $[Ca^{2+}]$  a partir de las medidas de aequorina.

Tipo de Aequorina	$K_R$	$K_{TR}$	n	$\lambda$
<b>Aeq<sup>D119A</sup> + cz. n a 22 °C</b>	$5 \cdot 10^7$	$159,7 \cdot 10^3$	1,271	0,025
<b>Aeq<sup>D119A</sup> + cz. nativa a 22 °C</b>	$1,61 \cdot 10^7$	$2,2 \cdot 10^3$	1,43	1



**Figura M4. Calibración de la aequorina.**

En la figura se representa la calibración de los valores de  $L / L_{TOTAL}$  con respecto a distintas  $[Ca^{2+}]$ , en M. Se muestran dos combinaciones de aequorina + celenterazina (cz.): 1) Aeq<sup>D119A</sup> + cz n (trazo en negro) y 2) Aeq<sup>D119A</sup> + cz. nativa (trazo en rojo). La calibración se realizó a 22°C, en ambos casos.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS.**

---

#### **3.5 Medida de $[Ca^{2+}]_i$ en célula única con tgoGAP1.**

Se ha desarrollado en nuestro laboratorio un nuevo sensor fluorescente de  $Ca^{2+}$ , que está en fase de caracterización. Lo llamamos GAP por *GFP Aequorin Protein*, ya que deriva de la fusión de estas dos proteínas y ha sido modificado por mutagénesis dirigida en varios de sus residuos aminoacídicos para mejorar sus características. La variante utilizada aquí es el GAP1. Esta sonda exhibe unas características muy ventajosas al compararla con otras: es ratiométrica (de doble excitación; 405 y 470 nm; emisión en color verde con pico a 520 nm), tiene un rango dinámico muy amplio, una buena relación señal-ruido, buen brillo, es insensible a cambios de pH en el rango 6,5-8,5 e insensible a  $Mg^{2+}$ . Los detalles se publicarán próximamente (Rodríguez-García, 2013)

El ensayo comenzó con la siembra de  $5 \cdot 7 \cdot 10^4$  células HeLa-tgoGAP sobre un cubreobjeto de 12 mm de diámetro previamente tratado con poli-L-lisina (10  $\mu$ g/ml). Al día siguiente, se montó el cubreobjeto en la cámara de perfusión y las células se perfundieron durante 2-3 minutos con un medio externo estándar y a una velocidad de 5-6 ml/min, antes de comenzar a aplicar los estímulos.

Los registros se realizaron a 22 °C en un equipo de imagen montado en un microscopio directo de fluorescencia (Zeiss Upright Axioplan 2 Imaging), con un objetivo 63 X de inmersión en agua y apertura numérica 1,0 (PlanAchromat Ph3), acoplado a una rueda de filtros de excitación (470DF35 Omega Optic y COMAR T-gqd 405il25) y una cámara digital de alta sensibilidad (Carl Zeiss AxioCam "MRm" 12 bit). La excitación se realizó alternativamente a 405 y 470 nm y la emisión se recogió a 520 nm mediante el programa de adquisición Axiovision (Zeiss). El tratamiento de imagen se hizo utilizando el software *ImagenJ*.

#### **3.6 Medida de la $[Ca^{2+}]_c$ con fura-2.**

El ensayo comenzó con la siembra de  $5 \cdot 7 \cdot 10^4$  células sobre un cubreobjeto de 12 mm de diámetro previamente tratado con poli-L-lisina (10  $\mu$ g/ml), en una placa de 4 pocillos. Al día siguiente, las células se incubaron con la sonda fluorescente de  $Ca^{2+}$  fura-2 AM (4 $\mu$ M) en un medio externo estándar (NaCl, 145 mM; KCl, 5 mM;  $MgCl_2$ , 1 mM;  $CaCl_2$ , 1 mM; glucosa, 10 mM; HEPES-Na, 10 mM; pH = 7,4) (Villalobos y cols., 1996) durante 40 minutos a temperatura ambiente y con agitación suave. A continuación, se montó el portaobjeto en la cámara de perfusión y el exceso del indicador no internalizado en las células se lavó durante

2-3 minutos con el mismo medio externo con el sistema de perfusión ajustado a 3-4 ml/min.

Los registros se realizaron a 22 °C con un equipo de imagen montado en un microscopio invertido de fluorescencia (Nikon Diaphot), un objetivo 20 X de apertura numérica 0,7 (DPlanApo 20UV, OLYMPUS), acoplado a una rueda de 6 filtros de excitación y una cámara digital de alta sensibilidad (Hamamatsu, C4742-98). La excitación se realizó alternativamente a 340 y 380 nm y la emisión se recogió a 520 nm mediante el programa de adquisición Simple PCI 6.6 (Hamamatsu). Cada imagen se integró típicamente cada 5 segundos, después se promediaron las imágenes de manera independiente y se restó el ruido de fondo obtenido a partir de imágenes de las células sin cargar con la sonda. El tratamiento de imagen se hizo con el software *ImageJ*.

La  $[Ca^{2+}]_c$  se estimó a partir del cociente entre los valores de fluorescencia individuales (F340 / F380) y se calibró con estándares de fura-2 ácido. Los valores de  $[Ca^{2+}]$  se calcularon según la siguiente ecuación (Grynkiewicz y cols., 1985).

$$[Ca^{2+}] = K_d \times \beta (R_{max} - R) / (R - R_{min})$$

Donde R es el cociente de las fluorescencias obtenidas al excitar a 340 y 380 nm para una determinada  $[Ca^{2+}]$ ,  $R_{m\acute{a}x}$  representa el cociente de ambas fluorescencias cuando el colorante está saturado de  $Ca^{2+}$ ,  $R_{m\acute{i}n}$  representa el mismo cociente en ausencia total de  $Ca^{2+}$  y  $\beta$  representa el cociente de  $F_{m\acute{a}x} / F_{m\acute{i}n}$  a 380 nm. La  $K_d$  del fura-2 es de 224 nM a 37 °C y 135 nM a 22 °C (Grynkiewicz y cols., 1985). En nuestro sistema, los valores de  $R_{max}$ ,  $R_{min}$  y  $\beta$  fueron, respectivamente, 0,689; 0,067 y 5,5 para el objetivo 20 X y 1,48; 0,14 y 4,96 para el objetivo 40 X de inmersión.

#### 3.7 Técnicas de inmunodetección.

En el desarrollo de esta Tesis se utilizaron una serie de anticuerpos en distintas técnicas de inmunodetección: inmunofluorescencia (IF), *Western blot* (WB) y ensayo enzimático (EE). El listado de anticuerpos y su uso se detallan en la **Tablas 7 y 8:**

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

---

Tabla 7. Usos de anticuerpos primarios.

Anticuerpo primario	Marcaje	Especie	Fuente	Técnica	Dilución
<b>GM-130</b>	cGo	Ratón	BD (610822)	IF	1:100
<b>TGN46</b>	tGo	Oveja	AbD serotec (AHP500G)	IF	1:100
<b>Lamp2 (H4B4)</b>	Lisosomas	Ratón	Hibridoma / Dr.Soll University of Iowa	IF	1:100
<b>hSPCA1</b>	Go	Conejo	Dr. Wyutack	WB	1:200
<b>Actina</b>	Filamentos	Conejo	SIGMA (A2668)	WB	1:200
<b>SERCA3</b>	RE	Ratón	Santa Cruz (Sc-81759)	E.E	10 µg/µL

Tabla 8. Usos de anticuerpos secundarios.

Anticuerpo secundario	Especie	Fuente	Técnica	Dilución
<b>HRP</b>	Cabra anti-conejo	Bio-Rad (170-6515)	WB	1:1000
<b>Alexa fluo 568</b>	Cabra anti-ratón	Molecular Probes (A-11031)	IF	1:200
<b>Alexa fluo 568</b>	Burro anti-oveja	Molecular Probes (A-21099)	IF	1:200
<b>Alexa fluo 488</b>	Cabra anti-ratón	Molecular Probes (A-11011)	IF	1:200

#### 3.7.1 Inmunofluorescencia y análisis de colocalización.

Las células se sembraron a una densidad de  $2-3 \cdot 10^4$  en un cubreobjeto de 12 mm. Se fijaron con metanol al 100 % a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  (TGN46, GM130, Lamp2) durante 20 minutos, seguido de una permeabilización y bloqueo de las uniones inespecíficas, con una solución de Tritón X-100 al 0.1 % con suero de cabra al 10 % en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadió el anticuerpo primario correspondiente (**Tabla 7**) en la misma solución y se incubó durante toda la noche a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . Al día siguiente las muestras se lavaron con PBS tres veces durante 15 minutos en agitación y, posteriormente, se incubaron durante una hora a temperatura ambiente y en la oscuridad, con los correspondientes anticuerpos secundarios (**Tabla 8**). Tras tres lavados con PBS durante 15 minutos con agitación, se añadió una solución de DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol, Molecular Probes D-1306) en PBS a una concentración de  $1\text{ }\mu\text{g/ml}$  que se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, los cubreobjetos se lavaron con PBS y con agua desionizada, se montaron sobre un portaobjeto con el líquido de montaje VectaShield (Vector laboratorios Inc., H-1000) y se sellaron con esmalte de uñas.

Las imágenes de fluorescencia se tomaron con un microscopio confocal Leica SP5 equipado con un láser blanco y un objetivo de 63 X (HCX Plan Apo C5, A.N 1.4). El análisis estadístico de la colocalización de imágenes con dos colores se realizó según el protocolo previamente descrito (French y cols., 2008). Las imágenes se tomaron a 16 bits y se guardaron en el formato *.lic* para ser tratadas y analizadas posteriormente con el programa *ImageJ*. En primer lugar, las imágenes se importaron con la extensión informática *Bioformats Importer* de *ImageJ* y se separaron en los tres canales correspondientes a cada color (rojo, verde y azul). Seguidamente se ajustó el nivel de brillo y contraste de cada imagen y se mezclaron de nuevo los canales. Tras el ajuste, se transformaron a RGB y se guardaron en formato *.tif* para posteriores análisis. En los análisis de colocalización las imágenes se tomaron en el plano Z total de la célula, lo que permitió la posterior reconstrucción en 3D de la célula u orgánulo usando la extensión informática *Volume 3D* de *ImageJ*. Por último, con el fin de hacer un análisis cuantitativo de la colocalización, se utilizó una extensión del programa *ImageJ*, *PSCcolocalization*, que permite obtener el índice de correlación de Pearson (*r*). Este abarca valores entre -1 (correlación negativa máxima) y +1 (correlación positiva máxima).

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS.**

---

#### **3.7.2 Western blot.**

El *western blot* se realizó en células HeLa tras el tratamiento con siRNA durante 48 ó 72 h. Después de cada tratamiento, las células se lavaron tres veces con PBS frío y se lisaron con Tris-HCl 10 mM, pH = 8.0; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM; NP-40 1%; PMSF 0,1 mM; NaF 25 mM; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 5 Mm y API (aprotinina 100 µg/ml, pepstatina 100 µg/ml y 100 leupeptina µg/ml) durante 30 min. Después de centrifugar a 12000 r.c.f 10 min, el sobrenadante se diluyó en tampón Laemmli 5 X (Tris-HCl 60 mM, pH = 6,8; glicerol 5 %; SDS 10 %; β-mercaptoetanol; azul de bromofenol 0,01 %). La concentración proteica del extracto se cuantificó según el método Bradford (Bio-Rad protein assay, 500-0006). Se cargaron 50 µg de proteína en cada carril en un gel de poliacrilamida al 8%. Como marcador de electroforesis se usó el *Precision plus protein standards* (Bio-Rad, 161-0373). Después de la transferencia húmeda a una membrana de nitrocelulosa, ésta se bloqueó en TBS con 0,5 % Tween-20 y 5 % de leche, durante 2 horas a temperatura ambiente y, a continuación, se incubó durante toda la noche a 4 °C con el correspondiente anticuerpo primario, como se indica en la **Tabla 7**. Al día siguiente la membrana se lavó 3 veces con TBS y se añadieron los anticuerpos secundarios conjugados con la peroxidasa de rabanillo (**Tabla 8**) y se incubaron 1 h a temperatura ambiente y en agitación. A continuación, se repitieron los lavados con TBS y se procedió al revelado de la membrana por quimioluminiscencia (luminol 6,25 µM, ácido cumárico 6,38 µM, tris-HCl 100 mM pH = 8,5; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03 %). La digitalización de la película se realizó en el densitómetro GS-800 (BioRad) con el programa *Quantity One 4.6.3*.

#### **3.7.3 Determinación de la actividad ATPasa de SERCA3.**

Estos experimentos se realizaron en el laboratorio del Dr. Rosado (Universidad de Extremadura, Cáceres), en un proyecto en colaboración. La actividad SERCA3 se determinó en muestras proteicas purificadas por inmunoprecipitación. Se mezclaron en una relación 1:1 los volúmenes de células ( $6 \cdot 10^6$  células/ml) HeLa o HEK293 con un volumen del tampón RIPA (2 X) libre de fosfatasas e inhibidores de quinasas. La inmunoprecipitación de SERCA3 se realizó con el kit de inmunoprecipitación Dynabead® protein G (Invitrogen, Madrid, España) y 10 µg/µL del anticuerpo específico frente a anti-SERCA 3 (PL / IM430). Las muestras se lavaron 2 veces con un tampón de lavado y se resuspendieron con un tampón de elución, ambos disponibles en el kit. La hidrólisis de ATP fue determinada con el ensayo enzimático según el método descrito previamente (Chandrasekera y

Lytton, 2003). La concentración proteica se determinó según el método de Bradford. Entre 50-60  $\mu\text{g}$  de proteína SERCA 3 se resuspendió en el tampón de ensayo que contenía MOPS, 21 mM;  $\text{NaN}_3$ , 4,9 mM; EGTA, 0,06 mM; KCl, 100 mM; glicerolfosfato, 1mM;  $\text{MgCl}_2$ , 3 mM; NADH, 0,1 mM; fosfoenolpiruvato, 1 mM, piruvato kinasa 1 U/ml y lactato deshidrogenada 1 U/ml. La hidrólisis de ATP se cuantificó siguiendo la absorbancia a 340 nm, reflejo de la oxidación de NADH durante 5 minutos a 37 °C. El ensayo dió comienzo tras la adición de ATP (1 mM) en un lector de placas de 96 pocillos TECAN infinite M200. La actividad SERCA 3 se calculó a partir de los cambios de absorbancias dividido por el coeficiente de extinción de NADH ( $6,22 \text{ cm}^2 / \mu\text{mol}$ )  $\cdot \mu\text{g}$  de proteína  $\cdot \text{min}$ . La actividad ATPasa se determinó en presencia ( $\text{Ca}^{2+}$  1mM) o ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (EGTA 4 mM), ambos con o sin TBH (10  $\mu\text{M}$ ).

#### 3.8 Análisis de la expresión génica

El RNA total se aisló a partir de  $5 \cdot 10^4$  células HEK293 o HeLa sembradas en placas de 6 pocillos (3 pocillos para cada tipo celular). Cada pocillo se procesó individualmente para obtener triplicados. El protocolo de extracción se hizo según las especificaciones del kit comercial de extracción fenólica TRIzol (Reagent®, Invitrogen™). La concentración de RNA obtenida se midió en un espectrofotómetro NanoDrop® (ND-1000), utilizándose 1  $\mu\text{l}$  de cada muestra y obteniéndose valores entre 100 y 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Posteriormente se comprobó la integridad del RNA mediante una electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1 % en TBE-MOPS.

La síntesis de cDNA a partir del mRNA maduro se llevó a cabo con el kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). La reacción enzimática contenía 1-2  $\mu\text{g}$  del RNA purificado; 2,5  $\mu\text{l}$  del tampón 10 X; 2,5  $\mu\text{l}$  dNTPs 10 mM; 2,5  $\mu\text{l}$  de Oligo dT 10 X; 1  $\mu\text{l}$  de la transcriptasa reversa; y,  $\text{H}_2\text{O}$  libre de nucleasas hasta completar un volumen total de 25  $\mu\text{l}$ .

La reacción enzimática se llevó a cabo en un termociclador (Applied Biosystems, Veriti 96-well) según el siguiente programa:

1. 20 °C 10 minutos.
2. 42 °C 90 minutos.
3. 99 °C 5 minutos.



### **3. MATERIALES Y MÉTODOS.**

La concentración de cDNA obtenida se midió en un espectrofotómetro NanoDrop® (ND-1000) utilizándose 1 µl de cada muestra y obteniéndose valores entre 100 y 200 ng/µl.

La expresión de SERCA3d en las células HEK293 y las HeLa se compararon según el método de cuantificación relativa descrito por (Livak y Schmittgen, 2001). La PCR cuantitativa (Q-PCR) se realizó en un termociclador *LightCycler* 480 (Roche, Alemania) mediante el kit SYBR® *Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystem*). Las reacciones contenían 200 ng de cDNA y 100 nM de cada cebador en un volumen final de 20 µl. Como gen de expresión constitutiva se utilizó el gen RPL18 (Miguel-Velado y cols., 2005). Las secuencias de los cebadores del gen control RPL18 fueron: sentido 5'-GGTTGTGGGG ACCATAACTG-3' y antisentido 5'-GGACGTAGGGTTTGGTGTG-3' y el producto amplificado tenía un tamaño de 276 pares de bases. Las secuencias de los cebadores del gen humano SERCA3d fueron: sentido 5'-GACCACACC GGGGCCAGGGACACA-3' y antisentido 5'-GCCTGTCATTTATCCGGCG-3' y el producto amplificado era de 226 bp.

El programa de amplificación fue el siguiente:

1. 95 °C 10 minutos, activación de la enzima y desnaturalización del DNA.
2. 95 °C 30 segundos, desnaturalización del DNA.
3. 55 °C o 58 °C 30 segundos, temperatura de alineamiento (dependiendo del gen).
4. 72 °C 30 segundos, extensión.
5. 35 ciclos desde el paso dos.
6. 72 °C 1 minuto, extensión final.

Para determinar la especificidad de la reacción de amplificación y descartar productos inespecíficos o dímeros de cebadores se realizó una curva de desnaturalización para cada gen, aumentando la temperatura cada 5 °C desde 70 °C hasta 95 °C y monitorizando la fluorescencia para cada temperatura. La temperatura de desnaturalización se observa como una drástica caída de la fluorescencia debido a la disociación del fluoróforo (SYBR® Green). De este modo tanto los productos inespecíficos, como los dímeros de cebadores tendrán diferentes temperaturas de desnaturalización de las obtenidas para el producto específico y al representar la derivada de la fluorescencia frente a la temperatura se observarán distintos picos.

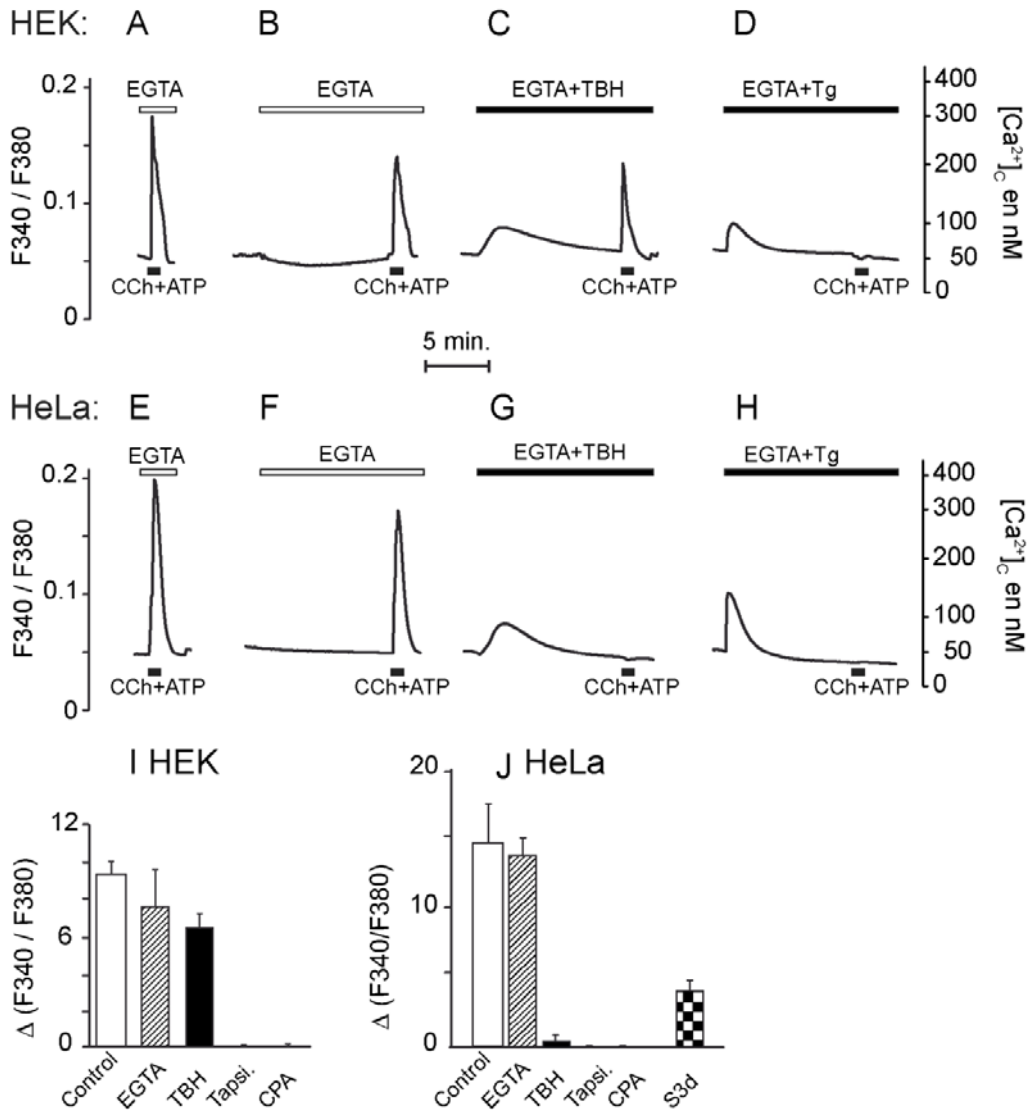
## 4 RESULTADOS.

### 4.1 Movilización de $\text{Ca}^{2+}$ inducida por agonistas en células HeLa y HEK293.

La movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  contenido en los depósitos intracelulares ocasiona su aumento transitorio en el citoplasma, con la génesis de un pico de  $[\text{Ca}^{2+}]_C$ . La relajación de este pico es debida al aclaramiento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico por las distintas ATPasas (PMCA, SERCA, SPCA) y, cuando existen, por los intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX y NCKX).

En un primer abordaje experimental comparamos el tamaño del pico de  $[\text{Ca}^{2+}]_C$  obtenido tras la estimulación con agonistas en dos modelos celulares, las células HeLa y las HEK293. Para obtener un efecto máximo, la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  se indujo por estimulación conjunta con dos agonistas: uno colinérgico (carbacol, CCh) y otro purinérgico (ATP), que estimulan la producción de  $\text{IP}_3$  en los dos tipos celulares (Short y cols., 2000; Smit y cols., 1993). En una serie de experimentos preliminares (no mostrados), comprobamos que, en efecto, CCh y ATP añadidos conjuntamente provocan una mayor liberación que cada uno de ellos por separado. Por esta razón, en los experimentos sucesivos se utilizaron los dos agonistas juntos para obtener una respuesta máxima. La **figura R1** compara las respuestas obtenidas en las células HEK293 (A-D) y en las células HeLa (E-H). Los experimentos se realizaron en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (en presencia de EGTA; A, B, E, F) y con o sin incubación con tres inhibidores distintos de la SERCA: tert-butil-hidroquinona (TBH, C y G), tapsigargina (Tg, D y H) y ácido ciclopiazónico (CPA, no mostrado en la **Fig. R1A-H**). Los experimentos se realizaron tanto en las células HEK293 como en las HeLa. La eliminación del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular evita la posible contribución de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de receptores P2X de ATP en ambos tipos celulares (Welter-Stahl y cols., 2009; Worthington y cols., 1999). Con los inhibidores de la SERCA se intenta evitar que los orgánulos que tienen esta bomba recaptan el  $\text{Ca}^{2+}$  liberado. En los paneles A y E (controles) las células se perfundieron con EGTA durante 30 segundos antes de añadir el estímulo. Este periodo previo garantiza el lavado del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, pero es lo suficientemente breve para evitar un vaciamiento pasivo substancial de los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . En los paneles B y F se muestran los picos de  $[\text{Ca}^{2+}]_C$  obtenidos por estimulación con CCh + ATP tras 12 minutos de incubación en medio libre de  $\text{Ca}^{2+}$ . En este caso, la altura del pico obtenido fue, en ambos tipos celulares, un 20 % menor que el obtenido en la situación control, con solo 30 segundos de pretratamiento en EGTA (comparar

#### 4. RESULTADOS.



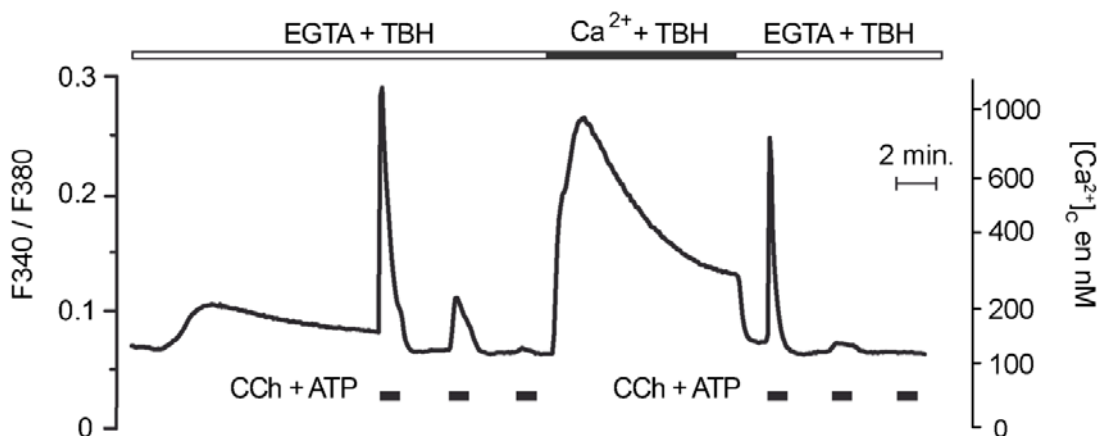
**Figura R1. Comparación de la movilización de Ca<sup>2+</sup> de los depósitos intracelulares en las células HEK293 y HeLa.**

Las mediciones de la movilización del Ca<sup>2+</sup> de los depósitos intracelulares inducidas por estimulación máxima con carbacol (CCh, 100 μM) y ATP (100 μM) (CCh + ATP) por 1 min se realizaron en células HEK293 (A-D) y en HeLa (E-H), cargadas con la sonda fura-2 AM. Se muestra el efecto de la eliminación del Ca<sup>2+</sup> extracelular (con la adición de 0,5 mM EGTA) como indican las barras. La retirada del Ca<sup>2+</sup> se llevó a cabo 30 s. (A y E), o 12 min. Antes de la estimulación (B y F). En algunos experimentos, además de retirar el Ca<sup>2+</sup> extracelular se inhibió la SERCA con TBH (10 μM) (C y G), o tapsigargina (Tg, 1 μM) (D y H). Cada trazo representa el promedio de tres experimentos similares. Los valores se expresan como cociente de las fluorescencias obtenidas con excitación a 340 nm y 380 nm. La calibración en [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> se muestra en la escala de la derecha. En (I) y (J) se muestran valores de las medias ± eem (n = 3-6) de los picos de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> obtenidos en las diferentes condiciones en las células HEK293 (I) y HeLa (J). La cuantificación se hizo a partir del aumento del cociente F340 / F380. Las diferentes condiciones se muestran en el eje de las abscisas: Control (el Ca<sup>2+</sup> se retiró 30 s antes del estímulo), EGTA (el Ca<sup>2+</sup> se retiró 12 min antes del estímulo), TBH (12 min de tratamiento con 10 μM de TBH, en medio libre de Ca<sup>2+</sup> antes del estímulo), Tg (12 min de tratamiento con 1 μM de Tg en medio libre de Ca<sup>2+</sup> antes del estímulo), y CPA (12 min de tratamiento con 15 μM de CPA en medio libre de Ca<sup>2+</sup> antes del estímulo).

con paneles A y E). Esto indica que la salida pasiva de los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la incubación en medio sin  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular es relativamente lenta, tanto en las células HeLa como en las HEK293. En una tercera serie de experimentos (paneles C y G), la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en orgánulos que contienen SERCA se evitó por incubación con TBH, un inhibidor reversible de la SERCA (Moore y cols., 1990). La  $[\text{Ca}^{2+}]_C$  aumenta de modo lento y transitorio durante el tratamiento con TBH debido a la liberación pasiva y gradual del  $\text{Ca}^{2+}$  contenido en los depósitos. Tras la incubación con TBH el depósito de  $\text{Ca}^{2+}$  sensible a  $\text{IP}_3$  se vació casi completamente en las células HeLa, donde el aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_C$  inducido por CCh + ATP fue de solo un 2 % del control (estimado de la altura del pico; **Fig. R1G**), mientras que en células HEK293 el pico de  $[\text{Ca}^{2+}]_C$  fue aún sustancial, un 64 % del obtenido en la situación control (**Fig. R1C**). El tratamiento con Tg, un inhibidor irreversible de la SERCA (Thastrup y cols., 1989), evitó completamente la respuesta inducida por CCh + ATP en ambos tipos celulares, HEK293 (**Fig. R1D**) y HeLa (**Fig. R1H**). Esto indica que los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a  $\text{IP}_3$  se vacían completamente con este inhibidor. El mismo resultado que con la tapsigargina se observó con ácido ciclopiazónico (CPA), otro inhibidor de la SERCA (Seidler y cols., 1989) (datos no mostrados). El resultado del promedio de muchos experimentos similares se muestra en los paneles I y J de la **figura R1**. En resumen, nuestros resultados indican que en las células HEK293 existe una fracción sustancial del depósito de  $\text{Ca}^{2+}$  sensible a  $\text{IP}_3$  que es resistente a TBH, pero sensible a Tg o CPA. Por el contrario, en las células HeLa el 100% del  $\text{Ca}^{2+}$  liberado por  $\text{IP}_3$  es sensible a TBH.

Lo primero que nos planteamos fue si el depósito de  $\text{Ca}^{2+}$  resistente a TBH de las células HEK293 sería capaz de vaciarse de forma completa por agonistas, y si una vez vacío podría rellenarse con  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de TBH. Para estudiar este segundo punto, las células HEK293 se incubaron con TBH durante 12 minutos en un medio libre de  $\text{Ca}^{2+}$ , y posteriormente se aplicaron tres estímulos consecutivos de CCh + ATP. Los resultados obtenidos con este diseño experimental se muestran en la **figura R2**. El primer estímulo con los agonistas produjo un pico de  $[\text{Ca}^{2+}]_C$  que alcanzó valores de 1000 nM (ver calibración de  $\text{Ca}^{2+}$  a la derecha); el segundo estímulo produjo un pico mucho menor, de aproximadamente 200 nM, y el tercer pico fue casi indetectable. Esto indica que el depósito de  $\text{Ca}^{2+}$  resistente a TBH es liberado por  $\text{IP}_3$  y que con los tres estímulos consecutivos se logró vaciarlo completamente. La re-introducción de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de TBH, provocó

#### 4. RESULTADOS.



**Figura R2. Vaciamiento y llenado reversible de los depósitos intracelulares resistentes a TBH en las células HEK293.**

Las células se incubaron en medio sin Ca<sup>2+</sup> (0,5 mM EGTA) y en presencia de TBH (10 μM) durante 12 min. Posteriormente se estimularon 3 veces durante 1 min con la mezcla de agonistas CCh + ATP con un lapso de tiempo de 2 min entre cada estímulo para vaciar los depósitos de Ca<sup>2+</sup>. A continuación se incubaron con Ca<sup>2+</sup> 1 mM en presencia de TBH durante 9 min para permitir su relleno y, finalmente, se llevó a cabo el mismo protocolo de activación con tres pulsos de CCh + ATP dado al principio. Representación característica de 3 experimentos similares.

un gran aumento transitorio de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub>, que declinaba lentamente, sin llegar a los niveles basales al cabo de los 8 minutos que se prolongó la incubación con Ca<sup>2+</sup> + TBH. La primera parte refleja la rápida entrada del Ca<sup>2+</sup> a través de mecanismos capacitativos, activados por el vaciamiento de los depósitos (SOCE por *Store Operated Ca<sup>2+</sup> Entry*) (Parekh y Penner, 1997). La segunda parte corresponde a la desactivación de la entrada capacitativa como consecuencia del relleno de los depósitos intracelulares, con la consecuente disminución de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> debido al aclaramiento de Ca<sup>2+</sup> llevado a cabo por las ATPasas de Ca<sup>2+</sup>, la SERCA bombeándolo hacia el interior de los depósitos y la PMCA hacia el medio extracelular. Por este motivo, durante estos 8 minutos los depósitos intracelulares deberían rellenaarse con Ca<sup>2+</sup>. Así sucede en efecto, como se muestra en la última parte del experimento: cuando se eliminó el Ca<sup>2+</sup> extracelular y se repitió el protocolo de estimulación en medio sin Ca<sup>2+</sup> (EGTA + TBH) aplicando tres estímulos de CCh + ATP volvió a aumentar [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub>. El primer estímulo produjo un pico de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> de altura comparable a la del pico control (un 80 % de su amplitud), lo que indica que el depósito se había relleno substancialmente. El segundo estímulo provocó un pequeño efecto residual, indicando que la mayoría del Ca<sup>2+</sup> ya había sido movilizado por el primer estímulo; y el tercer estímulo no produjo efecto alguno. Así pues, estos experimentos demuestran que el

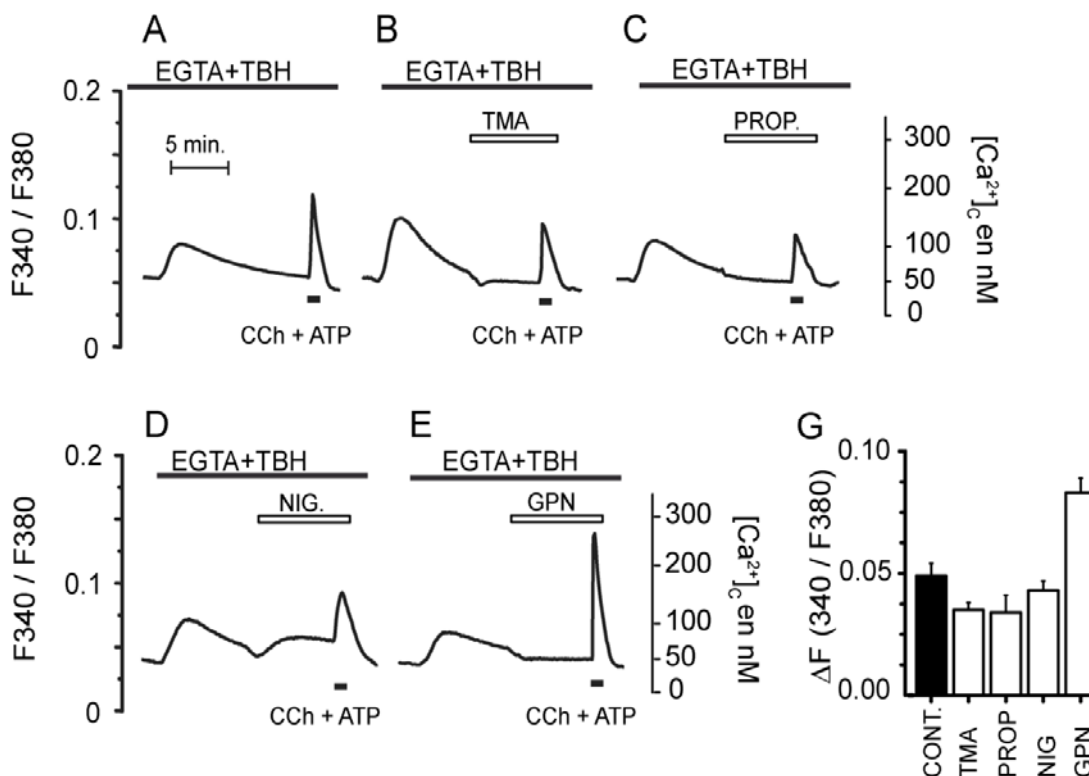
compartimento de los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  que es resistente a TBH puede liberarse completamente por estimulación vía  $\text{IP}_3$  y que, una vez vacío, el depósito se rellena de nuevo en unos minutos en presencia de TBH cuando se repone  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio extracelular.

### 4.2 El subcompartimento resistente a TBH no es un compartimento ácido y ni alcalino.

En diferentes tipos celulares se ha descrito la existencia de gránulos ácidos (Churchill y cols., 2002; Lopez y cols., 2005) o alcalinos (Fonteriz y cols., 1991) capaces de acumular  $\text{Ca}^{2+}$ . Parece que el gradiente de pH es necesario para la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$ , pues su colapso inhibe la acumulación (Fonteriz y cols., 1991; Lopez y cols., 2005). Entre los agentes empleados destacan la bafilomicina, que bloquea a la  $\text{H}^+$ -ATPasa e impide la acidificación de los gránulos (Moriyama y Nelson, 1989); la nigericina, que disipa el gradiente de protones intercambiando  $\text{H}^+$  por  $\text{K}^+$ ; la trimetilamina (TMA), un álcali que se acumula en los gránulos ácidos y colapsa el gradiente de  $\text{H}^+$ ; y el propionato, un ácido débil que se acumula en gránulos alcalinos y colapsa su gradiente de  $\text{H}^+$ . Por otra parte, la disrupción osmótica de los lisosomas con el tripéptido glicil-L-fenilalanina 2-naftilamida (GPN) elimina también el depósito de  $\text{Ca}^{2+}$  en los lisosomas (Berg y cols., 1994). En el caso de los gránulos alcalinos de los neutrófilos humanos, el tratamiento con propionato, que transporta  $\text{H}^+$  al interior de los gránulos colapsando el gradiente de pH, evita la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fonteriz y cols., 1991).

Utilizando estos agentes se diseñaron una serie de experimentos para evaluar la contribución de los compartimentos intracelulares ácidos y alcalinos a la acumulación del  $\text{Ca}^{2+}$  del depósito resistente a TBH en las células HEK293. Los resultados se muestran en la **figura R3**. Las células HEK293 se incubaron con TBH en medio libre de  $\text{Ca}^{2+}$  (1 o 2 minutos) y a continuación se añadieron los distintos inhibidores para estudiar su efecto sobre el pico de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducido por CCh + ATP. El efecto de estos agentes, capaces de modificar el pH intracelular debe considerarse con especial cuidado, ya que los cambios de pH pueden modificar también la afinidad de las sondas por el  $\text{Ca}^{2+}$  y, por tanto falsear las medidas. En primer lugar, se probó el efecto de la base débil trimetilamina (TMA, **Fig. R3B**) que se acumula dentro de los compartimentos ácidos y colapsa el gradiente de pH. En el panel siguiente se muestra el efecto del ácido débil

#### 4. RESULTADOS.



**Figura R3. Efecto de distintos tratamientos que disipan los gradientes de pH sobre la movilización del  $Ca^{2+}$  intracelular resistente a TBH en células HEK293.**

Las células HEK293, se cargaron con fura-2 AM para monitorizar los cambios en la  $[Ca^{2+}]_c$ . Cada trazo de la figura representa el promedio de 3-6 experimentos similares. Se realizaron distintos tratamientos de 7 min de duración: (A) con la base débil trimetilamina (TMA, 6 mM); (B) con el ácido débil propionato (PROP, 6 mM); (C) con el ionóforo intercambiador de  $H^+/K^+$  nigericina (NIG, 10  $\mu$ M) (D), con el péptido disruptor de los lisosomas GPN (10  $\mu$ M), y se observó el efecto sobre el incremento de  $[Ca^{2+}]_c$  inducido por CCh + ATP. Los valores mostrados en (G) son medias  $\pm$  eem de 3 determinaciones.

propionato (PROP., **Fig. R3C**), que se acumula en los compartimentos alcalinos. En tercer lugar se muestra el efecto de la nigericina, que colapsa el gradiente de pH, tanto de compartimentos ácidos como alcalinos, intercambiando  $H^+$  por  $K^+$  (NIG., **Fig. R3D**). En conjunto, todas estas maniobras (**Figs. R3A-R3D**) tuvieron un efecto pequeño sobre el pico de  $[Ca^{2+}]_c$ , que además fue muy similar en los tres casos, indicando que no es un efecto atribuible al colapso del pH de compartimentos ácidos o alcalinos. Finalmente, el GPN más que inhibir el aumento de  $[Ca^{2+}]_c$  inducido por CCh y ATP, pareció estimularlo, ya que el pico fue mayor que el control (**Fig. R3E**). Este sorprendente resultado indica, en todo caso, que la liberación de  $Ca^{2+}$  desde los lisosomas no contribuye al pico de  $Ca^{2+}$  resistente a TBH. La **figura R3G** muestra los promedios ( $\pm$  eem) de los resultados obtenidos en tres experimentos similares, que indican que ni los gránulos ácidos

ni los alcalinos contribuyen de forma significativa al pool de  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado en el compartimento resistente a TBH de las células HEK293.

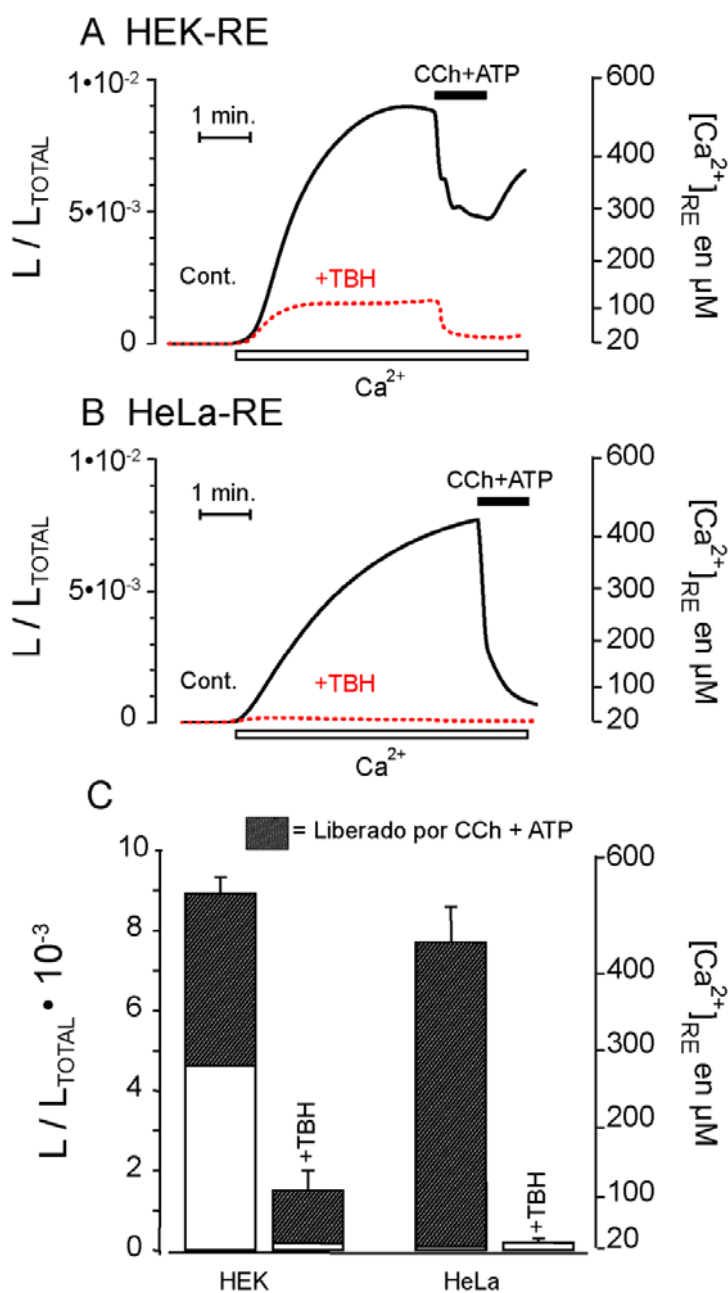
### 4.3 El RE presenta un subcompartimento resistente a TBH en células HEK293, pero no en HeLa.

Está ampliamente aceptado que el RE es el principal reservorio intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , y existen evidencias de que este compartimento puede presentar cierta heterogeneidad, al menos en algunos tipos celulares. En nuestro laboratorio contamos con distintas construcciones de aequorinas dirigidas al RE para poder medir directa y selectivamente la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ , (Alonso y cols., 1999; Montero y cols., 1995). Por este motivo, nuestro siguiente objetivo consistió en explorar directamente la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE y la sensibilidad a TBH en los dos tipos celulares estudiados, las células HEK293 y las HeLa. Los resultados de esa serie de experimentos se muestran en la **figura R4**. En los experimentos del panel A se utilizó la línea celular HEK293 que expresa constitutivamente el gen de la GFP-Aeq<sup>D119A</sup> dirigida al RE (erGA). En el panel B, las células HeLa fueron transfectadas el día anterior con un vector erGA (ver «Materiales y Métodos»). En ambos tipos celulares el RE se vació de  $\text{Ca}^{2+}$  por incubación previa en un medio sin  $\text{Ca}^{2+}$  y con TBH como se ha descrito en «Materiales y Métodos». En los experimentos mostrados en la **figuras R4A y R4B** tras 1 minuto de incubación en medio sin  $\text{Ca}^{2+}$ , se inició el experimento por perfusión con  $\text{Ca}^{2+}$  1 mM, durante 5 minutos para permitir el relleno con  $\text{Ca}^{2+}$  del RE. Se comparó la situación control (trazo negro continuo); con lo que sucedía cuando, además del  $\text{Ca}^{2+}$ , el medio de perfusión contenía TBH (+TBH, trazo punteado en rojo). Tras 5 minutos de relleno las células se estimularon con CCh + ATP durante 1 minuto.

En la situación control el relleno del RE alcanzó niveles de unos 500  $\mu\text{M}$  en ambos tipos celulares. La estimulación con CCh + ATP causó un vaciamiento del RE en un 50 % en las células HEK293 (A), mientras que el vaciamiento fue prácticamente completo en las células HeLa (B). En presencia del inhibidor TBH casi no hubo relleno en las células HeLa, mientras que en las células HEK293, se alcanzó una  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$  que era de aproximadamente 100  $\mu\text{M}$ , un 20 % del valor del control de 500  $\mu\text{M}$ . La estimulación con CCh + ATP vació casi por completo este compartimento del RE, resistente a TBH. La **figura R4C** muestra los promedios de los valores de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$  obtenidos en varios experimentos similares.



#### 4. RESULTADOS.



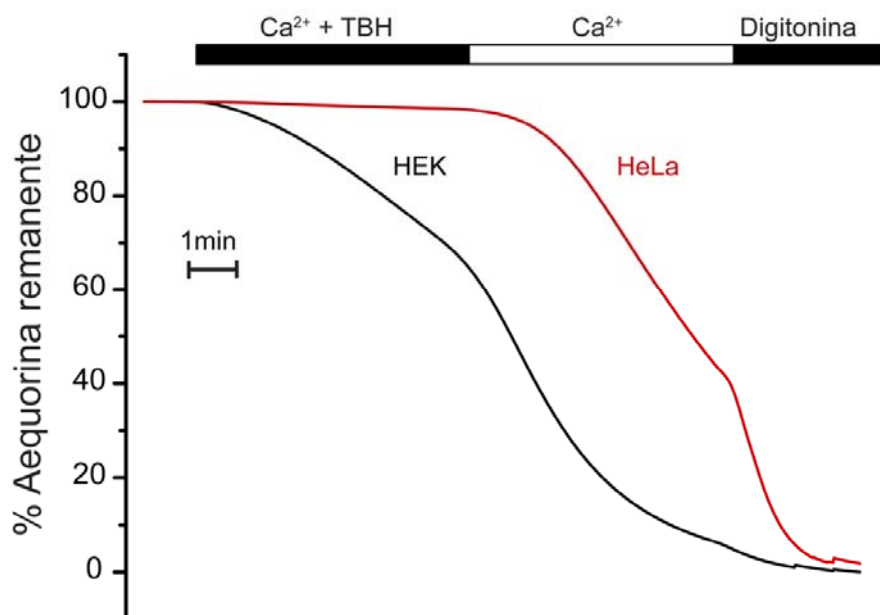
**Figura R4. Comparación del relleno de  $Ca^{2+}$  y del vaciamiento inducido por los agonistas en el RE en células HEK293 y HeLa.**

Las células HEK293 (A) y HeLa (B), que expresan la aequorina dirigida al RE (erGA), reconstituidas con celenterazina n 1  $\mu M$  (ver «Materiales y Métodos»), se lavaron con un medio libre de  $Ca^{2+}$  el tiempo que se indica. Posteriormente, se perfundieron con un medio que contiene  $Ca^{2+}$  1 mM (Control, línea continua) o  $Ca^{2+}$  1 mM + TBH 10  $\mu M$  (+TBH, línea de puntos). En el momento que se indica en la figura las células se estimularon con CCh + ATP (100  $\mu M$  de cada uno). Los valores se representan como  $L/L_{TOTAL}$  (izquierda) y calibrados como  $[Ca^{2+}]_{RE}$  en  $\mu M$  (derecha). Cada trazo es representativo de 3 experimentos similares. En el diagrama de barras de (C) se muestran los valores de media  $\pm$  eem ( $n = 3$ ) de los niveles de  $Ca^{2+}$  alcanzados en el estado estacionario (en  $L/L_{TOTAL}$  en las diferentes condiciones de relleno ( $Ca^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  + TBH), en ambos tipos celulares. Los recuadros rayados corresponden a la fracción del depósito liberado por estimulación con CCh + ATP.

Nótese que la diferencia entre células HEK293 y HeLa resulta muy llamativa. En las HeLa el tratamiento con TBH abolió completamente la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE. En contraste, las células HEK293 acumularon  $\text{Ca}^{2+}$  tras el tratamiento con TBH, si bien la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$  alcanzada es menor ( en  $\mu\text{M} \pm \text{eem}$ ;  $n = 3$ )  $111 \pm 20$ , comparada con  $554 \pm 18$  en los controles. Por otra parte, se confirma que todo el compartimento de  $\text{Ca}^{2+}$  sensible a TBH se moviliza con CCh + ATP, mientras que hay una parte de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$  de las células HEK293 (aproximadamente el 50%) que no se moviliza por CCh + ATP. Curiosamente, esta fracción no existe en células HeLa, donde la estimulación con CCh + ATP moviliza el 100 % del  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado.

Del análisis detallado del consumo de la aequorina durante la emisión de bioluminiscencia puede obtenerse valiosa información sobre el tamaño relativo del compartimento que contiene el  $\text{Ca}^{2+}$ . En los experimentos realizados con erGA, al inicio de cada experimento el 100 % de la aequorina reconstituida está libre, y no unida a  $\text{Ca}^{2+}$ , por lo cual no hay emisión de luz y se dispone del total de la aequorina unida a su cofactor. A medida que se va rellenando el RE se produce la unión de la aequorina al  $\text{Ca}^{2+}$  y, como consecuencia, la emisión de luz y el consumo de la aequorina con oxidación de la celenterazina (Shimomura y cols., 1974; Shimomura y cols., 1993). Si pudiéramos calcular la fracción de aequorina consumida podríamos estimar la fracción del RE que ha contenido  $\text{Ca}^{2+}$ . La aequorina no consumida estaría en un compartimento que no se ha rellenado con  $\text{Ca}^{2+}$ . Como se describe en «Materiales y Métodos» al final de cada experimento las células se permeabilizan y se incuban en un medio de alto  $\text{Ca}^{2+}$  para gastar toda la aequorina restante que no se hubiera consumido a lo largo del experimento y así poder calcular la luminiscencia total ( $L_{\text{TOTAL}}$ ). En la **figura R5** se muestra el curso temporal del consumo de la aequorina, expresado como el porcentaje que queda de la aequorina total (al inicio 100 % no consumida). Se comparan los trazados correspondientes a las células HEK293 (trazo negro) y HeLa (trazo rojo). El protocolo consiste en el rellenado del RE, primero en presencia de TBH ( $\text{Ca}^{2+}$ +TBH) durante 5 minutos, después se retira la TBH, con el consiguiente aumento de la velocidad de rellenado de los depósitos con  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}$ ), y finalmente se lisan las células con digitonina y  $\text{Ca}^{2+}$  para quemar el resto de la aequorina. Como puede apreciarse, en células HeLa el consumo de la aequorina fue extremadamente lento en presencia de TBH, lo que indica que únicamente existe una fracción muy pequeña, menor del 10 % capaz de rellenarse con  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de TBH. Sin embargo, en células HEK293 la fracción de la aequorina gastada en presencia de TBH fue mucho mayor, aproximadamente un 40 % durante los 5 minutos de periodo de observación,

#### 4. RESULTADOS.

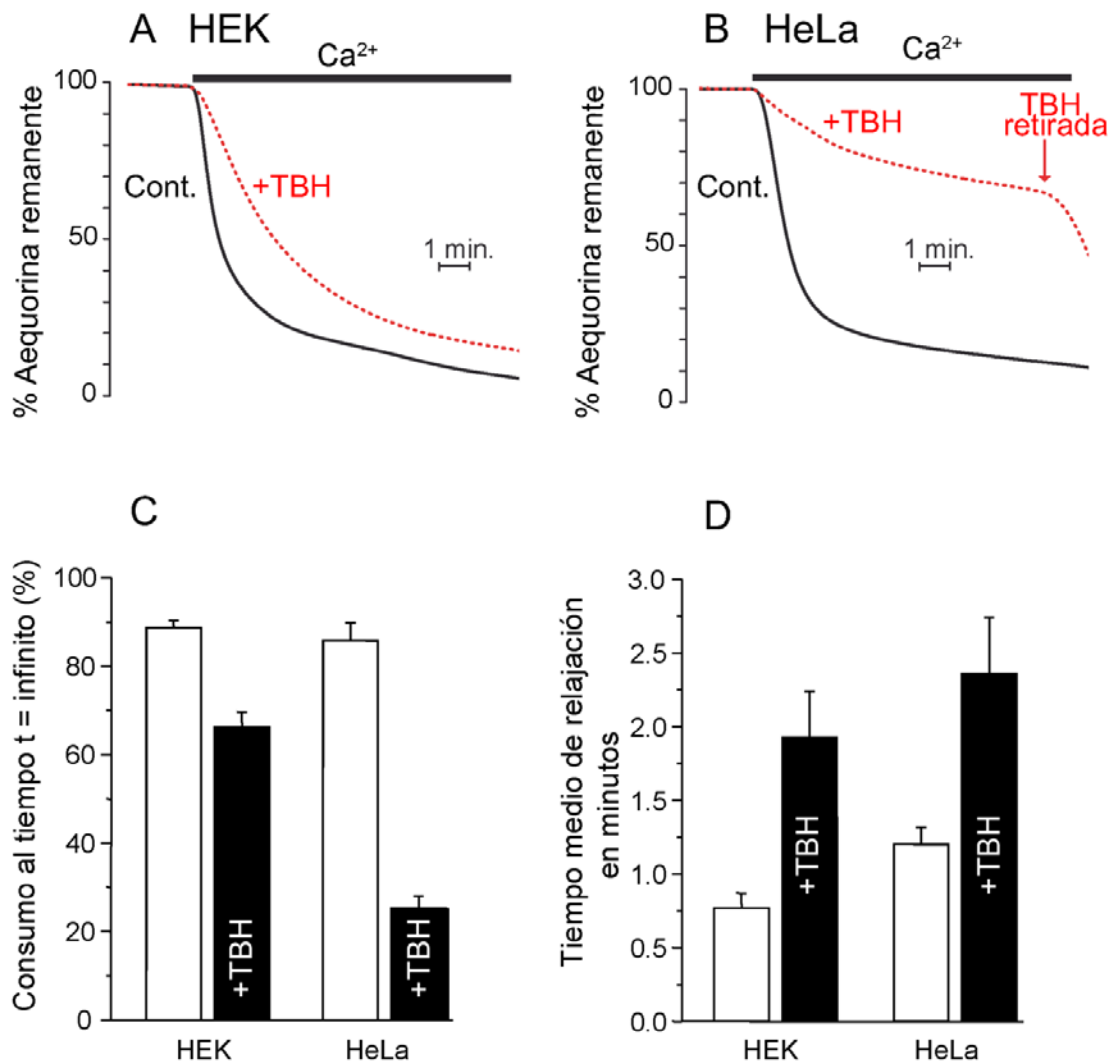


**Figura R5. El curso temporal del consumo de aequorina en células HEK293 y HeLa durante el llenado de los depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$ .**

Las células se trataron de la misma manera que la descrita en la leyenda de la **figura R4** y se lavaron con un medio libre de  $\text{Ca}^{2+}$  y después se incubaron: 1) primero con medio estándar que contenía  $\text{Ca}^{2+}$  1 mM y TBH 10  $\mu\text{M}$  ( $\text{Ca}^{2+} + \text{TBH}$ ) y 2) más tarde con el mismo medio sin TBH ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Por último, las células se lisaron con digitonina en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  10 mM. Los resultados se expresan como un porcentaje de la aequorina total restante en las células en cada momento dado. Cada trazo es la media de los valores obtenidos en tres experimentos similares.

sin que hubiera signos de que disminuyese substancialmente la velocidad de consumo tras este periodo. Eso significa que la mayor parte de la aequorina de las células HEK293 entra en contacto con el  $\text{Ca}^{2+}$  cuando se rellena el depósito intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de TBH. El porcentaje total no puede calcularse con precisión dado que durante el periodo de estudio solo se consumió un 40 % de la aequorina, pero el consumo real debe ser mucho mayor que esa cifra, dado que al final de la incubación con  $\text{Ca}^{2+} + \text{TBH}$  no había signos de que disminuyera la velocidad de consumo (pendiente de la línea negra).

Para poder medir con mayor precisión el tamaño del compartimento del RE insensible a TBH se diseñó una nueva serie de experimentos, en los cuales se reconstituyó la erGA con celenterazina nativa. En estas condiciones, la afinidad de la aequorina por el  $\text{Ca}^{2+}$  es mucho mayor y el consumo, especialmente a bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , es mucho más rápido. Los resultados del experimento se muestran en la **figura R6**, en la que se compararon los cursos temporales del



**Figura R6. Comparación del consumo de aequorina en células HEK293 y HeLa durante el relleno de los depósitos en presencia o ausencia de TBH (medidas con celenterazina nativa).**

Las células, HEK293 (A) y HeLa (B), fueron tratadas como se describe en la leyenda de la **figura R4** excepto en que la aequorina se reconstituyó con celenterazina nativa (1  $\mu$ M) en lugar de celenterazina n. Esto aumenta la afinidad por  $Ca^{2+}$  aproximadamente un orden de magnitud (ver «Materiales y Métodos»). Como se muestra en la figura, después de 2 min de incubación en medio libre de  $Ca^{2+}$ , se añadió  $Ca^{2+}$  1 mM y se siguió el consumo de la aequorina. Los resultados se expresan como el porcentaje de aequorina total remanente en las células en un momento dado. Cada trazo es el promedio de tres experimentos similares. En el caso de las células HeLa rellenas en presencia de TBH se muestra el efecto de la eliminación de la TBH al final de la trazo. En (C) se muestran los porcentajes de consumo de aequorina en el equilibrio en cada condición. Los valores se calcularon por extrapolación de las curvas en el equilibrio al momento de la adición de  $Ca^{2+}$ . En (D) se pueden mostrar los valores del  $t_{1/2}$  del consumo de aequorina en cada condición. Los valores del tiempo de semirelajación ( $t_{1/2}$ ) se estimaron en referencia al porcentaje de consumo calculado en (C). Los valores de (C) y (D) son (medias  $\pm$  eem) de 3 experimentos independientes.

#### **4. RESULTADOS.**

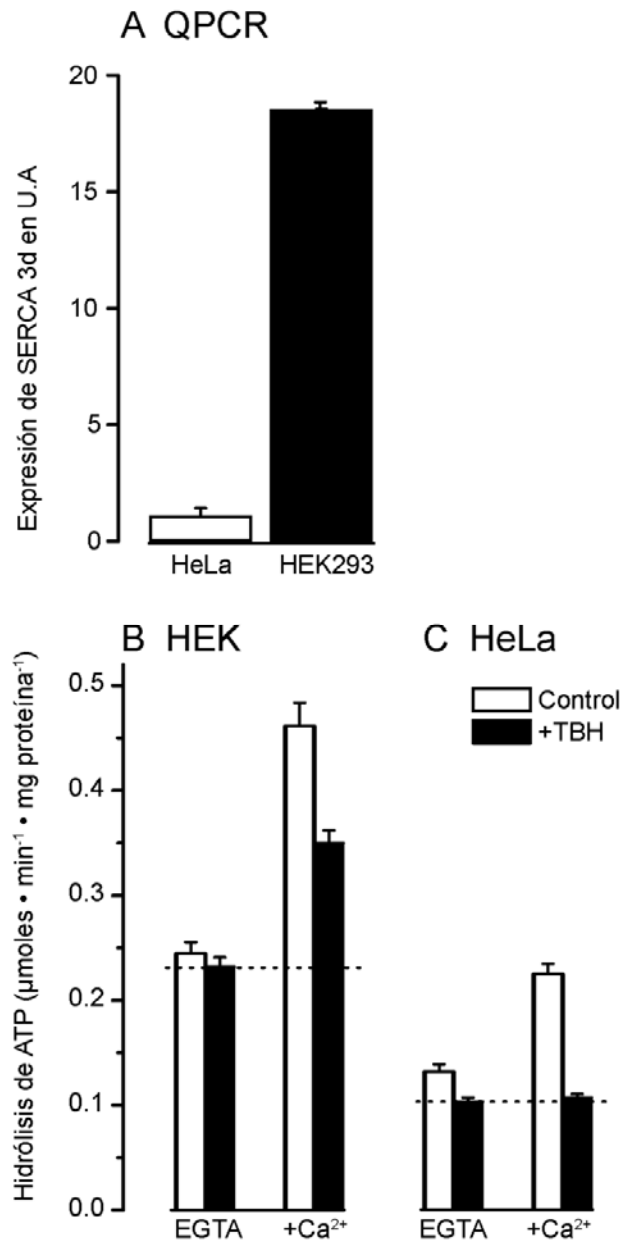
---

consumo de la aequorina en los dos tipos celulares durante el rellenado del RE en presencia y en ausencia de TBH. En células HEK293 (**Fig. R6A**) el consumo de la aequorina fue rápido y casi completo (más de un 80 %) en ambos casos, aunque algo más lento en presencia de TBH. Esto indica que la mayor parte del RE es capaz de acumular  $\text{Ca}^{2+}$  incluso en presencia de TBH. Los resultados en las células HeLa fueron completamente diferentes (**Fig. R6B**): el consumo con TBH fue cerca de 10 veces más lento que en el control. Además, parece que el rellenado sucedía en una fracción muy limitada del RE, menor del 20 % del total del compartimento (trazo rojo discontinuo). Tras el lavado de la TBH, la aequorina remanente se consumió rápidamente evidenciando la operación de un mecanismo de bombeo de  $\text{Ca}^{2+}$  sensible a TBH. Cuando el rellenado del RE se realizó en ausencia de TBH, la aequorina se consumió rápida y completamente (trazo continuo). Los resultados de varios experimentos como los ilustrados en las **Figs. R6A y R6B** se cuantificaron como porcentajes del consumo de aequorina (**Fig. R6C**) y como tiempos medio de relajación ( $t_{1/2}$ ) del consumo (**Fig. R6D**). Se muestra el promedio de tres experimentos similares (media  $\pm$  eem, n=3). El porcentaje de aequorina consumida en el equilibrio en presencia de TBH fue mucho menor en células HeLa,  $25 \pm 3\%$ ; que en células HEK293,  $66 \pm 4 \%$ ; ( $p < 0,001$ ) (**Fig. R6C**). Además, en presencia de TBH el consumo fue mucho más lento, tanto en células HeLa como en HEK293, tal como muestran los valores de  $t_{1/2}$  en la **figura R6D**.

#### **4.4 La SERCA3d es la responsable de la captación de $\text{Ca}^{2+}$ resistente a TBH.**

Con el fin de investigar cuál era el mecanismo responsable de la acumulación del  $\text{Ca}^{2+}$  resistente a TBH en las células HEK293, estudiamos la participación de los distintos tipos de SERCA. Se ha descrito que la expresión de SERCA2b es similar en células HeLa y en HEK293, mientras que las HEK293 expresan mayores niveles de SERCA3, principalmente la isoforma d, que las células HeLa (Martin y cols., 2002). Para verificar este particular se puso a punto la cuantificación de SERCA3d mediante Q-RT-PCR y se determinó el contenido de esta isoforma de la SERCA en ambos tipos celulares. Nuestros resultados revelaron que la expresión relativa de SERCA3d era (media  $\pm$  dem)  $19 \pm 5$  veces mayor en células HEK293 que en HeLa (**Fig. R7A**).

A continuación, investigamos si estas diferencias tenían una repercusión funcional, es decir, si la expresión diferencial de las isoformas de SERCA3d en



**Figura R7. Expresión y actividad ATPasa de SERCA3 en células HEK293 y HeLa.**

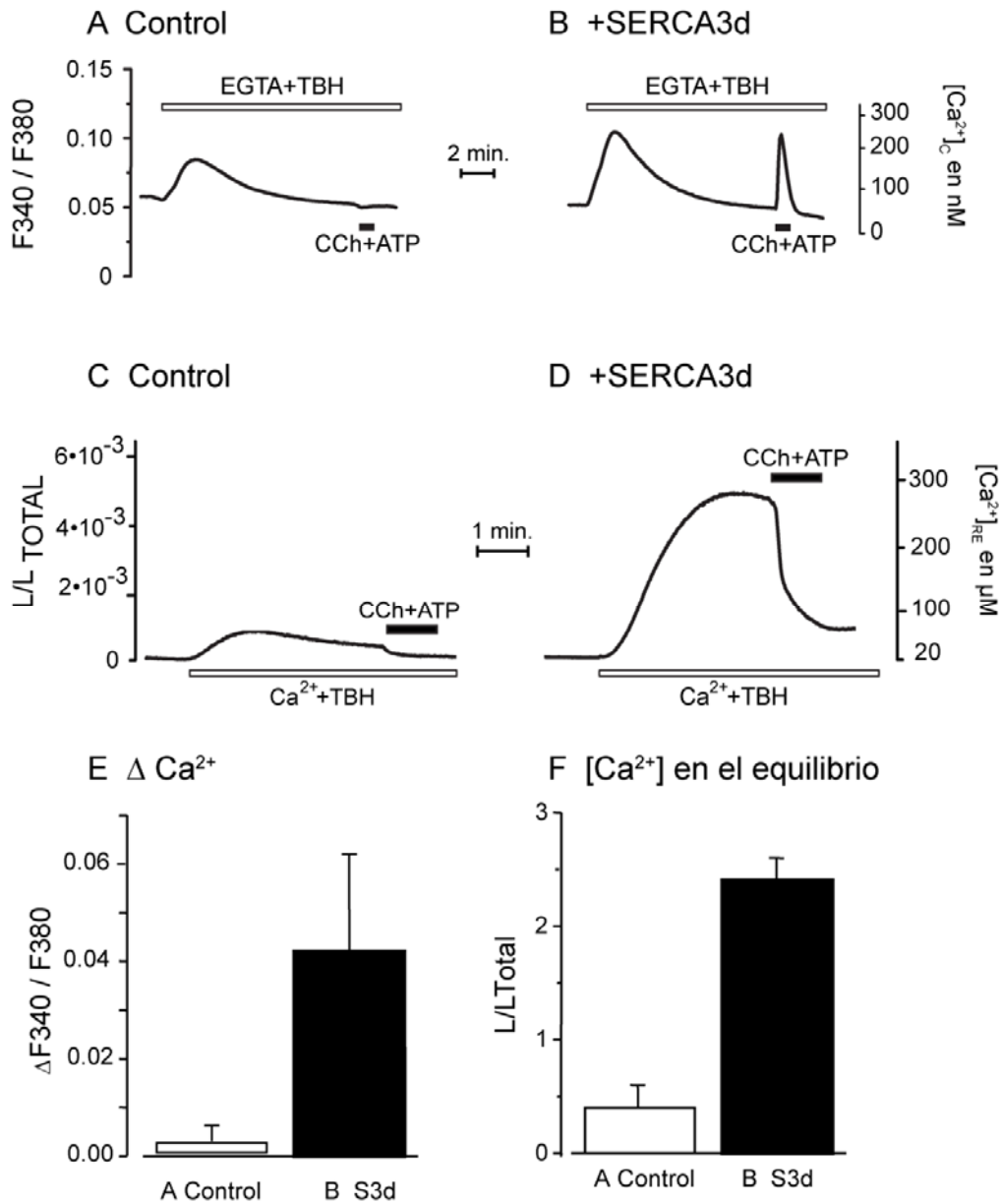
En (A) se muestra la expresión de SERCA3d. La reacción de PCR se realizó con cDNA (150 ng /  $\mu$ l) obtenido a partir de  $5 \cdot 10^4$  células HEK293 y HeLa, de tres muestras independientes de cada tipo celular. Cada muestra de cDNA se analizó por triplicado. Las columnas representan las medias del valor que resulta de aplicar el algoritmo,  $2^{\Delta\Delta Ct}$ , que indica el número de veces que se expresa el gen SERCA3d en células HEK293 sobre el de HeLa (valor arbitrario de 1). En (B) se muestran los valores obtenidos para la actividad de SERCA3 en distintas condiciones. Los extractos de células, HEK293 (A) y HeLa (B), se purificaron mediante inmunoprecipitación y la actividad ATPasa se determinó mediante un ensayo enzimático acoplado (véase «Materiales y Métodos»). En la figura se muestran los valores en ausencia (EGTA) y en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  1  $\mu\text{M}$  (+Ca<sup>2+</sup>) y; en ausencia (barras blancas) y en presencia de TBH (barras negras). Cada valor es la media  $\pm$  eem de cuatro experimentos individuales. Los valores obtenidos con TBH 20  $\mu\text{M}$  fueron los mismos que con TBH 10  $\mu\text{M}$ .

#### **4. RESULTADOS.**

---

los dos tipos celulares podían correlacionarse con una mayor o menor actividad en el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE. Para este propósito, determinamos la actividad ATPasa de la SERCA3, midiendo la hidrólisis del ATP y comparamos su sensibilidad a TBH en células HeLa y HEK293, como se describe en la sección de «Materiales y Métodos». Las **figuras R7B y R7C** muestran los resultados de la actividad ATPasa obtenidos con y sin  $\text{Ca}^{2+}$  y, ambos en ausencia y presencia de TBH. La actividad dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (media  $\pm$  eem; n=4) fue significativamente mayor en células HEK293 ( $0,217 \pm 0,023 \mu\text{mol min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$ ) que en las HeLa ( $0,093 \pm 0,003 \mu\text{mol min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$ ) (comparación de barras blancas B y C). Más llamativo aún fue el hecho de que mientras TBH inhibió completamente la actividad ATPasa estimulada por  $\text{Ca}^{2+}$  en las células HeLa (**Fig. R7C**), dejó una fracción sustancial de actividad resistente a TBH en las células HEK293 (**Fig. R7B**).

Finalmente, como corolario de los resultados anteriores inferimos que, si SERCA3 era la responsable de la actividad ATPasa insensible a TBH en las células HEK293, la sobreexpresión de SERCA3d en las células HeLa debería suponer la aparición del componente resistente a TBH. Los resultados obtenidos se muestran en la **figura R8**. Se monitorizaron en paralelo la  $[\text{Ca}^{2+}]_C$  (A y B) y la  $[\text{Ca}^{2+}]_{RE}$  (C y D), tanto en células HeLa control (transfectadas con el plásmido vacío; A y C) como en las que sobreexpresaban SERCA3d (B y D), y se compararon el relleno y la liberación de los depósitos intracelulares en presencia de TBH. En las medidas con fura-2 (A, B), la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  contenida en los depósitos debe ser proporcional al tamaño del pico de  $[\text{Ca}^{2+}]_C$  inducida por la estimulación con CCh + ATP. En las medidas con erGA (C, D) se mide directamente  $[\text{Ca}^{2+}]_{RE}$ . En concordancia con los datos mostrados anteriormente (**Figs. R1 y R3**), las células HeLa control no parecen tener ningún subcompartimento del RE insensible a TBH, ya que la estimulación con CCh y ATP no indujo ningún incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_C$  (**Fig. R8A**) y el RE se relleno muy ligeramente con  $\text{Ca}^{2+}$  (**Fig. R8C**). Sin embargo, en las células HeLa que sobreexpresan SERCA3d, la estimulación con CCh + ATP produjo un pico de  $[\text{Ca}^{2+}]_C$  (**Fig. R8B**) y las medidas directas en el RE demuestran que el relleno del RE con  $\text{Ca}^{2+}$  es seis veces mayor con respecto al control. Además, este compartimento se vació casi completamente por estimulación con los agonistas CCh + ATP (**Fig. R8D**). El promedio de los resultados obtenidos de tres experimentos similares se muestra en los paneles E y F. En resumen, estos resultados indican que la SERCA3d es la responsable de la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  resistente a TBH en el RE de las células HEK293, ya que, si la SERCA3b se expresa en células HeLa aparece la captación resistente a TBH.



**Figura R8. La expresión de SERCA3d en las células HeLa genera un compartimento resistente a TBH en el RE.**

El vector de expresión de SERCA3d se cotransfectó junto con el vector de expresión de erGA por adición a una proporción de 3:1 (véase «Materiales y Métodos»); los controles fueron transfectados con el vector vacío (pcDNA3) junto con erGA. En (A) y (B) se muestran los experimentos en los que las células se cargaron con fura-2 y se midió  $[Ca^{2+}]_c$ . Los detalles son los descritos en la leyenda de la **figura R1**. En (C) y (D) se muestran las medidas de RE con la aequorina dirigida a este orgánulo (erGA). Los detalles son los descritos en la leyenda de la **figura R4**. Los resultados son representativos de tres o cuatro experimentos similares. En (E) se muestran los promedios ( $\pm$  eem) del tamaño del pico de  $Ca^{2+}$  y; en (F) la  $[Ca^{2+}]_{RE}$  alcanzada en el estado estacionario medido como  $L / L_{TOTAL}$ . Las diferencias entre las células de control y las células que expresan SERCA3d (S3d) fueron estadísticamente significativas (ANOVA;  $P < 0,02$  en (E) y  $P < 0,0004$  en (F)).



#### **4. RESULTADOS.**

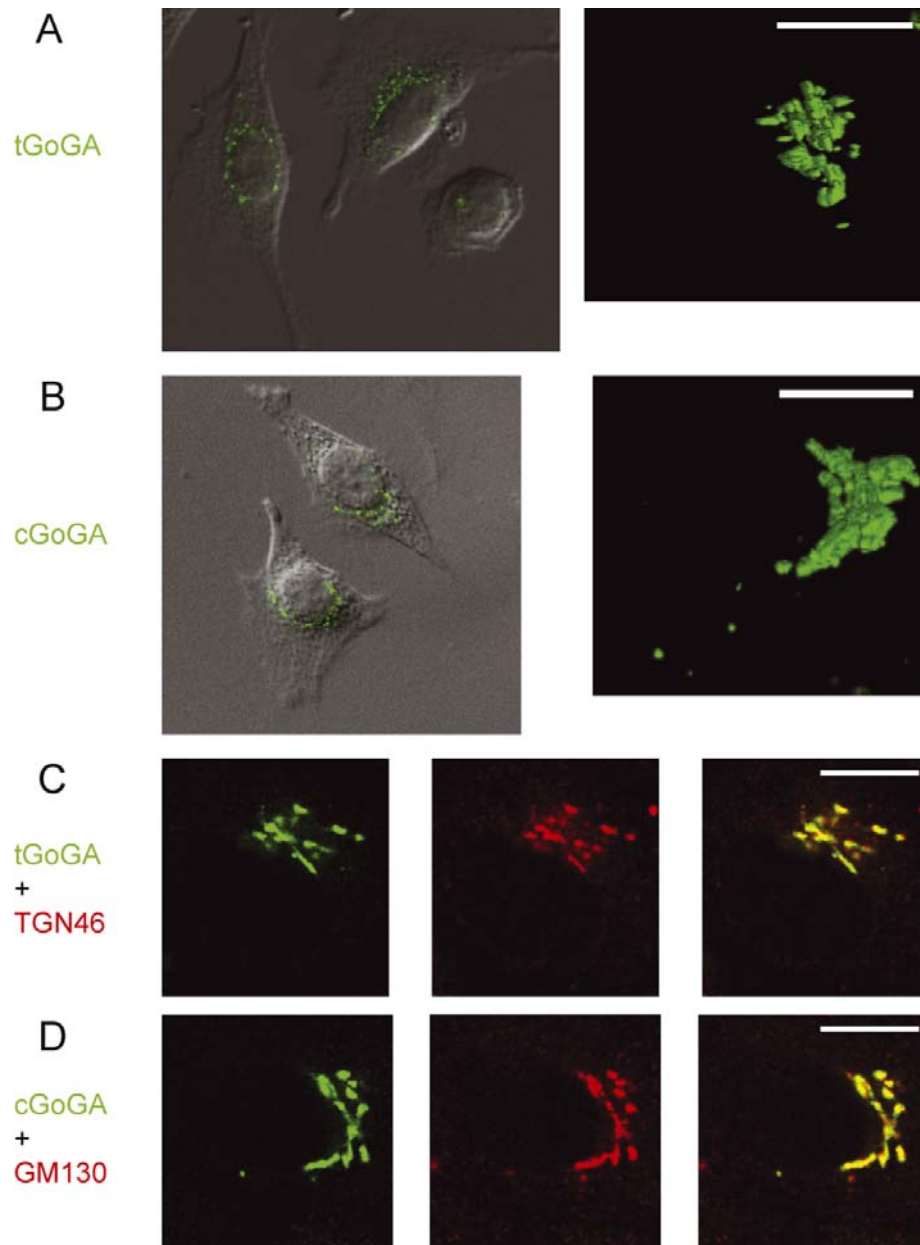
---

Aunque está claro que el RE es el principal responsable de la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  resistente a TBH (nuestra sonda, erGA, se expresa selectivamente en el RE y el RE es el depósito de mayor tamaño), otros depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  podrían colaborar en la génesis de la señal inducida por movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado. Se ha propuesto que el aparato de Golgi (Go) es también un compartimento con alto contenido de  $\text{Ca}^{2+}$ , capaz de liberarlo en respuesta a diferentes agonistas acoplados a la cascada de  $\text{IP}_3$  (Missiaen y cols., 2004b; Pinton y cols., 1998). Por estos motivos, pensamos que sería interesante complementar nuestro estudio en el RE con un estudio en el Go. En un experimento preliminar, expresando la sonda GAP dirigida al *trans*-Golgi en las células HEK293 encontramos una expresión relativamente pobre y no pudimos evidenciar un componente de la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  resistente a TBH (datos no mostrados), que sí encontramos en las células HeLa (véase más adelante). Por otro lado, la estructura microscópica y el marcaje del Go eran mucho mejores en estas células que en las células HEK293. Por estos motivos decidimos llevar a cabo el estudio sistemático de la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el Go en las células HeLa. Este estudio se describe en los apartados siguientes.

#### **4.5 Depósitos de $\text{Ca}^{2+}$ del Aparato de Golgi**

Como ya hemos mencionado, se ha propuesto que el aparato de Golgi (Go) es un compartimento de alto contenido de  $\text{Ca}^{2+}$ , y capaz de liberarlo en respuesta a diferentes agonistas acoplados a la cascada de  $\text{IP}_3$  (Missiaen y cols., 2004b; Pinton y cols., 1998). Por este motivo quisimos estudiar también el comportamiento del Go, del que además se conocen muchos menos detalles con respecto a la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Una complejidad añadida es que, como se ha comentado en la «Introducción», Go no es homogéneo, sino que se distinguen varios subcompartimentos (*cis*, *medial* y *trans*) que se especializan en diferentes funciones, por lo que la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  podría ser diferente. Con este fin, generamos dos nuevas sondas de  $\text{Ca}^{2+}$  basadas en la proteína de fusión bioluminiscente EGFP-aequorina (GA), que nos permitieran medir la  $[\text{Ca}^{2+}]$  en el lumen, tanto de la sección *cis* del aparato de Golgi (cGo), como en la sección *trans* del mismo, (tGo).



**Figura R9. Co-localización de las sondas tGoGA y cGoGA con marcadores de cGo y tGo células HeLa.**

Se utilizaron líneas clonales de células HeLa, que expresan de forma estable los sensores tGoGA y cGoGA. (A y C) tGoGA y (B y D) cGoGA. En la parte izquierda se muestra la superposición de la imagen tomada con óptica de contraste interferencial (DIC) en grises, y la fluorescencia verde de la proteína GA en una sección ecuatorial. En la parte derecha se muestra una reconstrucción tridimensional de la fluorescencia de 30-40 secciones en el plano Z. En (C) se muestra, de izquierda a derecha la señal fluorescente de la sonda tGoGA (verde), la señal del anticuerpo anti-TGN46 (anticuerpo secundario, Alexa Fluor 568; en rojo) y la superposición de ambos canales; la coloración amarilla indica la colocalización de las señales verde y roja. En (D) se muestra, de izquierda a derecha la señal de la sonda cGoGA (verde), la señal del anticuerpo anti-GM130 (anticuerpo secundario, Alexa Fluor 568) y la superposición de ambos canales. La marca de calibración corresponde a 10 μm.

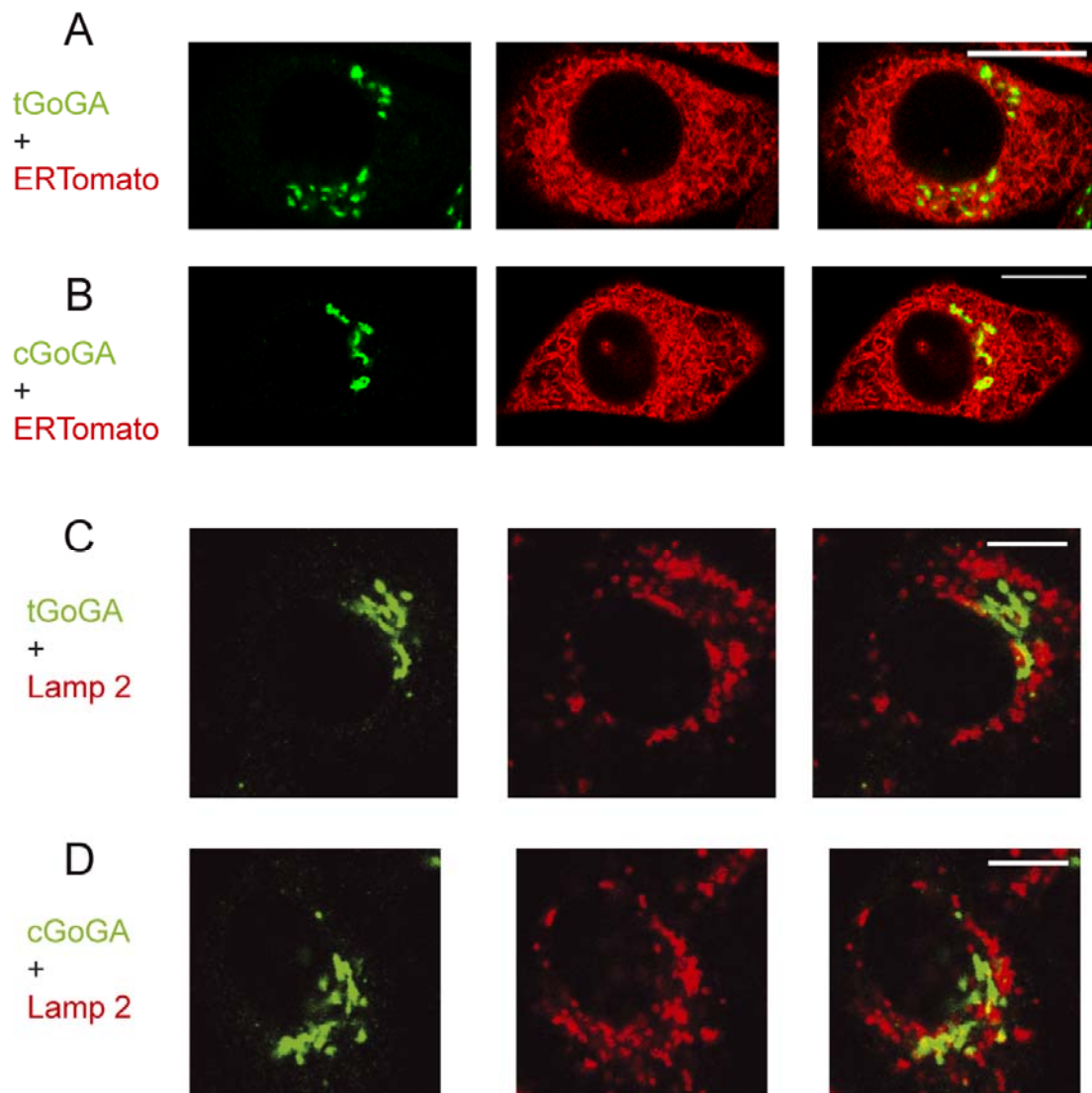
#### 4. RESULTADOS.

---

Decidimos utilizar la variante GA, portadora de la fusión EGFP-Aeq<sup>D119A</sup>, que tiene la ventaja sobre la aequorina no fusionada de poder monitorizar la distribución de la sonda con la señal fluorescente de la EGFP. Además, la variante que utilizamos contiene la aequorina con la mutación D119A (Montero y cols., 1995), que tiene baja afinidad por Ca<sup>2+</sup>, y que habíamos desarrollado previamente para medidas en el RE (Alonso y cols., 1998). La elección de esta variante de GA es debida a que esperábamos que la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>Go</sub> estuviese en el rango  $\mu$ M alto (Pinton y cols., 1998).

Para poder expresar de forma específica las sondas GA en cada región del Golgi utilizamos las secuencias de direccionalidad de dos enzimas localizadas selectivamente en una u otra región, la  $\beta$ -1,6-acetilglucosamiltransferasa, para el cGo; y la  $\beta$ -1,4 N-galactosiltransferasa, para el tGo. En las **figuras R9A y R9B** se muestran algunas imágenes de microscopia confocal representativas de la localización de las sondas. A la izquierda, se ha superpuesto la imagen de la fluorescencia verde de la GA sobre la de transmisión, tomada con óptica de contraste interdiferencial (DIC, también llamado Nomarski), para que pueda apreciarse mejor la localización. En ambos casos, A y B, se observa la morfología característica del aparato de Golgi, con un patrón punteado perinuclear y, en general, asimétrico, con un lado predominante sobre el otro. En la reconstrucción en 3D (**lado derecho de la Fig. R9**), tanto de la sonda tGoGA (**Fig. R9A**) como del cGoGA (**Fig. R9B**), se aprecia la estructura típica del Go, con cisternas apiladas y distribuidas unas a continuación de otras.

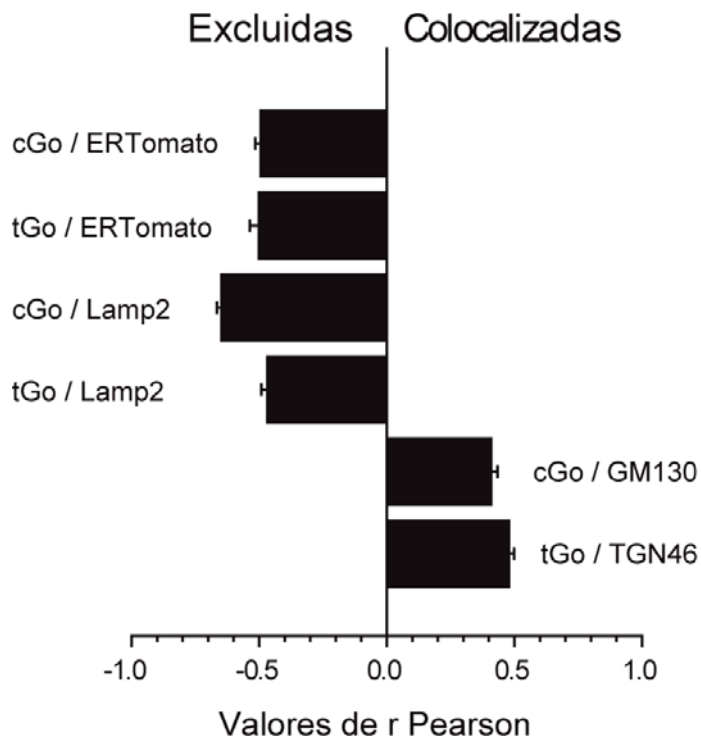
Aunque el patrón de localización de ambas sondas era característico del Go, no apreciábamos, a primera vista, diferencias entre la distribución de las dos sondas *cis*- y *trans*-Golgi, y consideramos pertinente hacer un análisis más detallado usando marcadores específicos para el *cis*- y el *trans*-Golgi y estudiando su colocalización o exclusión con nuestras sondas. Como se puede observar en la **figura R9C**, la sonda tGoGA (en verde) colocaliza con el marcador específico de este compartimento, la proteína de 46 kDa *Trans Golgi network 46* (TGN46, en rojo), apareciendo la imagen de superposición en amarillo. De forma paralela, la sonda tGoGA colocaliza con el marcador específico de cGo, la proteína de 130 kDa *Golgi Matrix 130* (GM130). De nuevo, en la imagen superpuesta aparecen en amarillo las estructuras del Go (**Fig.R9D**). La localización de las sondas cGoGA y tGoGA se comparó también con la de otras estructuras utilizándose marcadores específicos para el RE (ERTomato) (**Figs.R10A y 10B**) o los lisosomas (Lamp2) (**Figs. R10C y 10D**).



**Figura R10. Exclusión de las sondas tGoGA y cGoGA con los marcadores de RE (ERTomato) y lisosomas (Lamp2).**

La correspondencia de las señales verde y roja de cada fila se muestra a la izquierda. Otros detalles como en la **figura 9**. Obsérvese la independencia de ambas señales en todos los casos.

#### 4. RESULTADOS.



**Figura R11. Cuantificación y análisis estadístico de la colocalización y la exclusión de las sondas tGoGA y cGoGA con los marcadores de distintos compartimentos intracelulares.**

La exclusión y la colocalización de cGoGA y tGoGA con los marcadores ERTomato, Lamp2, GM130 y TGN46, se expresa como medias  $\pm$  eem ( $n = 25$ ), del índice de correlación de (r) de Pearson. La colocalización de cGoGA y tGoGA con sus correspondientes marcadores es muy significativa, así como la exclusión de los marcadores del RE y lisosomales (en todos los casos  $p < 0.0001$ ).

Como se observa en la imagen superpuesta, se distinguen los dos colores primarios, verde y rojo, lo que indica que no hubo solapamiento de ninguna de las dos sondas con ninguno de estos marcadores. La **figura R11** muestra la cuantificación y el análisis estadístico de las colocalizaciones. Como puede apreciarse, la colocalización de cGoGA y tGoGA con sus correspondientes marcadores, cuantificada como valores del índice de correlación (r) de Pearson, es positiva y muy significativa ( $P < 0,0001$ ); la exclusión de los marcadores del RE y lisosomales (coeficientes de Pearson negativos) es también significativa ( $P < 0,0001$ ). La **Tabla 9** muestra un resumen de los datos numéricos de colocalización de varios marcadores, con determinaciones de la r de Pearson en reconstrucciones bi- y tri-dimensionales. Los valores obtenidos confirman la correcta localización de las sondas con direccionalidad a cGo y tGo. Se incluye un control negativo mostrando la correlación negativa de los marcadores de *cis* y *trans* Golgi (GM130 vs TGN46).

**Tabla 9. Co-localización y exclusión de *cis* y *trans* GA con marcadores de otros orgánulos.** Se muestran los valores de *r* Pearson (media  $\pm$  dem) en secciones 2D confocales y o reconstrucciones de volumen 3D. Se muestran los valores de *P* (*t* de Student de dos colas) para la comparación de la media de cada combinación de marcadores con respecto a 0 (sin correlación) asumiendo una distribución normal.

Marcadores	Dimensión	n	r de Pearson	P (t-test)
<b>Reticulo endoplásmico</b>				
cGoGA vs ERTomato	2D	25	-0,49 $\pm$ 0,21	< 0,0001
cGoGA vs ERTomato	3D	5	-0,39 $\pm$ 0,05	< 0,0003
tGoGA vs ERTomato	2D	25	-0,50 $\pm$ 0,13	< 0,0001
cGoGA vs ERTomato	3D	5	-0,35 $\pm$ 0,05	< 0,001
<b>Lisosomas</b>				
cGoGA vs Lamp2	2D	25	-0,65 $\pm$ 0,02	< 0,0001
cGoGA vs Lamp2	3D	5	-0,57 $\pm$ 0,02	< 0,001
tGoGA vs Lamp2	2D	25	-0,47 $\pm$ 0,02	< 0,0001
tGoGA vs Lamp2	3D	5	-0,51 $\pm$ 0,02	< 0,0001
<b>Aparato de Golgi</b>				
GM130 vs TGN46	3D	5	-0,43 $\pm$ 0,05	< 0,0005
tGoGA vs GM130	3D	5	-0,18 $\pm$ 0,02	< 0,005
tGoGA vs TGN46	3D	5	+0,27 $\pm$ 0,02	< 0,0001
tGoGA vs TGN46	2D	25	+0,48 $\pm$ 0,02	< 0,0001
cGoGA vs GM130	3D	5	+0,28 $\pm$ 0,03	< 0,0001
cGoGA vs GM130	2D	25	+0,41 $\pm$ 0,03	< 0,0001
cGoGA vs TGN46	3D	5	-0,17 $\pm$ 0,04	< 0,02

#### 4.6 Las sondas cGoGA y tGoGA son funcionales.

Una vez demostrada la correcta localización de las sondas de  $\text{Ca}^{2+}$  dirigidas al Go, analizamos su funcionalidad. Para ello se utilizaron las líneas de HeLa que expresan de forma estable erGA, cGoGA y tGoGA, desarrolladas en este trabajo (ver «Materiales y Métodos»). Los tres tipos celulares se reconstituyeron con celenterazina n en medio sin  $\text{Ca}^{2+}$  según se detalla en la sección de «Materiales y Métodos». Como se muestra en la **figura R12**, la posterior adición de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (1 mM) produjo un incremento progresivo de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$  durante unos 2 minutos hasta alcanzar un nivel estable en los tres depósitos. En la **figura R12A** puede compararse la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE, cGo y tGo. La concentración de  $[\text{Ca}^{2+}]$  alcanzada en el estado estacionario en el interior del RE es mayor que la del Go. Los promedios ( $\pm$  eem de 3 experimentos similares) fueron:  $686 \pm 15 \mu\text{M}$  en el RE comparado con  $219 \pm 9 \mu\text{M}$  en el cGo y  $289 \pm 18 \mu\text{M}$ , en el tGo. Las velocidades iniciales también fueron consistentemente mayores en el RE ( $553 \pm$

#### **4. RESULTADOS.**

---

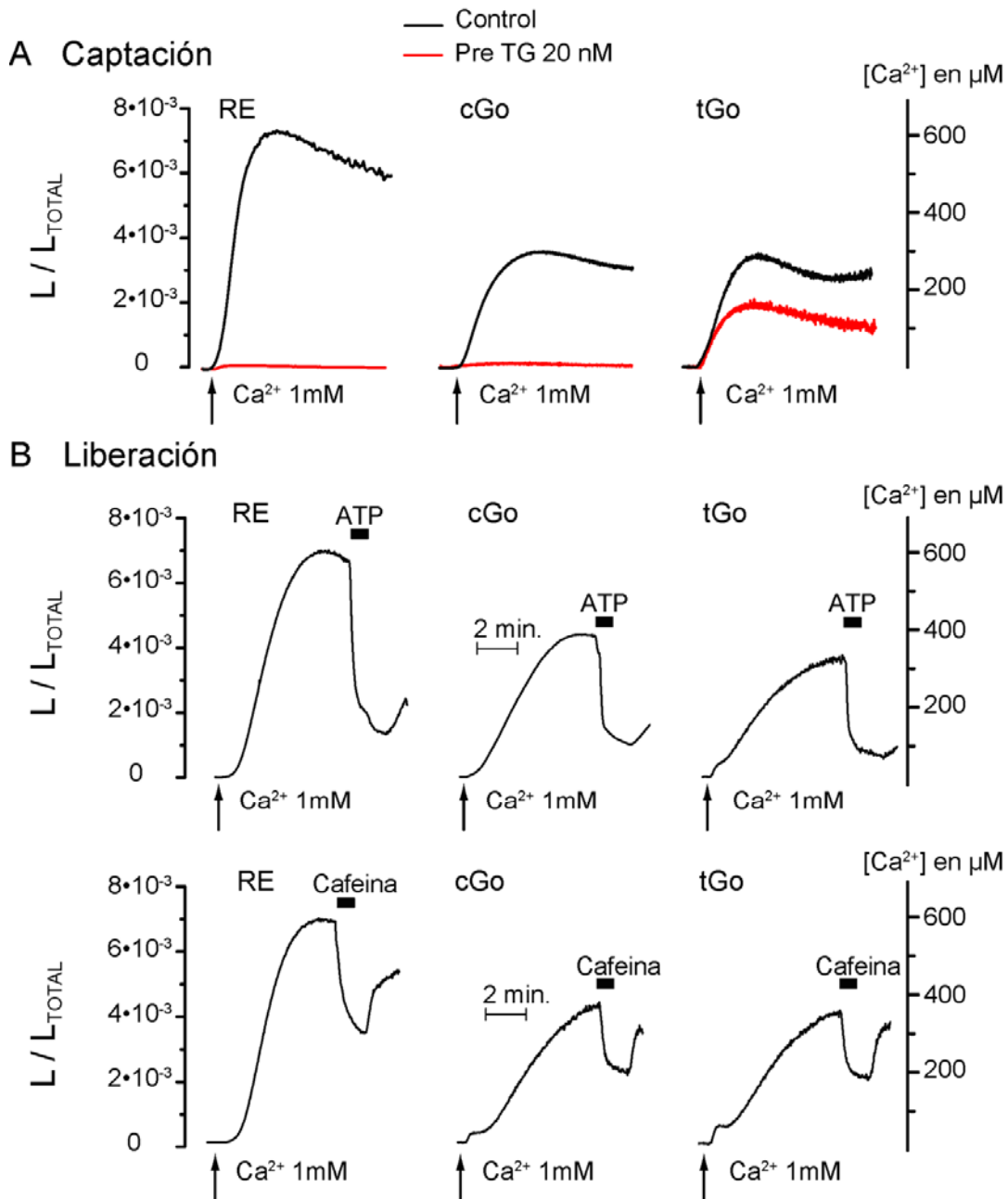
107  $\mu\text{M}/\text{min}$ ) que en los compartimentos del aparato de Golgi ( $220 \pm 15$  en cGo y  $193 \pm 43$   $\mu\text{M}/\text{min}$  en tGo)

A continuación, exploramos la sensibilidad al inhibidor irreversible de la SERCA, tapsigargina (Tg), que se usó a 20 nM, una concentración más que suficiente para inhibir completamente la SERCA (Thastrup y cols., 1989; Vangheluwe y cols., 2009). Sorprendentemente, la sensibilidad a Tg 20 nM fue muy diferente en los distintos depósitos (**Fig. R12A**). La captación fue prácticamente abolida en el RE y en el cGo; alcanzándose valores tan bajos como (media  $\pm$  eem;  $n = 3$ )  $4,0 \pm 0,3$   $\mu\text{M}$  y  $15 \pm 1$   $\mu\text{M}$ ; respectivamente. Por el contrario, en el tGo la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  fue solo parcialmente inhibida, alcanzándose valores de  $[\text{Ca}^{2+}]$  bastante más altos, de  $119 \pm 25$   $\mu\text{M}$ .

A continuación, estudiamos la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por dos agonistas: i) el ATP, que mediante la producción de  $\text{IP}_3$  activa los  $\text{IP}_3\text{Rs}$ ; y ii) la cafeína, que activa los RyRs (**Fig. R12B**). Los tres compartimentos respondieron liberando el  $\text{Ca}^{2+}$  que contienen al estimular las células, tanto con ATP como con cafeína, aunque la sensibilidad al primer estímulo fue mayor que al segundo. Los datos de % de liberación obtenidos fueron los siguientes: ATP, del 77 al 83 % (media  $\pm$  eem;  $n = 3$ ) de:  $78, \pm 14$  % en el RE;  $78 \pm 21$  % en el cGo y;  $83 \pm 6$  %. En el caso de la cafeína los porcentajes de liberación fueron menores, del 48 al 51%:  $51 \pm 11$  % en el RE;  $49 \pm 8$  % en el cGo y;  $49 \pm 13$  % en tGo. En el panel C se resumen y comparan las liberaciones por los distintos estímulos. Las acciones fueron muy similares en los tres depósitos.

En las células tratadas con digitonina, se permeabiliza la membrana plasmática, pero la sonda GA se mantiene dentro de los orgánulos intracelulares. Esta preparación ofrece unas condiciones excelentes para estudiar el efecto de los mensajeros intracelulares, ya que sus receptores son ahora accesibles desde el medio de incubación. En los experimentos que se resumen en la **figura R13** se estudió directamente el efecto de tres conocidos mensajeros intracelulares, que liberan  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares, el  $\text{IP}_3$ , la ADP ribosa cíclica (cADPR) y el ácido nicotínico-adenin dinucleótido fosfato (NAADP) (Cancela y cols., 2000). En los experimentos de la **figura R13** se compararon sus efectos sobre los tres depósitos intracelulares estudiados aquí, RE, cGo y tGo.

Este abordaje experimental tiene tres ventajas sobre los experimentos en células intactas: i) permite estudiar de forma directa la cinética de captación en los depósitos fijando la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  del medio (equivalente en estas condiciones a la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$ ) a una similar a la que se encuentra en el medio intracelular durante el reposo ( $[\text{Ca}^{2+}]_c = 100$  nM);

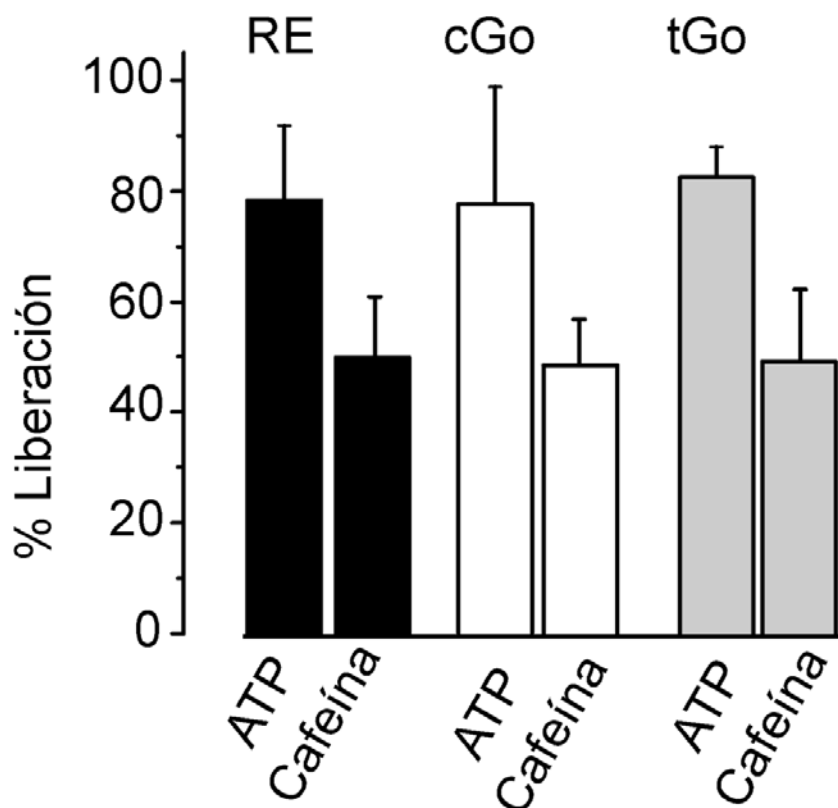


**Figura R12. Comparación de la captación de Ca<sup>2+</sup> de los depósitos intracelulares del RE, cGo y tGo en las células HeLa.**

Las mediciones de la captación de Ca<sup>2+</sup> se realizaron en los clones estables de HeLa, que expresan las sondas GFP-aequorinas (GA) dirigidas al RE, al cGo y al tGo. Las células se reconstituyeron con celenterazina n (1 μM) en medio sin Ca<sup>2+</sup> y en presencia de TBH (10 μM). En el momento indicado por la flecha se inició la perfusión con medio extracelular que contenía Ca<sup>2+</sup> (1 mM). Los valores se representan como L / L<sub>TOTAL</sub> (izquierda) y calibrados como [Ca<sup>2+</sup>] en μM (derecha). Cada trazo representativo de 3-6 experimentos similares. En el caso (A) se compara la captación en células controles y pretratadas con tapsigargina (Tg) 20 nM por 10-20 min antes de la adición del Ca<sup>2+</sup> 1 mM. En (B) el efecto de los agonistas ATP y cafeína. El panel (C) se reproduce en la página siguiente.



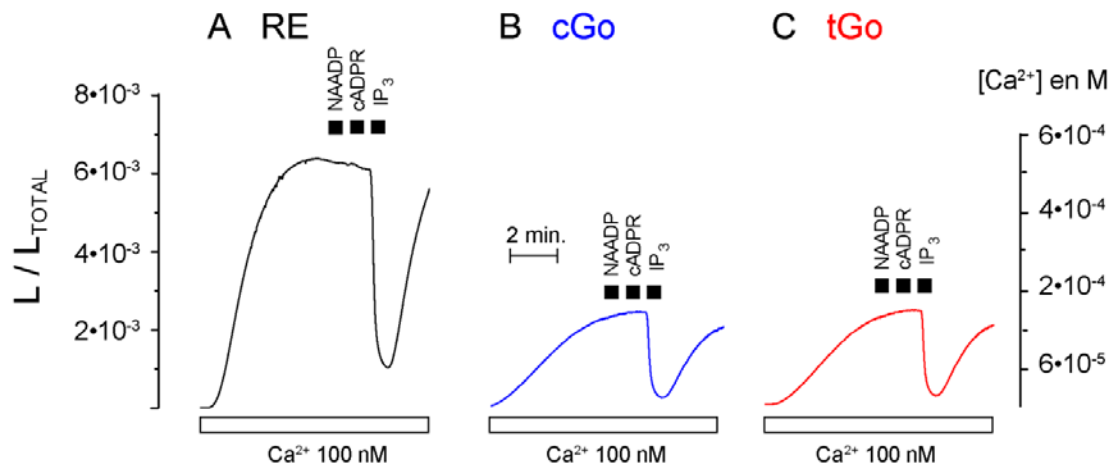
## C Medias de liberación



**Figura R12C. Comparación de la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares del RE, cGo y tGo en las células HeLa.**

Los paneles A y B se han explicado en la página anterior. Panel (C): Liberación inducida por ATP y cafeína. Valores promedio ( $\pm$  eem) de 3-6 experimentos similares.

ii) permite estudiar la capacidad de liberación de los diferentes mensajeros intracelulares, simplemente añadiéndolos a este medio y; iii) excluye las barreras y otras distorsiones que podría crear la membrana plasmática. Se utilizaron las líneas celulares que expresaban erGA (A), cGoGA (B) o tGoGA (C), respectivamente, lo que permitía medir selectivamente  $[\text{Ca}^{2+}]$  en estos tres compartimentos, siendo las condiciones exactamente las mismas en los tres casos. Tras 5 minutos de incubación para permitir la acumulación del  $\text{Ca}^{2+}$  en el depósito intracelular, se aplicaron los diferentes estímulos durante 30 s, como se muestra en la **figura R13**. Durante la incubación con el tampón de  $\text{Ca}^{2+}$  100 nM se alcanzó un máximo de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ , que corresponde al estado estacionario (concentración intracelular constante con iguales flujos de entrada y salida), en los tres casos. Los niveles obtenidos fueron diferentes, alcanzándose mayor



**Figura R13. Comparación de la cinética de captación de  $\text{Ca}^{2+}$  en células permeabilizadas y de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  por los mensajeros intracelulares,  $\text{IP}_3$ , NAADP y cADPR**

Las mediciones de la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  se realizaron en células HeLa en RE (A), cGo (B) y tGo (C). Las células se reconstituyeron con celenterazina  $n$  por 60 min en un medio sin  $\text{Ca}^{2+}$  y conteniendo 200 nM de ionomicina. Véase «Materiales y Métodos» para detalles. Posteriormente, las células se suspendieron en un medio similar al intracelular (medio interno estándar) y se permeabilizaron con digitonina 60  $\mu\text{M}$  durante 1 min. A continuación se rellenaron los depósitos con una solución intracelular (tamponada con EGTA) a una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  100 nM. En el momento de la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  se inician los trazados que se ven en la figura. En el instante que se indica en la figura las células se perfundieron con la misma solución conteniendo los agonistas NAADP (100 nM), cADPr (100 nM) o  $\text{IP}_3$  (10 nM). Los valores de captación se representan como  $L / L_{\text{TOTAL}}$ . Los valores calibrados en  $[\text{Ca}^{2+}]$  se muestran a la derecha. Se presenta un trazo representativo de varios experimentos similares. Los valores promedio de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  en el equilibrio de varios experimentos fueron (en  $\mu\text{M}$ ; media  $\pm$  eem;  $n = 3$ ): son  $454 \pm 6$  en el RE,  $156 \pm 15$  en el cGo y  $135 \pm 6$  en el tGo. Las velocidades iniciales fueron (en  $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ ; media  $\pm$  eem;  $n = 3$ ):  $129 \pm 6$  en el RE,  $14 \pm 8$  en el cGo y  $64 \pm 5$  en el tGo. El  $\text{IP}_3$  produjo una liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  casi completa en todos los casos (media  $\pm$  eem;  $n = 3$ ),  $87 \pm 6\%$  en RE,  $92 \pm 1\%$  en cGo y  $74 \pm 7\%$  en tGo, mientras que ni cADPR y NAADP provocaron liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ .

concentración en el RE que en el Go, como se había visto también en las células intactas (**Fig. R12**). En 3 experimentos similares, los valores promedio ( $\pm$  eem;  $n = 3$ ), en  $\mu\text{M}$ , fueron:  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ ,  $454 \pm 6$ ;  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{GO}}$ ,  $135 \pm 6$  en el tGo y;  $156 \pm 15$  en el cGo. Los resultados son de nuevo coherentes con los de las células intactas (**Fig. R12**). Estos resultados sugieren que la relación entre el bombeo y la salida pasiva del orgánulo (*leak*) es mayor en RE que en el Go, lo que permite una mayor acumulación. Otro parámetro que permite comparar el comportamiento de estos tres depósitos es la velocidad inicial de captación de  $\text{Ca}^{2+}$ , que fue mayor en el RE ( $129 \pm 6 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ ) que en el aparato de Golgi, con valores de  $14 \pm 8 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$  para el cGo y de  $64 \pm 5 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$  para el tGo.

Los mensajeros intracelulares se añadieron tras 5 min de incubación con el tampón de  $\text{Ca}^{2+}$  (100 nM), una vez alcanzado el estado estacionario (**Fig. R13**). Ni el NAADP ni la cADPR tuvieron el menor efecto en ninguno de los tres depósitos. Por el contrario, el  $\text{IP}_3$  produjo una gran liberación en los tres casos.

#### **4. RESULTADOS.**

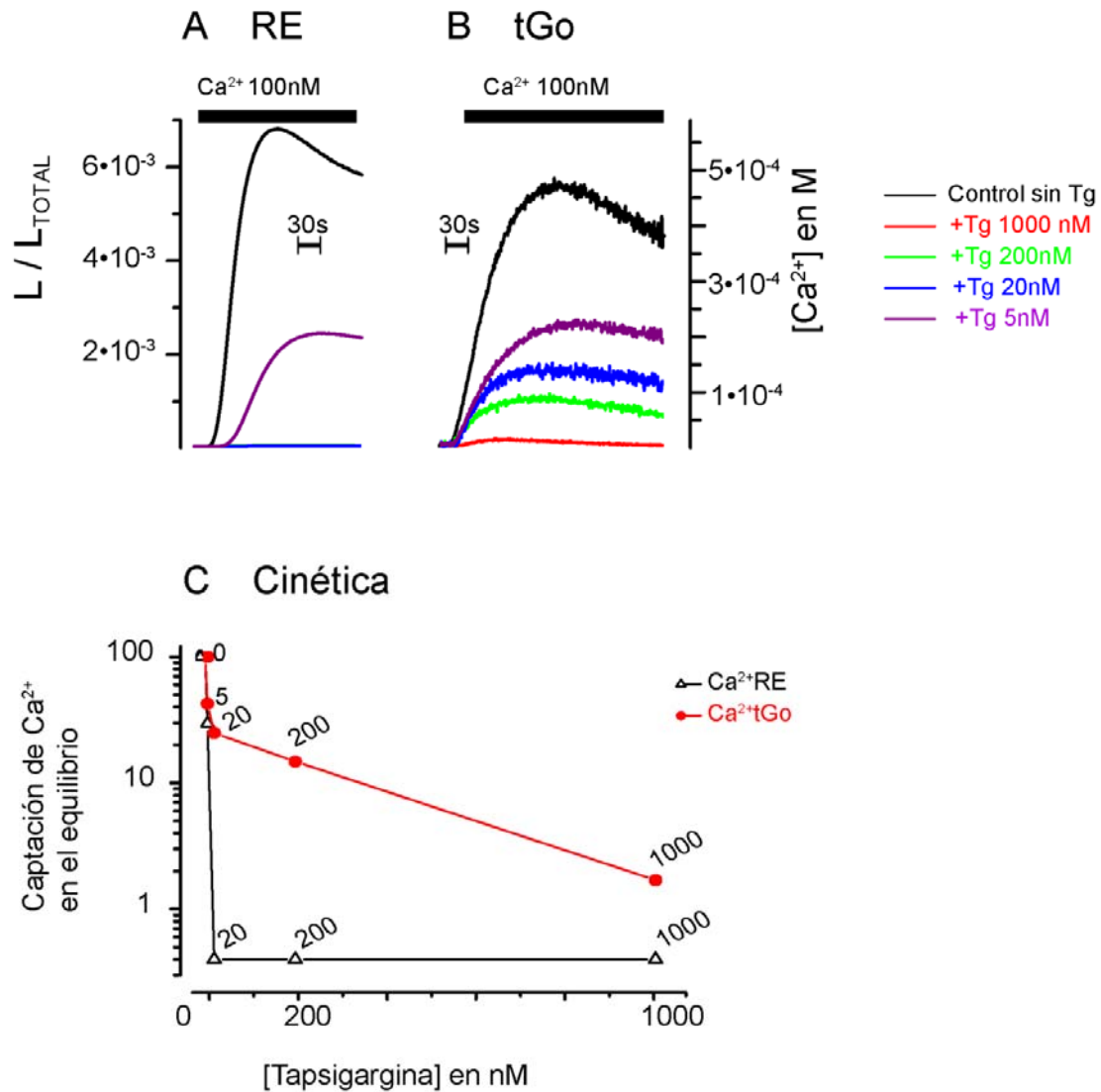
---

Los valores obtenidos en 3 experimentos similares fueron (expresados como % de liberación, referida al nivel alcanzado en el estado estacionario (media  $\pm$  eem; n = 3): RE,  $84 \pm 4$  %; cGo,  $90 \pm 1$  % y tGo,  $90 \pm 1$  %.

#### **4.7 El tGo contiene un compartimento resistente a tpsigargina (Tg).**

Como ya se mostró en la **figura R12A**, el tGo contiene un subcompartimento resistente a la Tg (usada a 20 nM). Para obtener más detalles, realizamos primero una cinética de la inhibición de la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  por RE y tGo a distintas concentraciones de Tg, desde 5 nM a 1000 nM. Para aprovechar las ventajas que se describieron anteriormente, estos experimentos se llevaron a cabo en células permeabilizadas con digitonina y perfundidas con un medio de composición similar al intracelular y con una  $[\text{Ca}^{2+}]$  de 100 nM. Como se puede observar en la **figura R14**, a una concentración de 20 nM la Tg inhibe más del 99 % la captación del RE, mientras que en el tGo hay un 20-30 % que es resistente a esta concentración de Tg. Por otra parte, aumentando 50 veces la concentración de Tg (hasta 1  $\mu\text{M}$ ) se logró una inhibición prácticamente total de la captación en el tGo ( $> 98$  %; **Fig. 12A**, nótese la escala logarítmica). Estos resultados demuestran que la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  por el tGo está compuesta por dos componentes que difieren en su sensibilidad a la Tg; el más sensible, similar al RE, se bloquea completamente a 20 nM, mientras que el segundo requiere concentraciones mucho mayores ( $K_{50}$  de aproximadamente 300 nM; **Fig. R14C**).

Como ya se ha comentado anteriormente, el análisis cuidadoso del consumo de aequorina nos permite estimar el tamaño relativo del compartimento donde está sucediendo la reacción. Cuando utilizamos células permeabilizadas, podemos simular la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  a voluntad, perfundiendo las células con soluciones tamponadas de  $\text{Ca}^{2+}$  con concentraciones conocidas de este catión. Como hemos visto antes, la incubación con 100 nM de  $\text{Ca}^{2+}$  permitió el relleno de los depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares en 2-3 minutos. Una vez se ha alcanzado el estado estacionario, la velocidad de consumo de la aequorina, expresada como fracción de la aequorina presente en ese momento, debe mantenerse constante mientras no cambie la  $[\text{Ca}^{2+}]$  en la matriz del orgánulo estudiado; es decir, la disminución de aequorina debe ajustarse a una exponencial simple. Esto significa que, si se representa la aequorina remanente en escala logarítmica, la disminución con el tiempo debe ajustarse a una línea recta. En los experimentos



**Figura R14. Efecto de diferentes concentraciones de tapsigargina (Tg) sobre la captación de  $Ca^{2+}$  en RE y tGo en las células HeLa.**

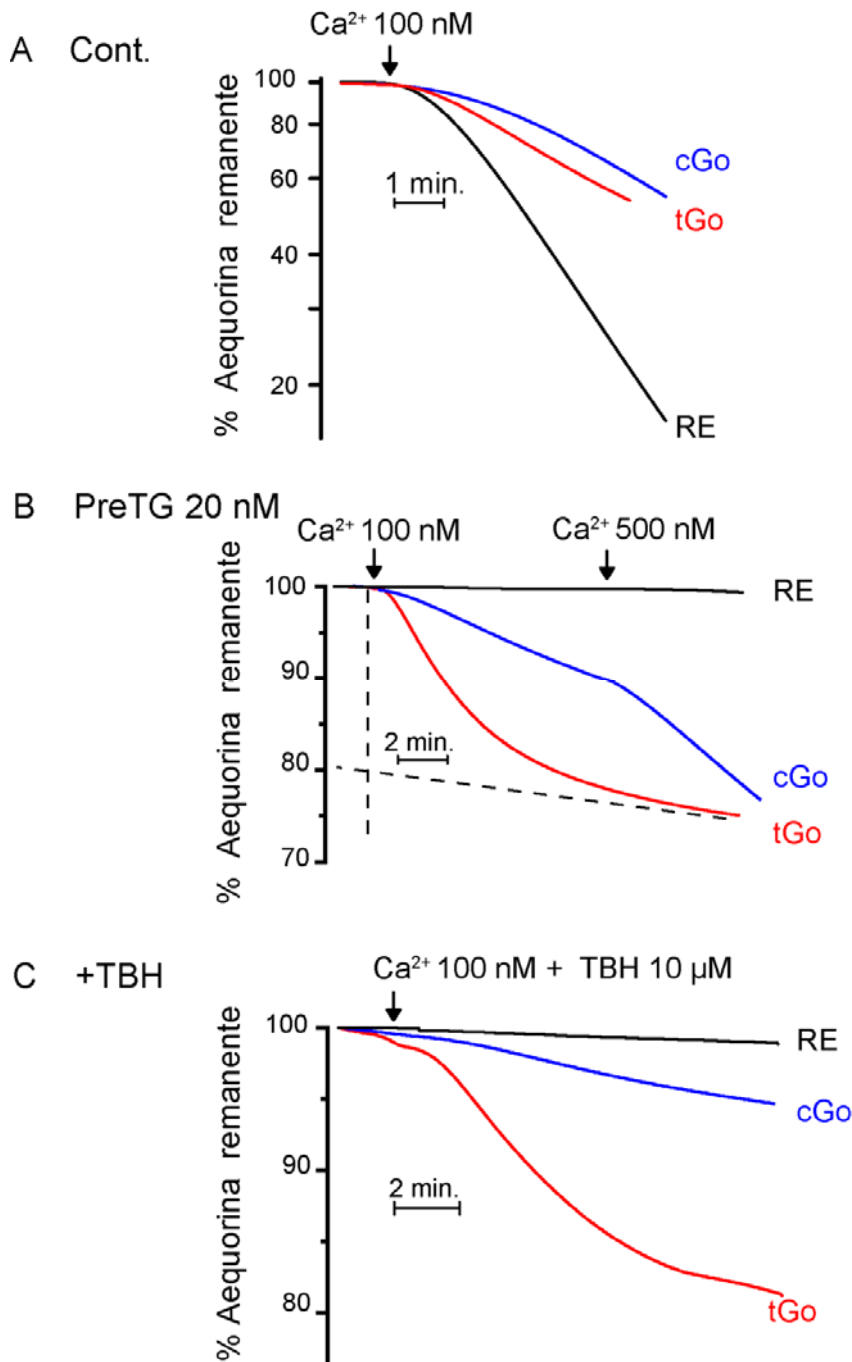
Comparación de la captación del  $Ca^{2+}$  tras el pretratamiento con distintas concentraciones de Tg durante 10-20 min antes de la medida de captación de  $Ca^{2+}$ . Código de los trazos: negro (Control), violeta (+Tg 5 nM), azul (+Tg 20 nM), verde (Tg +200 nM) y rojo (Tg +100 nM) en células HeLa. Se compara el efecto en RE (A) y tGo (B). En (A) los datos a 20, 200 y 1000 nM están superpuestos. Las células se reconstituyeron con celenterazina n  $1 \mu M$  en un medio sin  $Ca^{2+}$  con EGTA 0,5 mM y ionomicina 200 nM durante 1 h. Posteriormente, las células se permeabilizaron con digitonina  $60 \mu M$  durante 1 min en un medio similar al intracelular, que contenía: KCl, 140 mM;  $KH_2PO_4$ , 1 mM; Succinato sódico, 2 mM; Piruvato sódico, 2 mM;  $MgCl_2$ , 1 mM; Mg-ATP, 1 mM; HEPES-Na 20 mM y; EGTA-Na, 0,5 mM, pH = 7.0. A continuación se incubó un medio de la misma composición, excepto que el EGTA se substituyó por una mezcla tamponada de EGTA y  $Ca^{2+}$  que da una concentración de  $Ca^{2+}$  libre de 100 nM. Los valores se representan como  $L/L_{TOTAL}$ . Los valores calibrados en  $[Ca^{2+}]$  se muestran a la derecha. Cada trazo representa un resultado de 3 o más registros individuales. En (C) se representa la cinética de de la inhibición. Nótese que la escala de ordenadas es logarítmica. Los códigos de colores son: RE, triángulo y trazo negro; tGo con círculo y trazo rojo.

#### **4. RESULTADOS.**

---

que se resumen en la **figura R15** se estudió el comportamiento de la aequorina de los tres depósitos, RE, cGo y tGo, en tres situaciones experimentales: control (A), pretratadas con Tg 20 nM (B) y, en presencia de TBH 10  $\mu$ M durante el rellenado con  $\text{Ca}^{2+}$  (C). Efectivamente, cuando analizamos el comportamiento de la aequorina en el RE se observa, tras un pequeño retraso necesario para que se alcance una concentración estable en su interior, una línea recta en la representación semilogarítmica, (**Fig. R15A**). La pendiente de esta línea es la constante de primer orden que define la velocidad de consumo y de ella puede también calcularse fácilmente el  $t_{1/2}$ , el tiempo necesario para que la aequorina remanente disminuya a la mitad. Así, el  $t_{1/2}$  es de 1.8 min en el RE y se mantiene lineal hasta un consumo superior al 80 % (**Fig. R15A**). El consumo en cGo y tGo fue más lento ( $t_{1/2} = 2,6$  min en el tGo y 2,9 min en el cGo), demasiado lento como para obtener resultados suficientemente precisos acerca de la linealidad del consumo con este abordaje experimental. Por este motivo decidimos estudiar separadamente los componentes sensibles e insensibles a Tg.

Como se había mostrado anteriormente, en células intactas el tratamiento con Tg 20 nM inhibió completamente la captación en el RE, mientras que en el tGo se puede apreciar aún una considerable entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Coherente con estos resultados, en la **figura R15B** se puede distinguir que, en presencia de Tg 20 nM, el consumo de la aequorina en el RE es prácticamente nulo; mientras que, en el tGo es mucho más rápido. El consumo, sin embargo, no afecta al 100 % de la aequorina, sino que, una vez consumido el 20-30 %, la velocidad de consumo cae prácticamente a 0 (observar extrapolaciones en trazos discontinuos en la **Fig. R15B**). La captación en cGo está muy inhibida por el tratamiento con Tg, aunque puede apreciarse algún consumo residual próximo al 10 % del total de la aequorina. Estos resultados indican que la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  resistente a Tg sucede exclusivamente en una fracción del tGo que supone un 20-30 % del espacio total ocupado por la aequorina. El 70-80 % de la aequorina restante estaría contenida en un compartimento del tGo no conectado con el anterior y que sería sensible a Tg. Para terminar el experimento de la **figura R15B**, 5 min después de añadir el  $[\text{Ca}^{2+}]_C$  100 nM se aumentó la  $[\text{Ca}^{2+}]_C$  5 veces (a 500 nM). La captación en el tGo no pareció modificarse en absoluto. Por el contrario, la captación en el cGo aumentó substancialmente lo que indicaría un aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]_C$  dentro del compartimento. En la **figura R15C** se muestra un experimento similar al del panel B, pero utilizando TBH en lugar de Tg para inhibir la SERCA. Los resultados fueron muy similares a los del panel B: la captación en el RE fue completamente bloqueada; y una fracción cercana al 20 % del tGo se rellenó en presencia del inhibidor de SERCA. En el cGo el consumo residual fue muy lento.



**Figura R15. Comparación del consumo de aequorina al rellenar de  $\text{Ca}^{2+}$  los depósitos RE, cGo y tGo en células HeLa.**

Las células RE, cGo y tGo se reconstituyeron con celenterazina n y se permeabilizaron con digitonina 60  $\mu\text{M}$ , como se ha descrito en la leyenda de la **figura R13**; a continuación se lavaron con un medio libre de  $\text{Ca}^{2+}$  y después se incubaron con una solución tamponada de  $\text{Ca}^{2+}$  (100 nM). Se muestran tres situaciones: (A) en la situación control, (B) tratadas 10 min con Tg 20 nM y (C) con TBH 10  $\mu\text{M}$  presente durante el rellenado. En el experimento (B) se aumentó la  $[\text{Ca}^{2+}]$  a 500 nM en el momento que se indica (flecha). Los resultados se expresan como un porcentaje de la aequorina total restante en las células en un momento dado. Nótese la escala logarítmica. Cada trazo es representativo de 3 o más experimentos similares.

#### **4. RESULTADOS.**

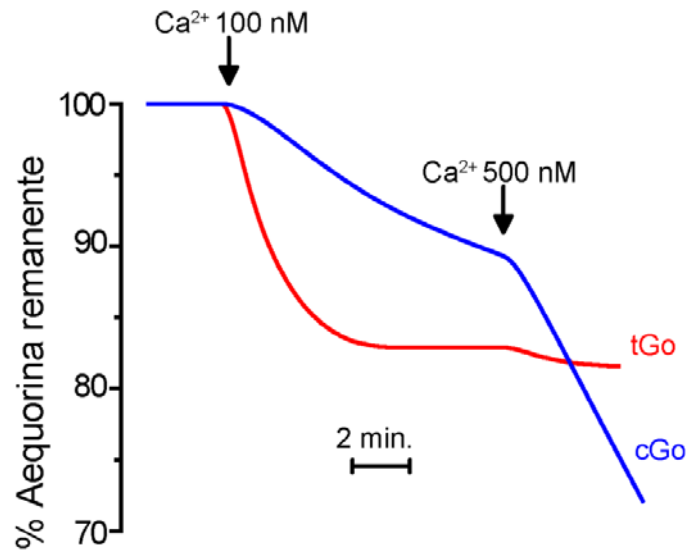
---

Con el objeto de incrementar la sensibilidad de los ensayos de relleno con  $\text{Ca}^{2+}$  destinados a distinguir los distintos compartimentos repetimos los experimentos de la **figura R15**, pero usando celenterazina nativa en lugar de celenterazina n para reconstituir la aequorina (**Fig. R16**). En estas condiciones la afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$  es mucho mayor, detectándose mejor (quizás a veces exageradamente) los rellenos con  $\text{Ca}^{2+}$  de los distintos orgánulos. Como se observa en la **figura R16A**, en el subcompartimento del tGo el consumo de aequorina nuevamente se detiene alrededor del 20 %, para un relleno con  $\text{Ca}^{2+}$  100 nM, mientras que en el cGo el consumo fue lineal y mucho más lento. Además, el incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  a 500 nM aceleró el consumo del cGo, pero no tuvo efecto en tGo. En otro experimento adicional (**Fig. R16B**) incubamos las células que expresan aequorina en el cGo y que se habían tratado con 20 nM de Tg, con 500 nM  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  durante 30 min para así forzar el consumo total de la aequorina en aquel compartimento (**Fig. R16B**). Efectivamente, al final de este periodo de tiempo se había consumido más del 60 % de la aequorina y la velocidad de consumo fue esencialmente constante (lineal en escala logarítmica) durante todo el tiempo de observación, indicando que el  $\text{Ca}^{2+}$  está entrando al total del espacio cGo a través de este mecanismo residual.

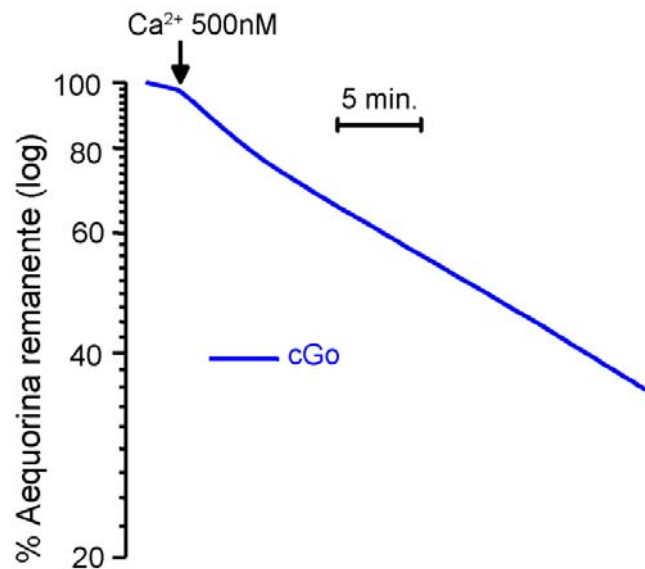
En resumen, nuestros resultados muestran que la Tg 20 nM bloquea casi completamente la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE, el cGo y un 80 % del tGo, mientras que el 20 % restante del tGo es resistente a este tratamiento. Esto indica que el tGo, al contrario de los otros dos orgánulos, acumularía  $\text{Ca}^{2+}$  mediante un mecanismo distinto de la SERCA.

A continuación, realizamos una serie de experimentos para caracterizar en detalle el componente de la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  resistente a la Tg (o, si se quiere, el que no es mediado por la SERCA) en las endomembranas. En concreto, se estimaron los niveles de  $[\text{Ca}^{2+}]$  alcanzados en el estado estacionario, así como las velocidades iniciales de captación en los tres compartimentos RE, tGo y cGo. Se llevó a cabo la inhibición de la SERCA de dos maneras, por pretratamiento con el inhibidor irreversible Tg (Thastrup y cols., 1989) o se estudio el relleno en presencia del inhibidor reversible TBH (Kass y cols., 1989; Moore y cols., 1990). Nuevamente realizamos los experimentos en células permeabilizadas con digitonina. La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  alcanzada en las células tratadas con Tg 20 nM se estimó a partir de la calibración de la aequorina y se muestra en la **figura R17** (nótese la escala logarítmica). Los niveles de  $[\text{Ca}^{2+}]$  en el equilibrio fueron muy diferentes (en  $\mu\text{M}$ ; media  $\pm$  eem; n = 4):  $1,9 \pm 0,2$  en el RE;  $9 \pm 2$  en el cGo; y  $237 \pm 16$  en el tGo (**Fig R17A**).

A Pre. Tg 20 nM; cz. nativa; tGo y cGo



B Pre. Tg 20 nM; cz. nativa; cGo



**Figura R16. Comparación del consumo de aequorina de alta afinidad en el cGo y el tGo en células HeLa al rellenar los depósitos de  $Ca^{2+}$ .**

Las células cGo y tGo se reconstituyeron con celenterazina nativa (que aumenta la afinidad por el  $Ca^{2+}$  y la velocidad de consumo con respecto a la celenterazina n) durante 60 min y se permeabilizaron con digitonina 60  $\mu$ M en un medio interno. Posteriormente, y previo tratamiento con Tg 20 nM, en (A), cGo y tGo, se incubaron con una solución tamponada a una concentración de  $Ca^{2+}$  100 nM, previo tratamiento con Tg 20 nM y cuando se indica (flecha) se aumentó la  $[Ca^{2+}]$  a 500 nM. (B) El consumo de aequorina del cGo durante periodos prolongados. El cGo se perfundió, desde el inicio con una solución tamponada a una concentración de  $Ca^{2+}$  500 nM. Los resultados se expresan como un porcentaje de la aequorina total restante en las células en un momento dado. Nótese escala logarítmica. Trazado representativo de 3 experimentos.



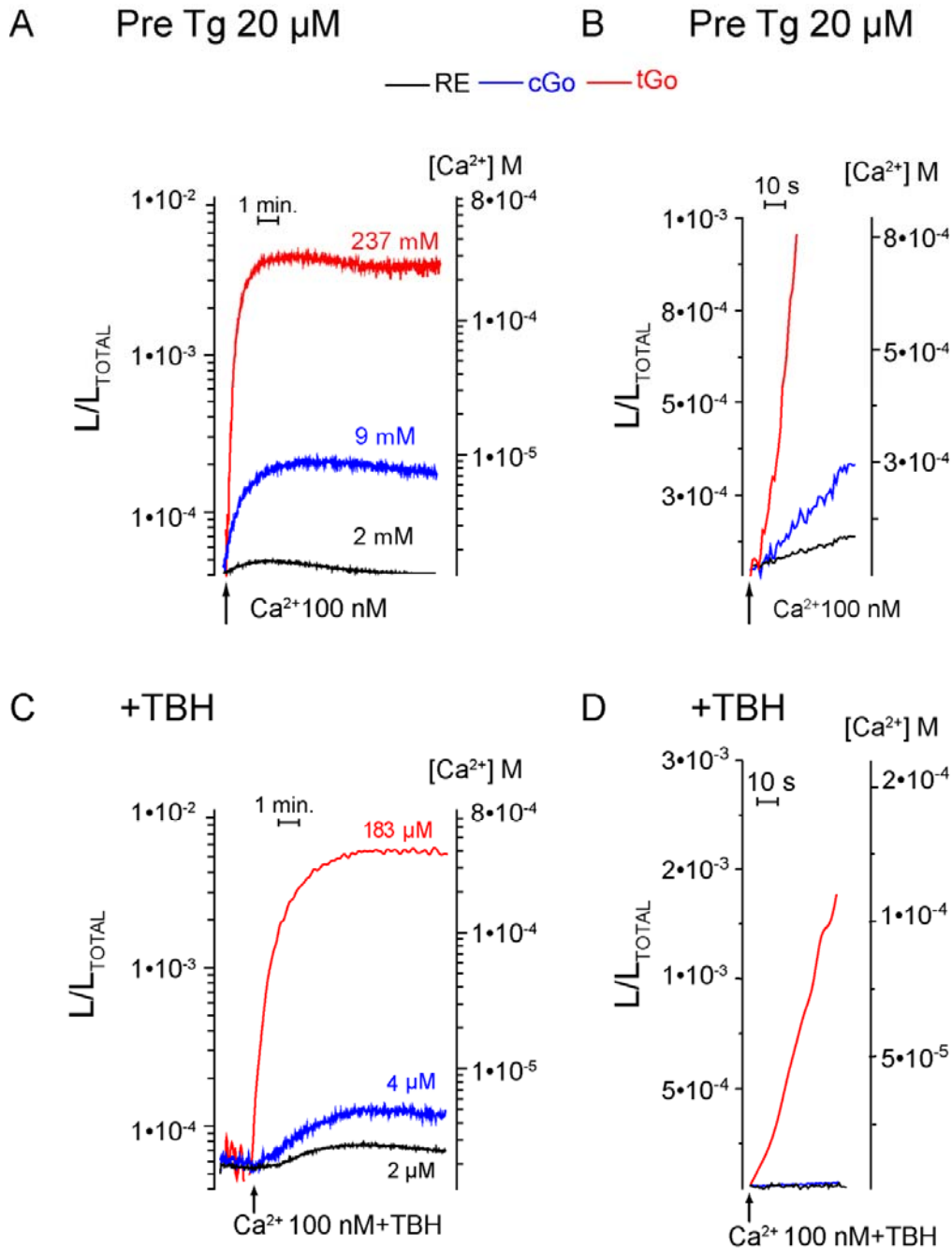
#### **4. RESULTADOS.**

---

Las velocidades iniciales de captación fueron también muy diferentes en los distintos compartimentos (en  $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ ; media  $\pm$  eem; n = 4):  $0,3 \pm 0,1$  para el RE,  $3,3 \pm 0,2$  para el cGo y  $19 \pm 2$  para el tGo (**Fig. R17B**). En experimentos realizados utilizando la celenterazina nativa en lugar de la n (no mostrados), los valores de  $[\text{Ca}^{2+}]$  en el equilibrio fueron los siguientes (en  $\mu\text{M}$ ; media  $\pm$  eem; n = 3):  $2,8 \pm 0,7$  en el RE,  $4,4 \pm 0,3$  en cGo y  $78 \pm 5$  en tGo. La velocidad inicial de recaptación fue también muy diferente (en  $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ ; media  $\pm$  eem; n = 3):  $1,2 \pm 0,4$  en el RE;  $2,8 \pm 0,8$  en el cGo y  $63 \pm 5$  en el tGo (resultados no mostrados).

Los resultados obtenidos con el tratamiento con TBH  $10 \mu\text{M}$  fueron muy similares a los obtenidos con Tg  $20 \text{ nM}$  y se muestran en las **figuras R17C y R17D**. La  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{GO}}$  en el equilibrio en el tGo fue  $187 \pm 7 \mu\text{M}$  (media  $\pm$  eem; n = 3), mucho mayor que en el cGo,  $2,9 \pm 0,1 \mu\text{M}$  y que en el RE,  $1,9 \pm 0,1 \mu\text{M}$  (**Fig. R17C**). La velocidad inicial de recaptación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el tGo fue de  $103 \pm 1 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$  también mucho mayor que en cGo  $0,6 \pm 0,1 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$  y que en el RE  $0,14 \pm 0,08 \pm 1 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$  (**Fig. R17D**).

Todos los experimentos descritos hasta ahora se centran en el componente del transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  resistente a Tg  $20 \text{ nM}$ . Desafortunadamente, no hemos encontrado ningún inhibidor específico del componente resistente a Tg, por lo que no hemos podido aislar y estudiar independientemente la contribución del otro componente, el dependiente de SERCA (el sensible a Tg). Sin embargo, aprovechando las ventajas del consumo de la aequorina en medio con  $\text{Ca}^{2+}$  y de la reversibilidad del inhibidor de la SERCA, TBH; diseñamos un protocolo para medir selectivamente el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en el espacio del tGo dependiente de SERCA. Para este propósito la células se permeabilizaron y se incubaron durante 10 min en un medio intracelular con  $100 \text{ nM}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $10 \mu\text{M}$  de TBH. Durante este periodo el  $\text{Ca}^{2+}$  es captado solamente en el subcompartimento del tGo resistente a la Tg (y a TBH), y toda la aequorina contenida en este subcompartimento es consumida. Posteriormente, se lava la TBH y se puede estudiar íntegramente el componente sensible a TBH ya que en este subcompartimento es el único en el que se ha preservado la aequorina y está libre de la contaminación del otro subcompartimento, donde se ha consumido completamente. Realizamos esta maniobra en el cGo y en el tGo y los resultados obtenidos, muy diferentes, se ilustran en la **figura R18**. La incubación con  $\text{Ca}^{2+}$   $100 \text{ nM}$  durante 10 minutos produjo un consumo del 25 % de la aequorina de tGo (**Fig. R18A**) durante los primeros 5 minutos, reduciéndose entonces el consumo, lo que indicaba que ya se había consumido toda la aequorina de ese compartimento.



**Figura R17. Captación de  $\text{Ca}^{2+}$  por RE, cGo y tGo en células tratadas con tapsigargina (A y B) o con TBH (C y D).**

Las células RE, cGo y tGo, se reconstituyeron con celenterazina n y se permeabilizaron con digitonina  $60 \mu\text{M}$  en un medio intracelular, posteriormente se lavaron con un medio libre de  $\text{Ca}^{2+}$  y después se incubaron con una solución tamponada de  $\text{Ca}^{2+}$   $100 \text{ nM}$ . En (A) células tratadas con Tg  $20 \text{ nM}$  durante  $10 \text{ min}$ . En (C) células tratadas con TBH  $10 \mu\text{M}$  durante el rellenado. En las graficas (B) y (D) se ha expandido la escala temporal de A y C para mostrar mejor las velocidades iniciales. Los valores se representan como  $L / L_{\text{TOTAL}}$ . Los valores calibrados en  $[\text{Ca}^{2+}]$  se muestran a la derecha.

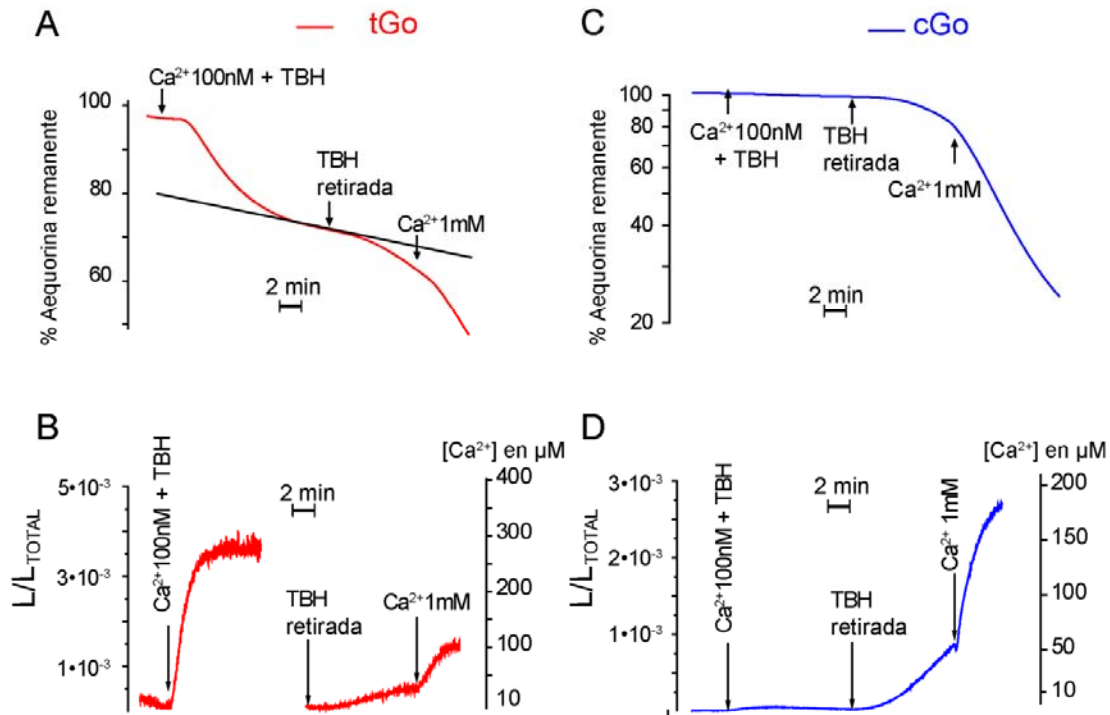
#### **4. RESULTADOS.**

---

Esto corresponde a una captación de  $\text{Ca}^{2+}$  muy rápida con una  $V_0$  cercana a 150  $\mu\text{M}/\text{min}$  y una concentración en el equilibrio de unos 300  $\mu\text{M}$  en los 2-3 primeros minutos (**Fig. R18B**). Tras unos minutos (minutos 11-13), el consumo se hizo muy lento, pero el lavado de la TBH en ese momento desencadenó un aumento en la tasa de consumo de la aequorina remanente (**Fig. R18A**), que corresponde a una lenta captación de  $\text{Ca}^{2+}$  (4-7  $\mu\text{M}/\text{min}$ ; **Fig. R18B**) en este subcompartimento sensible a TBH (alrededor del 75 % de la aequorina total del tGo). Después de 5-8 minutos de incubación se alcanzó una concentración en el equilibrio de unos 40  $\mu\text{M}$  (**Fig. R18B**). En ese momento, la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  saturante (1 mM) aceleró la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en el tGo.

El cGo (**Fig. R18C y R18D**) se comportó de manera muy diferente. La captación de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de TBH fue insignificante (**Fig. R18D**) y, al quitar el inhibidor de SERCA, la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  aumentó hasta alcanzar una velocidad de aproximadamente 11  $\mu\text{M}/\text{min}$ , sin que se llegase al nivel del estado estacionario durante el periodo de tiempo que duro el experimento. La adición de  $\text{Ca}^{2+}$  saturante (1 mM) en el minuto 22 aumento la captación (**Fig. R18D**) y la tasa de consumo de la aequorina (**Fig. R18C**). Al final del experimento casi el 80 % de la aequorina se había consumido sin signos aparentes de compartimentación. Nótese la alta velocidad de consumo que se alcanza tras la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  1 mM y que se mantiene hasta el final del experimento (minutos 27-30) (**Fig. R18C**).

En otra variante de experimento (**Fig. R19**), se comparó la captación en el tGo a 100 nM  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ : i) en presencia de TBH (Control en la figura; componente resistente a TBH) o ii) tras una preincubación de 15 min con TBH y 100 nM  $\text{Ca}^{2+}$  (componente sensible a TBH; la aequorina contenida en el espacio resistente a TBH se ha consumido tras los 15 min de preincubación). Las velocidades iniciales de captación fueron de 98 y 11  $\mu\text{M}/\text{min}$ , respectivamente; y los niveles alcanzados en el estado estacionario fueron de 186 y 40  $\mu\text{M}$  (**Fig. R19**). Estos resultados son congruentes con y confirman plenamente los resultados ya expuestos en la **Fig. R18**.



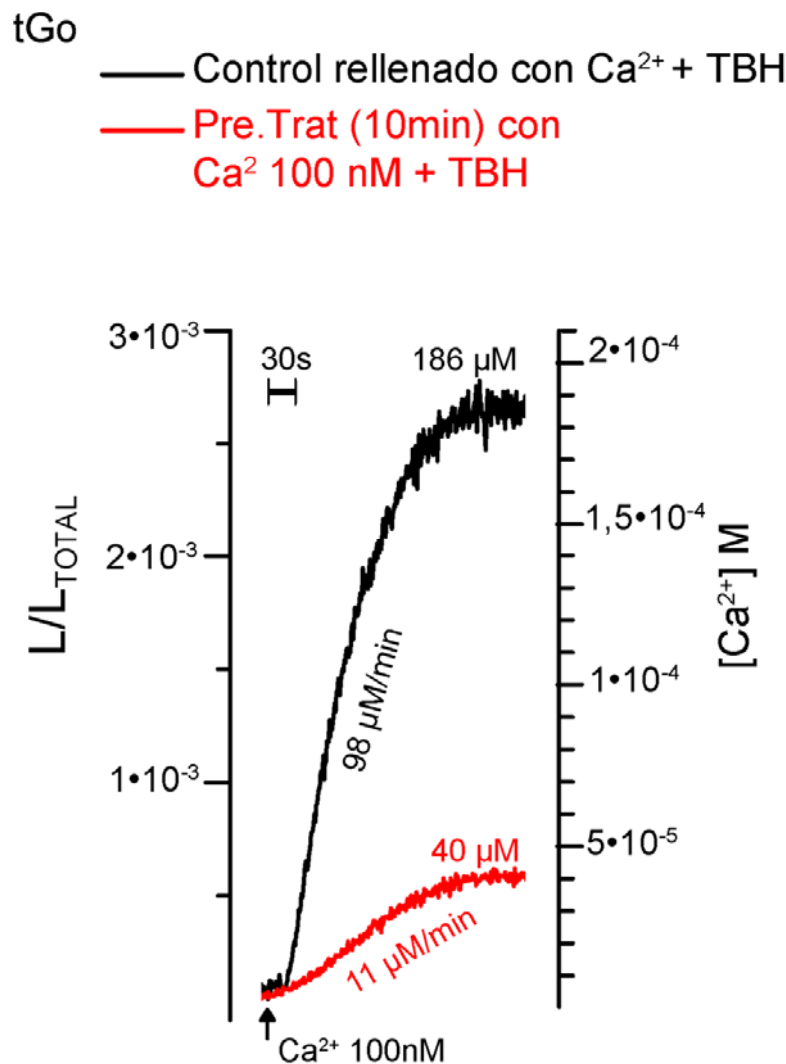
**Figura R18. Comparación del consumo de aequorina y de la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  “resistente” y “sensible” a TBH en cGo y tGo.**

Las células tGo (A, B) y cGo (C, D), se reconstituyeron con celenterazina n, se permeabilizaron con digitonina y se sometieron al protocolo que se indica, prefundiendo secuencialmente con: 1).  $\text{Ca}^{2+}$  100 nM + TBH (componente resistente a TBH); 2).  $\text{Ca}^{2+}$  100 nM sin TBH (componente sensible a TBH; preservado en la etapa anterior) y; 3).  $\text{Ca}^{2+}$  1 mM, para consumir lo más rápidamente posible la aequorina residual. En (A) y (C) se muestran los consumos de aequorina. En (B) y (D) las cinéticas de captación.

#### 4.8 La captación de $\text{Ca}^{2+}$ resistente a Tg en el tGo tiene alta afinidad por $\text{Ca}^{2+}$ .

Como ya se ha mostrado en la **figura R15B**, la velocidad de captación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el tGo no parece cambiar mucho al aumentar la  $[\text{Ca}^{2+}]$  de 100 a 500 nM, mientras que la captación en el cGo claramente se acelera. Estos resultados sugieren que el transporte en el tGo podría estar ya saturado a 100 nM de  $\text{Ca}^{2+}$ . Se ha descrito previamente que la SPCA tiene mayor afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$  que la SERCA (Dode y cols., 2005; Vangheluwe y cols., 2009) (ver **Tabla 2** en la «Introducción»), con una  $K_d$  de 20-50 nM. Esta propuesta es consistente con las observaciones de la **figura R15B**.

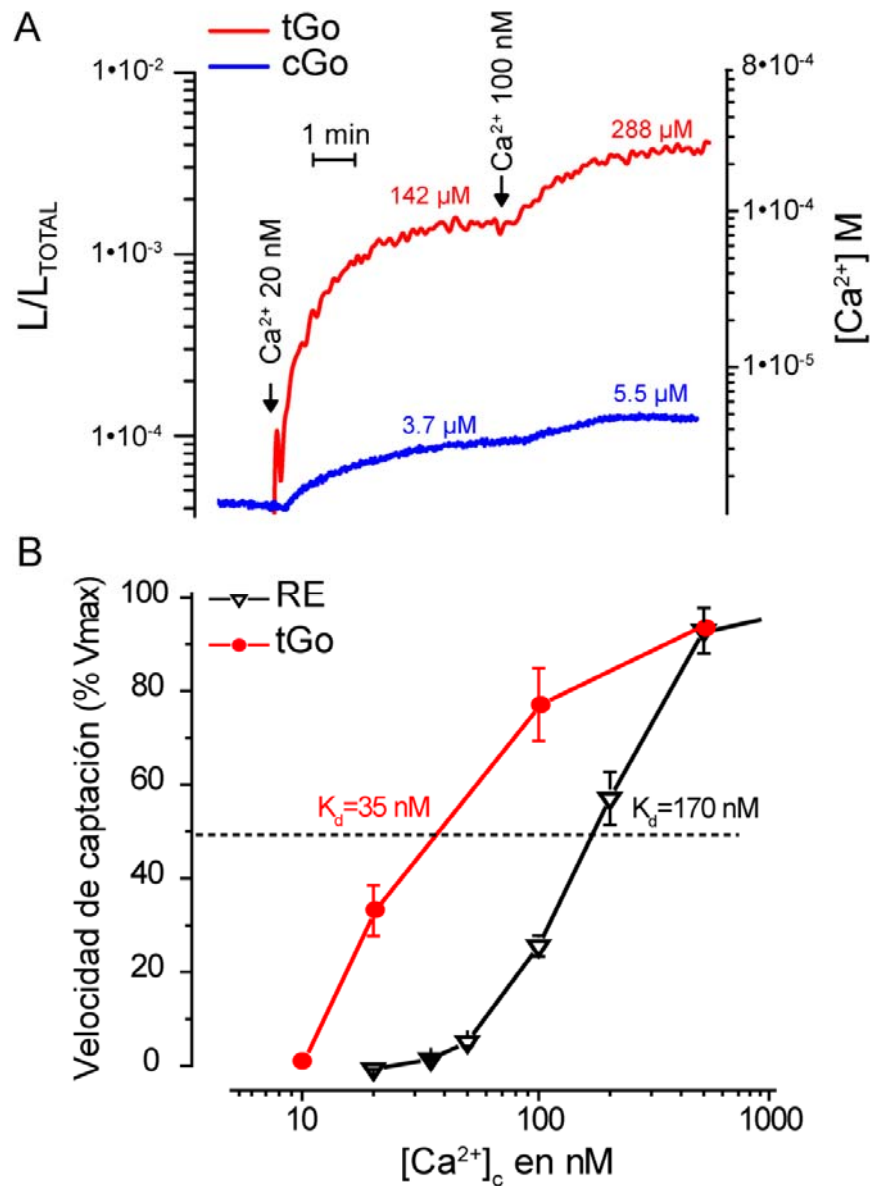
#### 4. RESULTADOS.



**Figura R19. Comparación de la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  en los compartimentos sensible e insensible a TBH del tGo.**

Protocolo alternativo al de la **figura R18**. Las células tGo se reconstituyeron con celenterazina y se permeabilizaron con digitonina. Previo al experimento las células se trataron durante 10 min con: 1). (Control; trazo negro)  $\text{Ca}^{2+}$  0 + TBH 10  $\mu\text{M}$  seguido de captación con  $\text{Ca}^{2+}$  100 nM en presencia de TBH; esto refleja la captación en el componente resistente a TBH. 2) (Pre. Trat.; trazo rojo)  $\text{Ca}^{2+}$  100 nM + TBH 10  $\mu\text{M}$  durante 10 min para consumir toda la aequorina del compartimento resistente a TBH. Acto seguido, las células se incubaron con  $\text{Ca}^{2+}$  100 nM en ausencia de TBH para estudiar la captación por el compartimento sensible a TBH.

Para ratificar nuestra hipótesis de trabajo, en el experimento de la **figura R20** comparamos la captación a dos concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , 20 y 100 nM, tanto en el cGo y como en el tGo (**Fig. R20A**). El experimento se realizó en células permeabilizadas y tratadas con Tg 20 nM. La velocidad de captación del cGo fue mucho menor a ambas concentraciones. La  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{GO}}$  que se alcanza en el estado estacionario fue muy baja, de (media  $\pm$  eem; n = 3)  $3,6 \pm 0,1 \mu\text{M}$  a 20 nM y  $8,3 \pm 4,9 \mu\text{M}$  a 100 nM. En el tGo la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{GO}}$  a 20 nM  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{C}}$ ; una concentración que



**Figura R20. La captación de  $Ca^{2+}$  resistente a la Tg del tGo es de muy alta afinidad.**

En (A) las células cGo y tGo, se reconstituyeron con celenterazina n y se permeabilizaron con digitonina y se pretrataron con Tg 20 nM. Se inició la captación por adición de  $Ca^{2+}$  20 nM y tras 5 min la concentración de  $Ca^{2+}$  se aumentó a 100 nM. Se compara la captación por cGo (trazo azul) y tGo (trazo rojo). Los datos se representan como  $L / L_{TOTAL}$ . Los valores calibrados en  $[Ca^{2+}]_i$  se muestran a la derecha. Nótese que la escala es logarítmica. Cada trazo es representativo de 3 o más resultados individuales. Los promedios de la  $[Ca^{2+}]_{GO}$  en el estado estacionario fueron (en  $\mu$ M; media  $\pm$  eem; n = 3): con  $Ca^{2+}$  20 nM:  $3,6 \pm 0,1$  en el cGo; y  $131 \pm 7$  en el tGo; con  $Ca^{2+}$  100 nM:  $8,3 \pm 4$  en el cGo; y  $306 \pm 37$  en el tGo. En (B) se representa la cinética de la captación en función de la concentración. Se compara el RE (triángulos invertidos, en negro) y el componente resistente a Tg del tGo (círculos; en rojo). Nótese que la escala de concentración, que se expresa como % de la velocidad máxima) es logarítmica. Cada valor es la media  $\pm$  eem de 3-8 datos individuales. El trazo punteado horizontal indica valor de captación semi-máxima. La concentración a la que se alcanza corresponde a la  $K_d$ .

#### **4. RESULTADOS.**

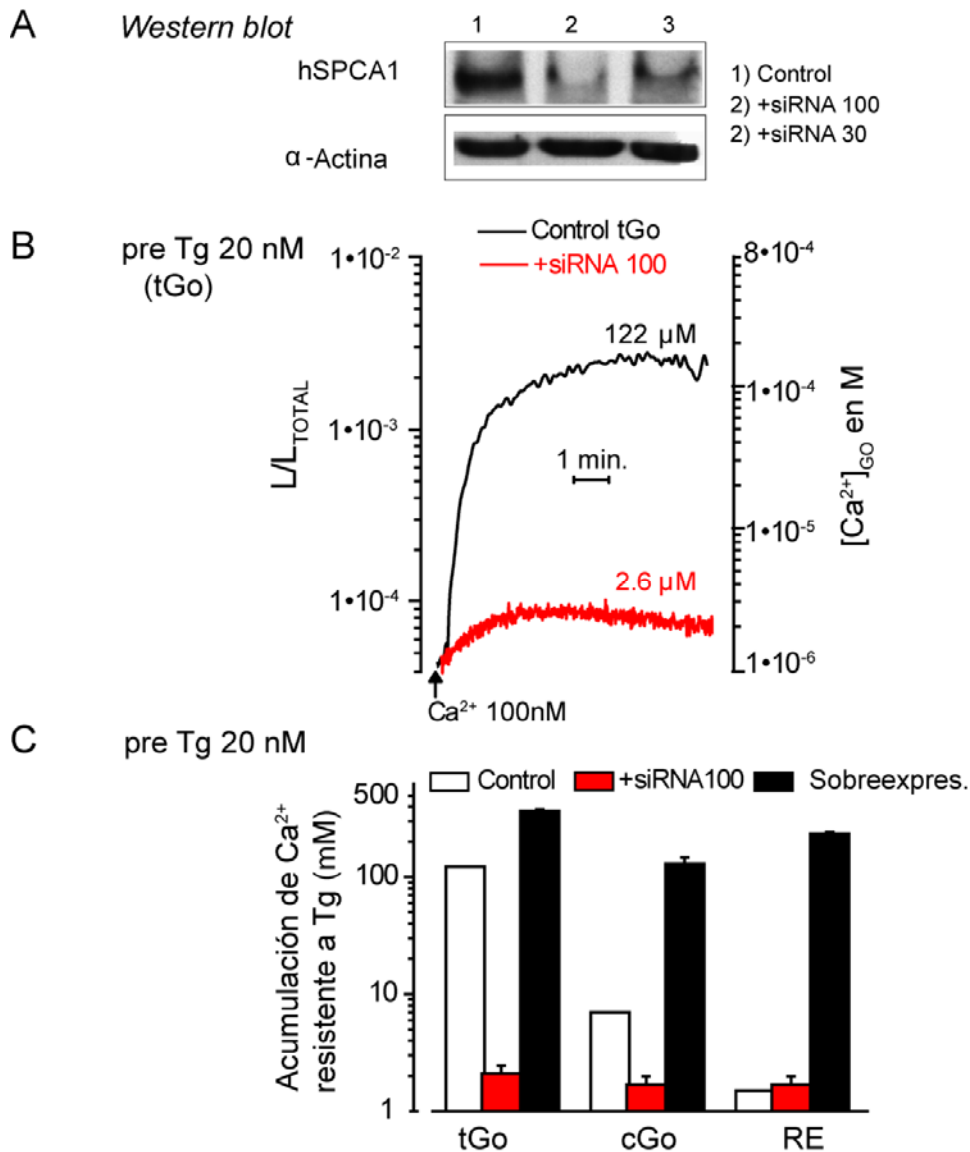
---

está claramente por debajo de la normal a la encontrada en el citosol en reposo (Alvarez y cols., 1999), alcanzó niveles tan altos como (media  $\pm$  eem; n = 3)  $131 \pm 7 \mu\text{M}$  y a la concentración habitual del citosol (100 nM) alcanzo una concentración de  $306 \pm 37 \mu\text{M}$ . Teniendo en cuenta que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  debe ser proporcional a la segunda potencia de la concentración (Villalobos y cols., 2002) la diferencia en la acumulación a 20 y 100 nM es sorprendentemente pequeña (lo esperado sería un cambio de  $5^2=25$  veces). Esto sugiere que la captación está sucediendo por un sistema de más afinidad que la SERCA, que tiene una  $K_d$  de 100-200 nM.

Estudiamos entonces la cinética de la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el tGo a diferentes concentraciones de  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ . En la **figura R20B** se comparan las cinéticas de captación de  $\text{Ca}^{2+}$  del componente sensible a Tg del RE (mediado por la SERCA), y del componente insensible a Tg del tGo. La afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$  de éste último fue mucho más alta que la del RE, con una  $K_{50}$  cercana a 35 nM comparada con 170 nM del RE. Debido a la cinética de segundo orden, las diferencias se exageran a las concentraciones bajas de  $\text{Ca}^{2+}$ . Así por ejemplo, a 50 nM en el RE prácticamente no existe ningún rellenado, mientras que la captación en el tGo supera el 50 % del máximo (**Fig. R20B**).

#### **4.9 La recaptación resistente a Tg en el tGo es mediada por la SPCA.**

Por otra parte, investigamos el papel de la SPCA en el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en los depósitos del Go resistente a Tg, mediante el silenciamiento de su expresión con siRNA. La **figura R21A** muestra que la expresión de la proteína hSPCA, cuantificada a partir de la banda específica en un *Western blot*, se inhibió un 49 % con 30 nM de siRNA y un 72 % con 100 nM de siRNA. Por esta razón para los experimentos funcionales se eligió la concentración de siRNA 100 nM. En células pretratadas Tg 20 nM y con siRNA 100 nM se observó que la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el tGo está prácticamente abolida (**Fig. R21B**; nótese la escala logarítmica). La  $[\text{Ca}^{2+}]_{tGO}$  en el estado estacionario alcanzó (en  $\mu\text{M}$ ; media  $\pm$  eem; n = 3)  $122 \pm 22$  en la situación control (tratados con un siRNA no específico) frente a los valores de  $2,1 \pm 0,3$  obtenidos tras el tratamiento con el siRNA para SPCA1. La velocidad inicial de recaptación de  $\text{Ca}^{2+}$  fue  $54 \pm 12 \mu\text{M/s}$ , en la situación control, frente a  $1,1 \pm 0,2 \mu\text{M/s}$ , tras el tratamiento con el siRNA. Por otra parte, en el cGo la captación resistente a Tg fue mucho menor que en el tGo (nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  en el estado estacionario, media  $\pm$  eem; n = 3;)  $6,8 \pm 3 \mu\text{M}$  y se redujo aún más por el tratamiento con siRNA llegando a valores de  $1,7 \pm 0,4 \mu\text{M}$  (**Fig. R21C**).



**Figura R21. Efecto del silenciamiento de SPCA sobre la captación de Ca<sup>2+</sup> resistente a Tg en el tGo.**

En (A) se muestra el *Western blot* de extractos de células HeLa visualizado con anticuerpos anti-SPCA1 y anti- $\alpha$ -actina. En los carriles de izquierda a derecha: (Control), transfectadas con el control *scramble*; (+siRNA 100 nM), transfectadas con siRNA 100 nM y; (+siRNA 30 nM), transfectadas con siRNA 30 nM. En (B) se muestra el efecto del tratamiento de 48h con siRNA 100 nM sobre la captación de Ca<sup>2+</sup> por el tGo (pretratado con Tg 20 nM). Tras el tratamiento con siRNA las células se reconstituyeron con celenterazina n y se permeabilizaron con digitonina 60  $\mu$ M en un medio intracelular. Posteriormente, y previo tratamiento con Tg 20 nM, se incubaron con una solución tamponada a una concentración de Ca<sup>2+</sup> 100 nM. Los valores se representan como  $L/L_{TOTAL}$ . Los valores calibrados en  $[Ca^{2+}]_{Go}$  se muestran a la derecha. Nótese la escala logarítmica. Cada trazo es representativo de 3 o más datos. En (C) se muestran los valores promedios de 3 experimentos similares en el RE, cGo y tGo. Nivel alcanzado en el equilibrio, en  $\mu$ M; nótese escala logarítmica, (en  $\mu$ M; media  $\pm$  eem; n = 3). Se comparan 3 tratamientos: Control (*scramble*; barra blanca); +siRNA 100 nM (barra roja) y; sobre expresión de SPCA1 (barra negra).



#### **4. RESULTADOS.**

---

Finalmente, la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE, en presencia de Tg 20 nM, fue casi despreciable con o sin tratamiento con siRNA (**Fig. R21C**).

En experimentos paralelos, se estudió el efecto de la sobreexpresión de hSPCA1. Con el fin de lograr esta sobreexpresión en las líneas estables de HeLa que expresan las sondas de RE y cGo, se les transfectó con el plásmido pMT2hSPCA2 (cedido por el Dr. Wyutack, *Katholieke Universiteit Leuven, Belgium*) a una concentración final de 0,4  $\mu\text{g}/\text{pocillo}$ . La sobreexpresión ocasiono un gran incremento en la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  resistente a Tg en todos los depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$ , sugiriendo que existe, en estas condiciones, una expresión heterotópica de SPCA1 (**Fig. R21C**).

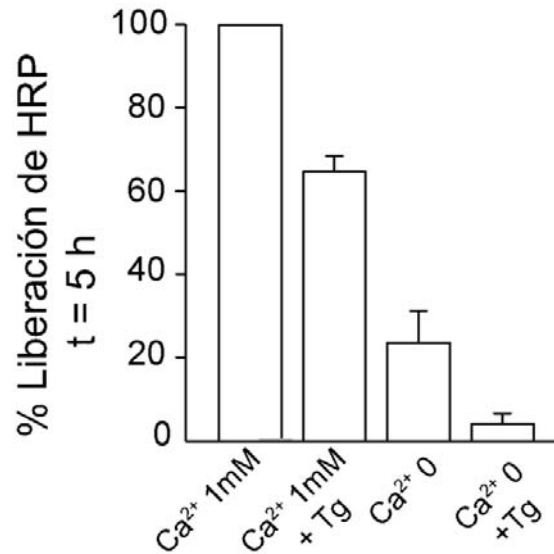
De estos resultados, sumados a toda la evidencia expuesta más arriba, concluimos que el mecanismo responsable de la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  resistente a Tg en el tGo se debe a la acción de la SPCA1.

#### **4.10 La necesidad de $\text{Ca}^{2+}$ para el proceso secretor.**

En un intento de encontrar una conexión entre la función y la diversidad de depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en Go, que será objetivo de un nuevo trabajo, hemos realizado un estudio preliminar de la relación entre la secreción de proteínas y la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  en el Go. Para esto diseñamos una serie de experimentos basados en la secreción de la peroxidasa de rabanito (HRP<sup>38</sup>) por una línea de células HeLa que la expresan de forma estable (cedidas amablemente por el Dr. Malhorta (Laboratorio de Fisiología y Canalopatías, *Centro de Regulacio Genomica*, Barcelona, España). En este mismo laboratorio se había sugerido ya una relación entre la expresión de SPCA1 y la secreción de proteínas utilizando este mismo modelo celular (von Blume y cols., 2011). En la **figura R22** hemos estudiado la secreción de HRP en varias condiciones que afectan la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  en RE y Go, concretamente, el tratamiento con Tg, la eliminación del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular o la suma de las dos condiciones. En el primer caso debe vaciarse completamente el RE y solo parcialmente Go, en el segundo, tanto RE como Go deben estar afectados. y en el tercer caso el vaciamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  debe ser más intenso en ambos compartimentos. Como puede verse, el vaciamiento selectivo del RE con Tg tuvo un efecto relativamente pequeño, mientras que las otras maniobras, que afectan más al Go, tuvieron un efecto mayor.

---

<sup>38</sup> Horseradish peroxidase.



**Figura R22. Efectos del tratamiento con Tg 20nM y de la retirada de Ca<sup>2+</sup> extracelular sobre la secreción de HRP en células HeLa.**

En las ordenadas, el % de liberación de HRP de células HeLa (clon estable HRP) en 5 h relativo al control con Ca<sup>2+</sup> 1 mM. Las células se sometieron a los cuatro tratamientos que muestran.

El efecto del tratamiento de retirada de Ca<sup>2+</sup> puede racionalizarse por el hecho de que la captación en el tGo es de muy alta afinidad y que, por lo tanto, puede resistir mejor la disminución de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>C</sub>. En estas circunstancias la adición de Tg, que bloquea también el 80% de la captación de Ca<sup>2+</sup> en tGo, debe hacer caer la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>GO</sub> más todavía y derrumbar la secreción de HRP. Naturalmente esto son solo especulaciones, e hipótesis de trabajo que podrán ser testadas con las herramientas que hemos desarrollado en esta Tesis en un nuevo proyecto de investigación.

#### **4.11 Medidas preliminares de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>GO</sub> en célula única usando una nueva sonda fluorescente derivada de la aequorina.**

Nuestro laboratorio ha generado y perfeccionado una gran variedad de sondas luminiscentes para medir la dinámica del Ca<sup>2+</sup> en los orgánulos intracelulares. La aequorina puede usarse para aplicaciones de luminiscencia (Chamero y cols., 2008; Nunez y cols., 2007; Quesada y cols., 2008; Villalobos y cols., 2005; Villalobos y cols., 2001; Villalobos y cols., 1996, 1997), pero no cabe duda de que

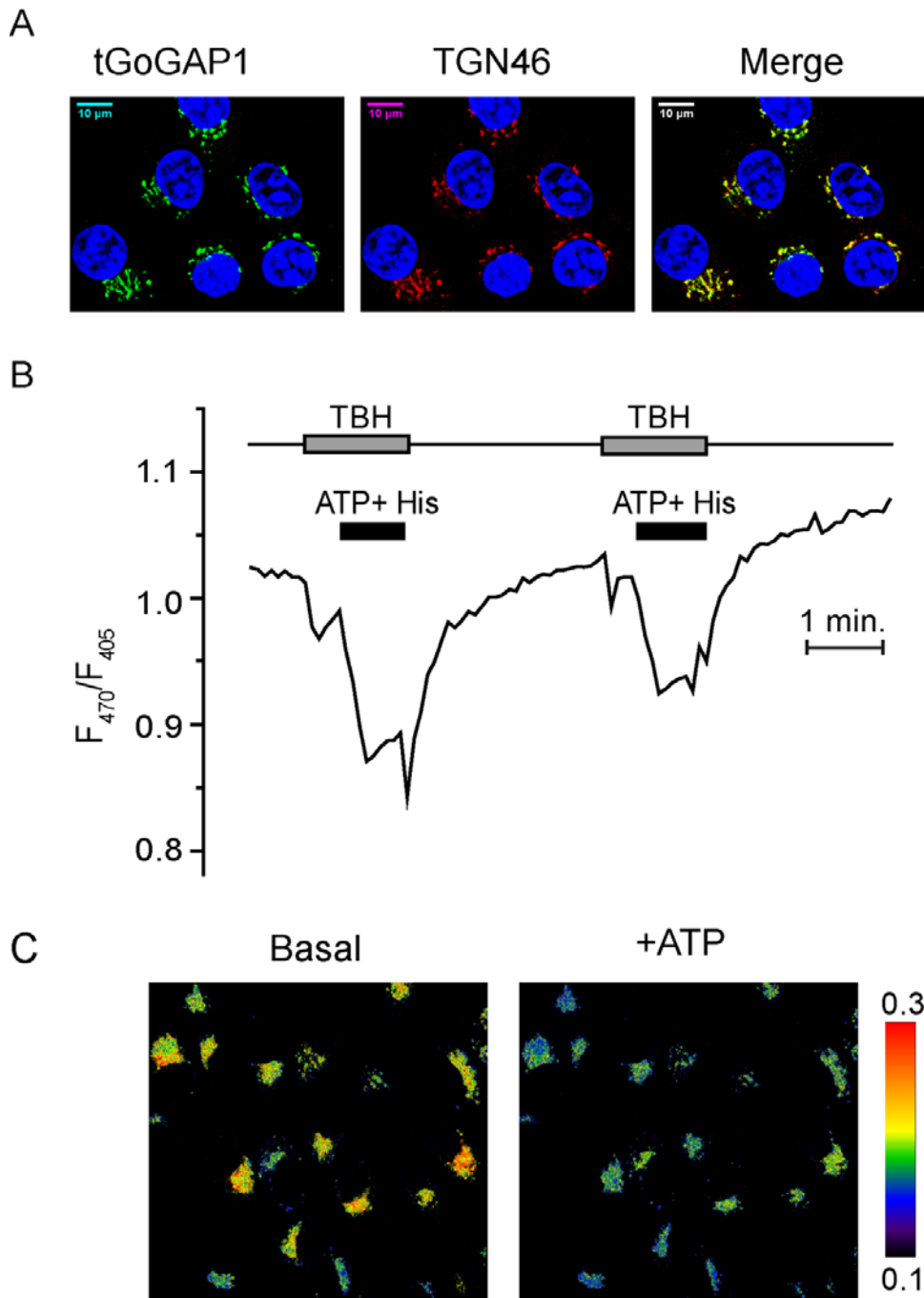
#### **4. RESULTADOS.**

---

las sondas fluorescentes tienen ventajas evidentes para experimentos de imagen (ver discusión en (Alonso y cols., 2006; Nunez y cols., 2007). Actualmente, nuestro laboratorio está desarrollando una nueva sonda fluorescente derivada de una fusión de la aequorina con la GFP<sub>UV</sub> y que llamamos GAP, cuyos detalles no se describirán aquí por ser parte de otros proyectos de investigación aún sin publicar. No obstante, utilizando las herramientas generadas en esta Tesis, nos propusimos realizar medidas preliminares de Ca<sup>2+</sup> en el tGo, y ver si éramos capaces de hacer medidas de imagen de célula única y monitorizar la acción de algunos agonistas fisiológicos.

La GAP1 es una variante de la sonda de baja afinidad por el Ca<sup>2+</sup>; además es ratiométrica de doble excitación y, la unión al Ca<sup>2+</sup> aumenta el cociente de las fluorescencias excitadas a 470 nm y 405 nm. Hemos usado con éxito esta sonda para monitorizar los cambios de [Ca<sup>2+</sup>] en RE (datos no mostrados). Para su uso en esta Tesis, realizamos una fusión de GAP1 con la misma secuencia de direccionalidad al tGo descrita previamente para la sonda bioluminiscente (GA) (ver «Materiales y Métodos»). A continuación generamos una línea celular de HeLa que expresa establemente la sonda. La correcta localización de la sonda se analizó por superposición de la señal de tGoGAP1 con el marcador TGN46 (**Fig. R23A**).

Una vez demostrada la correcta localización, se investigó su funcionalidad estimulando las células con ATP + histamina, que, como sabemos, inducen la producción de IP<sub>3</sub> en las células HeLa. En la **figura R23B** se muestra una respuesta típica en un experimento realizado con tGoGAP1. Se puede observar que la estimulación con los agonistas (ATP + His), causa una disminución reproducible del cociente F470 / F405 (**Fig. R23B**). En la **figura R23C** se muestra una imagen ratiométrica, codificada en pseudocolor, del un campo celular que contenía 20 células. Las imágenes están tomadas justo antes de la aplicación de ATP (Basal) y poco después de la aplicación (+ATP). Como puede verse, hubo una disminución notable del cociente de fluorescencias (en muchas células superior al 50 %) en todas las células presentes en el campo, sugiriendo que la nueva sonda tGoGAP1 es suficientemente sensible y da una respuesta robusta y similar en toda las células clonales. Estos datos preliminares servirán de base para futuros proyectos del Laboratorio que podrían servir para complementar o matizar los resultados preliminares presentados en esta Tesis.



**Figura R23. Imagen de  $Ca^{2+}$  en célula única con la sonda fluorescente tGoGAP1.**

En (A) la colocalización de la sonda GoGAP1 (clon estable; fluorescencia verde), con el marcador del tGo, TGN46 (fluorescencia roja). Los núcleos se tiñeron con DAPI, (fluorescencia azul). La tercera imagen es la superposición de las dos anteriores. En (B) se muestra la respuesta a la estimulación con ATP + histamina (100  $\mu$ M, cada uno) en un medio que contenía  $Ca^{2+}$  1 mM y TBH 10  $\mu$ M como se indica. En (C) imagen del cociente  $F_{470} / F_{405}$  de todo un campo de células HeLa-tGoGAP1 (20 células) justo antes (basal) y durante la estimulación con ATP. La escala de pseudocolor (correspondiente a un cociente entre 0,1 y 0,3) se muestra a la derecha. La mayoría de las células respondieron con una disminución del cociente  $F_{470} / F_{405}$ .

## 5. DISCUSIÓN.

---

### 5 DISCUSIÓN.

La heterogeneidad de los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  enriquece la señalización por  $\text{Ca}^{2+}$  y la añade una considerable complejidad. Permite, por ejemplo, una manipulación localizada de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en los microdominios subcelulares, lo que posibilita la coexistencia de microambientes con diferentes  $[\text{Ca}^{2+}]$  en la misma célula. De este modo, pueden acomodarse múltiples umbrales de respuesta para diferentes funciones dentro de la misma célula (Alvarez y cols., 1999; Meldolesi y Pozzan, 1998). Es claro que la respuesta heterogénea puede derivar de depósitos separados espacialmente o funcionalmente. Cualquier subdivisión espacial o funcional de un depósito de  $\text{Ca}^{2+}$  proporciona el potencial para respuestas complejas y específicas. La heterogeneidad de los depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  ha sido documentada y propuesta principalmente a través de dos mecanismos. En primer lugar los diversos orgánulos (RE, Go, y lisosomas, entre otros) pueden actuar de distinta manera como depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$ . En segundo lugar, existe una creciente evidencia de que los depósitos se pueden subdividir dentro de un solo orgánulo en términos de distribución de distintos receptores/canales de  $\text{Ca}^{2+}$  o de distribución de las distintas isoformas de ATPasas  $\text{Ca}^{2+}$ -dependientes. Desde el punto de vista fisiopatológico y médico, el conocimiento de la heterogeneidad y sus mecanismos tiene un gran interés potencial, pues podría permitir el diseño de tratamientos más selectivos, dirigidos a corregir una disfunción específica sin interferir con las otras funciones.

#### 5.1 Heterogeneidad funcional de los depósitos de $\text{Ca}^{2+}$ del retículo endoplásmico (RE).

Los resultados de este estudio ponen de manifiesto la heterogeneidad de los depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en el RE de las células HEK293. Aunque en general se admite que la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE es atribuible a la SERCA, y que ésta se inhibe por TBH, aquí se encontró un compartimento resistente a TBH (**Fig. R1C**). Este depósito era responsable de una parte importante de la funcionalidad del RE, ya que era capaz de sostener hasta un 80% del pico de  $[\text{Ca}^{2+}]_C$  inducido por el  $\text{IP}_3$  (medido por la altura del pico; **Fig. R1I**). Por otra parte, tanto Tg como CPA, dos conocidos inhibidores de la SERCA, indujeron el vaciamiento completo de este compartimento de  $\text{Ca}^{2+}$  resistente a TBH (**Fig. R1D e 1I**). Este depósito puede vaciarse también por estimulación con agonistas y

vuelve a llenarse por incubación en medio con  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, incluso en la presencia de TBH (**Fig. R2**).

En contraste con las células HEK293, en las células HeLa no obtuvimos ninguna evidencia de un compartimento de  $\text{Ca}^{2+}$  resistente a TBH (**Figs. R1G y R1J**). En la misma dirección, en los linfocitos también se ha demostrado que TBH puede vaciar completamente los depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Mason y cols., 1991). Esto nos animó a intentar identificar la entidad molecular responsable del almacenamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  resistente a TBH, que debía estar presente en células HEK293, pero no en HeLa.

¿Cuál podría ser la base estructural de las diferencias de almacenamiento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular entre los distintos tipos de células? En las plaquetas parece claro que los depósitos sensibles e insensibles a TBH corresponden a dos depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  diferentes. El primero se encuentra en los gránulos densos ácidos o los lisosomas, y el segundo en el sistema tubular denso, que es equivalente al RE (Cavallini y cols., 1995; Jardin y cols., 2007; Lopez y cols., 2005; Papp y cols., 1992). Como consecuencia de ello, el  $\text{Ca}^{2+}$  se libera de los gránulos por agentes que colapsan su gradiente de  $\text{H}^+$ , tales como el intercambiador  $\text{K}^+/\text{H}^+$  nigericina, el inhibidor de la  $\text{H}^+$ -ATPasa vacuolar bafilomicina o el péptido GPN, que provoca la lisis osmótica de los lisosomas con liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  que contenían al citosol. En contraste con estas observaciones en plaquetas, las maniobras de colapso del gradiente de pH de los orgánulos intracelulares no abolieron, en nuestro caso, la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del depósito resistente a TBH en las células HEK293 (**Figs. R3B-R3G**), lo que sugiere que el  $\text{Ca}^{2+}$  proviene de un compartimento diferente del de las plaquetas.

Los experimentos realizados con aequorinas dirigidas al RE (**Fig. R4**) proporcionaron una demostración directa de que el depósito de  $\text{Ca}^{2+}$  resistente a TBH está comprendido realmente dentro del RE. Sin embargo, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  que se alcanza cuando opera solamente el mecanismo de acumulación resistente TBH es menor (aproximadamente un quinto) que la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$  que alcanza normalmente (**Fig. R4A**). El subcompartimento de  $\text{Ca}^{2+}$  es, sin embargo, funcional, y puede liberarse con los agonistas productores de  $\text{IP}_3$  de manera muy eficiente, incluso mejor que del depósito de  $\text{Ca}^{2+}$  mayoritario de las células HEK293, lo que se documentó tanto por evidencias indirectas (incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico) como directas (descenso del nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  en RE) (**Figs. R1 y Fig. R4**).

La aequorina se consume en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , y su consumo relativo nos da información sobre el tamaño del depósito involucrado en la captación de  $\text{Ca}^{2+}$ . Si

## **5. DISCUSIÓN.**

---

un depósito no capta  $\text{Ca}^{2+}$  la aequorina que contiene no se consume en absoluto; si el  $\text{Ca}^{2+}$  penetra en todo el depósito entonces se consume el 100 % de la aequorina (si esperamos el tiempo suficiente) y, finalmente, si el consumo cesa antes de alcanzar el 100% indica que solo una fracción del depósito se llena con  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que el resto no capta  $\text{Ca}^{2+}$  en absoluto. Utilizando esta estrategia, nos encontramos con que el tamaño relativo del depósito de  $\text{Ca}^{2+}$  resistente a TBH del RE, tal como se estima por la fracción asintótica de consumo de aequorina, es muy diferente en las células HEK293 y las HeLa (**Figs. R5 y R6**). En las células HEK293, el compartimento de  $\text{Ca}^{2+}$  resistente a TBH consumió más del 80% de aequorina del total (**Figs. R6A y R6C**), lo que sugiere que: i) o bien existe una comunicación entre los compartimentos, el resistente y el sensible a TBH o, alternativamente, ii) el mecanismo responsable de ésta captación de  $\text{Ca}^{2+}$  se distribuye a lo largo de todo el RE, junto con la SERCA2b. En las células HeLa el compartimento resistente a TBH del RE, fue mucho más pequeño o inexistente. La medida con el sistema de alta afinidad para el  $\text{Ca}^{2+}$  (con celentarazina nativa), que probablemente es una sobreestimación, da cifras de consumo de solo el 20-25% (**Figs. R6B y R6C**).

En las plaquetas, la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  sensible a TBH en los gránulos ácidos parecía estar relacionada con una isoforma de SERCA distinta a la SERCA2b (Papp y cols., 1992), que más tarde fue identificada como SERCA3 (Wuytack y cols., 1994), y que está presente también en otros tejidos (Hadri y cols., 2006; Vangheluwe y cols., 2009). Por otro lado, en las plaquetas, la SERCA2b sería resistente a TBH (Lape y cols., 2008; Papp y cols., 1992; Wuytack y cols., 1994). Sin embargo, en otros tejidos, incluyendo el músculo esquelético, el corazón, el músculo liso y los linfocitos, se ha descrito consistentemente que la actividad de la SERCA2b (así como la de la SERCA1) y la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE son sensibles a TBH, (Lape y cols., 2008). La isoforma dominante de SERCA en células HeLa y HEK293 es la isoforma 2b (Martin y cols., 2002), que, de acuerdo con nuestros resultados, es sensible a TBH (**Figs. R2 y R3**). Se ha propuesto que en las células HEK293, pero no las células HeLa, también se expresaría la isoforma SERCA3d (Martin y cols., 2002) y nosotros lo confirmamos en el presente estudio midiendo el nivel de expresión del mRNA por Q-RT-PCR (**Fig. R7A**). Además, se observó actividad ATPasa SERCA3 resistente TBH (**Fig. R7B**) en las células HEK293, pero no en las HeLa. Por último, la sobreexpresión de SERCA3d en células HeLa generó un depósito de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular resistente a TBH en el RE (**Figs. R8D y R8F**). Este depósito era liberable por estimulación con agonistas productores de  $\text{IP}_3$ . Estos resultados indican que la SERCA3d es, con toda probabilidad, la responsable de la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  resistente a TBH de las células HEK293. Este hallazgo plantea la interesante cuestión de si la expresión diferencial de las isoformas de SERCA podría modificar las propiedades de los

depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y permitir la coexistencia de diferentes compartimentos y, tal vez, el control diferencial por  $\text{Ca}^{2+}$  de distintas funciones en la misma célula. Se ha propuesto recientemente que las isoformas de SERCA3 podrían participar en la diferenciación (Pegoraro y cols., 2011) y estar relacionadas con la transducción de reacciones tanto fisiológicas y como patológicas (Brouland y cols., 2005; Dally y cols., 2009; Hadri y cols., 2006; Vangheluwe y cols., 2009).

La presencia de dos compartimentos distintos de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE de las células HEK293 podría tener relevancia funcional, como se ha propuesto ya en otras células, donde compartimentos específicos de  $\text{Ca}^{2+}$  regularían diferentes funciones celulares a través de diferentes vías de señalización. Por ejemplo, en las plaquetas humanas los depósitos ácidos sensibles a TBH son liberados por agonistas que se unen al receptor de trombina y cuya activación está implicada en la agregación plaquetaria. (Ben-Amor y cols., 2006; Jardin y cols., 2007). Del mismo modo, en células de la pituitaria de *Carassius auratus* existen dos depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  diferentes que pueden regular diferencialmente el almacenamiento y la secreción de la hormona del crecimiento (Johnson y cols., 2002). Nuestros hallazgos permiten seguir avanzando en el conocimiento de la heterogeneidad de los depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  de los orgánulos intracelulares, que se sustenta en la diversidad de isoformas de ATPasas y que subyacen a la generación diferencial de señales  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas por diferentes agonistas.

En la **figura D1** se resumen nuestras propuestas principales en un modelo simplificado con dos subcompartimentos del retículo endoplásmico, RE1 y RE2. En RE2 se alcanza en el estado estacionario una concentración de  $[\text{Ca}^{2+}]$  de 400-500  $\mu\text{M}$ . El compartimento RE2 es sensible a  $\text{IP}_3$  (capaz de vaciar hasta un 50% aproximadamente) y el  $\text{Ca}^{2+}$  se capta principalmente a través de la SERCA2b, que es sensible a TBH. Por su parte, el RE1 alcanza en el estado estacionario una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  de entre 100 y 200  $\mu\text{M}$ , es sensible a  $\text{IP}_3$  (capaz de vaciar hasta un 90% aproximadamente) y la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  es gobernada principalmente por la SERCA3d (**Fig. R7**), que es insensible a la TBH, pero sensible a la Tg y al ácido ciclopiazónico. Aunque RE1 y RE2 se representan como dos compartimentos distintos en la **figura D1**, deben estar comunicados, como demuestran nuestras medidas del consumo de aequorina en presencia de TBH (**Fig. R5**), que alcanza más del 80% del total de la aequorina. Alternativamente, pueden visualizarse RE1 y RE2 como un compartimento único que contiene las dos ATPasas, SERCA2b, que sería más potente, y SERCA3d, resistente a TBH, y que sería la única operativa en presencia de este inhibidor. Otra característica peculiar del RE es que una parte importante del  $\text{Ca}^{2+}$  que



## 5. DISCUSIÓN.

acumula en su interior (hasta el 50%), no es liberado por  $IP_3$ . El modelo es muy distinto en las células HeLa, donde el RE es un compartimento homogéneo, con un solo sistema de bombeo de  $Ca^{2+}$ , la SERCA2b, y completamente liberado por  $IP_3$ .

### HEK293-Compartimentos funcionales del RE

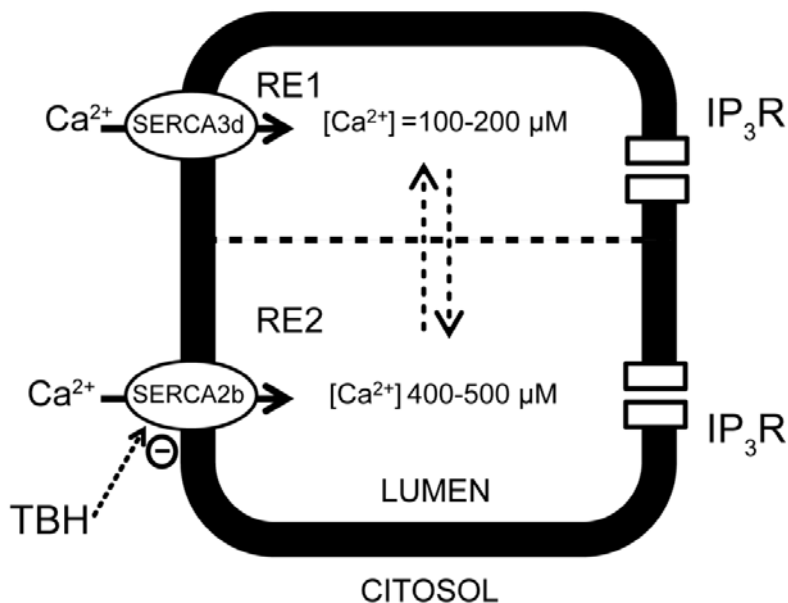


Figura D1. Modelo ER en células HEK293.

### 5.2 Heterogeneidad funcional de los depósitos de $Ca^{2+}$ del aparato de Golgi (Go).

La información que existe actualmente sobre la dinámica de  $Ca^{2+}$  en el Go se basa principalmente en medidas realizadas en poblaciones celulares usando aequorinas dirigidas al tGo por fusión de la sonda de  $Ca^{2+}$  a una porción del dominio de transmembrana de la sialil-transferasa (Callewaert y cols., 2003; Missiaen y cols., 2001; Pinton y cols., 1998; Vanoevelen y cols., 2004). Nosotros hemos elaborado tres nuevas sondas de  $Ca^{2+}$  para Go por fusión de aequorinas con GFPs. Dos de ellas, tGoGA y cGoGA, son útiles para ensayos de bioluminiscencia en poblaciones celulares. La tercera es apta para ensayos de

fluorescencia en célula única (tGoGAP1). Estos tres indicadores pertenecen a la familia de las *GECIs*<sup>39</sup>, y pueden dirigirse específicamente a los distintos compartimentos del Go, cGo y tGo. Para ello hemos utilizado las secuencias de direccionalidad de dos enzimas que se localizan selectivamente en el cGo ( $\beta$ -1,6-acetilglucosamiltransferasa) (Zerfaoui y cols., 2002) y en el tGo (TGN) ( $\beta$ -1,4 N-galactosiltransferasa) (Llopis y cols., 1998), respectivamente. En el caso del cGo, es la primera vez que esta secuencia de direccionamiento se utiliza en *GECIs*. En cambio, en el tGo ya se había reportado registros con la misma secuencia de direccionalidad en camaleones (Griesbeck y cols., 2001). La ventaja de nuestros indicadores sobre otros basados en la tecnología de la aequorina, es que tanto tGoGA, como cGoGA y tGoGAP1, conservan la fluorescencia de la GFP, lo que permite monitorizar su localización en las células vivas en cualquier momento, y detectar fácilmente defectos o errores en su expresión y su topología. Según nuestra experiencia, y en concordancia con otros artículos (Girotti y Banting, 1996; Lissandron y cols., 2010), las transfecciones celulares transitorias, especialmente de sondas dirigidas al aparato de Golgi, generan con frecuencia una localización incorrecta del indicador. Para paliar este problema empleamos un doble abordaje. En primer lugar, seleccionamos el vector pHSV que lleva como promotor el IE4/5 del virus herpes, que induce menor expresión que otros plásmidos de uso habitual como el pcDNA3. En segundo lugar generamos líneas de células HeLa que expresan de forma estable cada una de nuestras sondas. Otra ventaja de utilizar transfección estable es que se reduce la inevitable variabilidad entre experimentos. En las **figuras R-9 y R-23** puede apreciarse que la localización de nuestras sondas recuerda la morfología característica del aparato de Golgi: perinuclear, asimétrica, en media luna y con sus cisternas apiladas. Además, la señal de GFP de ambas sondas se solapa perfectamente con sus respectivos marcadores, TGN46 para tGoGA y GM130 para cGoGA (**Tabla 9**).

Nuestros resultados con las sondas de aequorinas de RE, cGo y tGo ponen de manifiesto tanto similitudes como diferencias entre ambos sistemas de endomembranas. Aunque ambos son orgánulos con alto contenido de  $\text{Ca}^{2+}$ , la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  no alcanza valores tan altos en el Go como en el RE. En el estado estacionario encontramos valores de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$  es de unos 600  $\mu\text{M}$  mientras que la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{GO}}$  es próxima a 200 nM (**Fig. R13**). Nuestros valores están básicamente de acuerdo con los obtenidos en otro laboratorio en los que utilizaron una sonda de aequorina con diferente secuencia direccionalidad al tGo

<sup>39</sup> GECIs: Genetic Encode Calcium Indicator.

## 5. DISCUSIÓN.

---

en células HeLa (Pinton y cols., 1998); pero son menores a los obtenidos en otro laboratorio con las mismas condiciones ( $[Ca^{2+}]_{GO} = 600\mu M$ ) (Missiaen y cols., 2004b). Una explicación a esta divergencia podría ser la localización inapropiada de la sonda en los otros estudios, que podría deberse a tres razones: i) la incorrecta localización al realizar transfecciones transitorias (Girotti y Banting, 1996), ii) la utilización de vectores de alta expresión; y iii) la falta de monitorización del estado de los orgánulos al momento de realizar el experimento. Por nuestra parte, en todos los experimentos mostrados aquí hemos utilizado clones de células HeLa que expresan establemente nuestras sondas, evitando así la mala localización y reduciendo la variabilidad de experimento a experimento.

En relación con el contenido de  $Ca^{2+}$  en el cGo, es, hasta donde nosotros sabemos, la primera vez que se aborda este tema. Según nuestros resultados, la  $[Ca^{2+}]_{cGO}$  alcanzada en el equilibrio es de aproximadamente  $200\mu M$ , muy similar a la obtenida en el tGo (**Fig. R13**). La velocidad inicial de rellenado de  $Ca^{2+}$  fue también similar en las células intactas (**Fig. R13**).

Cuando se estudiaron las propiedades de la captación de  $Ca^{2+}$  del RE y del cGo en presencia del inhibidor irreversible de SERCA tapsigargina (Tg,  $20\text{ nM}$ ) (Thastrup y cols., 1989), la inhibición fue completa en ambos orgánulos. En contraste, en el tGo la inhibición de la captación fue solo parcial, alcanzándose valores residuales de  $[Ca^{2+}]_{GO}$  cercanos a  $100\mu M$ . Los experimentos con células permeabilizadas nos permitieron analizar con mayor detalle las propiedades de captación de  $Ca^{2+}$  en los distintos depósitos, ya que con esta maniobra eliminamos los artefactos introducidos por la presencia de la membrana plasmática. Nos permite, además, controlar la concentración de  $Ca^{2+}$  en el medio de incubación (equivalente al citosol en este caso). Al estudiar la captación, en el RE y en el tGo, a distintas concentraciones de Tg nos dimos cuenta de que la  $K_i$  (concentración que inhibe un 50%) era muy diferente en ambos compartimentos. En el RE la inhibición es de alta afinidad, prácticamente completa con Tg  $20\text{ nM}$ . En contraste, en el tGo la inhibición por Tg no responde a una exponencial simple. Con Tg  $20\text{ nM}$  se inhibe aproximadamente el 80 % de la captación (con  $K_i$  aprox.  $5\text{ nM}$ ), mientras que el 20 % restante requiere concentraciones muy superiores ( $K_i = 200\text{-}300\text{ nM}$ ) de modo que ni siquiera con Tg  $1000\text{ nM}$ , la concentración más alta probada, es la inhibición completa (**Fig. R14**). En resumen, nuestros resultados indican que la captación de  $Ca^{2+}$  en el tGo está compuesta por dos componentes diferentes, uno muy sensible y otro poco sensible a Tg. Se estima que la inhibición de Tg sobre la actividad SERCA1 es de muy alta afinidad, con un  $IC_{50} = 0,03\text{ nM}$ , mientras que para SPCA1 y SPCA2 se

han propuesto valores de  $IC_{50} = 28 \mu\text{M}$  y  $2 \mu\text{M}$ , respectivamente (Vangheluwe y cols., 2009).

Recientemente, se ha comunicado que el bis (2-hidroxi-3-tert-butil-5-metilphenil)-metano (bis-fenol, también llamado ralox 46; no confundir con bis-fenol A) es un inhibidor muy específico de SPCA. Los valores de  $IC_{50}$  del bis-fenol para SPCA1d y SERCA2b fueron de  $0,013 \mu\text{M}$  y  $62 \mu\text{M}$ , respectivamente (Lai y Michelangeli, 2012). Sin embargo, en una serie de experimentos realizados por nosotros (no mostrados) estudiamos el efecto del bis-fenol (generosamente suministrado por el Dr. Michelangeli, *University of Birmingham, Great Britain*) sobre la captación en el cGo y tGo sin observar efecto ninguno. Esta discrepancia es desconcertante y la única diferencia que se nos ocurre entre nuestros protocolos y los usados por Lai y Michelangeli, es que ellos midieron actividad ATPasa, mientras que nosotros hemos medido transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ .

En los experimentos con células permeabilizadas encontramos también diferencias en las velocidades de captación de  $\text{Ca}^{2+}$  entre los tres depósitos, siendo mayor (2-3 veces) en el RE ( $120 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ , aprox.) que en el Go (**Fig. R13**). Estos hallazgos apuntan a que, tanto el RE como el Go, son depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  distintos y de estructura muy definida. El Go presenta, a su vez, características diferentes en sus lados *cis* y *trans*. Un punto importante es la sensibilidad a agonistas liberadores de  $\text{Ca}^{2+}$ . En el cGo es la primera vez que se documenta esta cuestión, mientras que en el tGo se había propuesto previamente la existencia de  $\text{IP}_3\text{R}$  y  $\text{RyR}$ , aunque es un tema controvertido (Lissandron y cols., 2010; Pinton y cols., 1998). En nuestras manos, de los experimentos en células intactas podemos deducir que existen ambos tipos de receptores en el tGo y el cGo, ya que tanto el ATP, que activa los  $\text{IP}_3\text{Rs}$ , como la cafeína, que activa los  $\text{RyRs}$ , producen una liberación similar en el RE, el cGo y el tGo (**Fig. R12**). Por otra parte, en los experimentos con células permeabilizadas de los tres mensajeros intracelulares estudiados el ( $\text{IP}_3$ , el NAADP y el cADPr) solamente el  $\text{IP}_3$  fue capaz de liberar  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares, comportándose los tres depósitos el (RE, el cGo y el tGo) de forma similar (**Fig. R13**). La liberación inducida por el  $\text{IP}_3$  fue casi completa en los tres casos (**Fig. R13**).

Los consumos de aequorina en el equilibrio, nos permiten estimar el tamaño de los depósitos involucrados en la captación de  $\text{Ca}^{2+}$ . La aequorina consumida nos traza, entonces, los compartimentos que han tenido  $\text{Ca}^{2+}$  en su interior. De esta manera, cuando dejamos que los depósitos se rellenen con una  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  de  $100 \text{ nM}$  (similar a la que se encuentra en condiciones fisiológicas), se consume toda la aequorina del RE, el cGo y el tGo. Si bloqueamos la SERCA con Tg o con TBH se

## 5. DISCUSIÓN.

---

evita totalmente el consumo en el RE y el cGo, pero no en el tGo (**Fig. R15 y R16**), indicando que existe en este último compartimento un mecanismo de transporte distinto. En presencia de Tg (o TBH) se consume solamente el 20 % de la aequorina del tGo y el consumo sigue una exponencial cuya asíntota corresponde a este valor (**Fig. R15B y R15C**; véase también el resto de los paneles en la **Fig. R15 y R16**).

Debemos concluir entonces que el mecanismo de captación de  $\text{Ca}^{2+}$  resistente a la Tg es distintivo del tGo, ya que es prácticamente inexistente en el RE y muy reducido en el cGo, donde puede apreciarse, no obstante, algún consumo residual (**Fig. R15B**), que aumenta cuando se aumenta la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  a 500 nM, maniobra que no tiene ningún efecto en el tGo. Una posible explicación al comportamiento en el cGo es que, como compartimento de transición entre el RE y el tGo, la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  en este compartimento esté gobernada por más de un ATPasa (Behne y cols., 2003; Pizzo y cols., 2011) o, simplemente, que esté tenuemente comunicado con el tGo, de modo que el  $\text{Ca}^{2+}$  captado pueda difundir lentamente desde el tGo al cGo. Sin embargo, esta posibilidad no parece probable porque si los dos compartimentos estuviesen comunicados, debería observarse también un aumento del consumo en el tGo al aumentar  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , cosa que no se ve (**Fig. R15B; Fig. R16A**). Lo que es claro es que cuando se inhibe la SERCA con Tg o TBH, la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el tGo es, a concentraciones fisiológicas de  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  (100 nM), 10-100 veces mayor que en el RE o el cGo, alcanzándose concentraciones cercanas a 200  $\mu\text{M}$ , (entre 100 y 300  $\mu\text{M}$  dependiendo del experimento: **Figs. R12, R13, R17, R18**). La velocidad inicial a través de este componente resistente a Tg es también mucho más rápida en el tGo que en el RE o el cGo, alcanzándose cifras de 50-150  $\mu\text{M}/\text{min}$  en varios experimentos (**Figs. R17B y 17D**).

Los valores de  $[\text{Ca}^{2+}]$  que nosotros estimamos en el tGo en esta fracción resistente a Tg son el doble a los obtenidos en otro laboratorio utilizando una sonda de similares características y dirigida a este compartimento (Vanoevelen y cols., 2004), pero la concentración de Tg usada por Vanoevelen y cols. fue de 10  $\mu\text{M}$ , 500 veces superior a la nuestra y capaz de inhibir nuestro componente “resistente a Tg” (**Fig. R14**). Por otro lado, nuestra estimación está corregida para el tamaño de cada compartimento (en el caso del compartimento resistente a la Tg, aproximadamente 20% del total de las cuentas (**Fig. R15B**)).

¿Cuál podría ser la base estructural que justifique las diferencias de almacenamiento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular entre RE, cGo y tGo? Nuestros datos indican claramente que, en el tGo además de SERCA existe otra bomba de  $\text{Ca}^{2+}$ , que no se expresa a niveles significativos en el RE (**Fig. R12, R14, R15, y R17**).

La presencia de SPCA podría explicar las propiedades biofísicas de la captación en este compartimento y sería concordante con los datos bioquímicos publicados en otros laboratorios (Lissandron y cols., 2010; Missiaen y cols., 2007; Van Baelen y cols., 2003; Vangheluwe y cols., 2009; von Blume y cols., 2011). En las células humanas, se han clonado dos genes diferentes que codifican para SPCA, ATP2C1 y ATP2C2. El gen ATP2C1 se localiza en el cromosoma 3 y por *splicing*, genera 4 isoformas de SPCA1 (Hu y cols., 2000b; Sudbrak y cols., 2000). El gen ATP2C2 se localiza en el cromosoma 16 y codifica la SPCA2 (Vanoevelen y cols., 2005a; Xiang y cols., 2005). Las dos SPCAs difieren de la SERCA, además de la ya mencionada sensibilidad a Tg, en que solo tienen un sitio de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ . Además de esto, las SPCAs también transportan  $\text{Mn}^{2+}$  con alta afinidad y esta propiedad representa una diferencia funcional importante con las SERCAs (Vangheluwe y cols., 2009.)

Otra diferencia que encontramos entre el bombeo de  $\text{Ca}^{2+}$  resistente a Tg en tGo y los otros compartimentos, cGo y RE, es la afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$ , que es mayor en el tGo. Así, al utilizar 20 nM de  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , una concentración a la que prácticamente no hay captación en el RE y ni en el cGo, la acumulación en el tGo se mantiene relativamente alta, por encima de 100  $\mu\text{M}$  (**Fig R20**). La comparación directa de las cinéticas de captación a distintas concentraciones de  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  del componente sensible a Tg del RE y del componente resistente a la Tg del tGo (**Fig. R20B**) mostraron que la afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$  de este último es mucho mayor, con una  $K_{50}$  cercana a 30 nM comparada con 170 nM para el RE. Estos datos son concordantes con los publicados para la actividad ATPasa, donde se ha propuesto una mayor afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$  para la SPCA que para la SERCA (Dode y cols., 2005; Vangheluwe y cols., 2009)

Los experimentos de silenciamiento de SPCA1 nos han permitido ratificar el mecanismo molecular responsable de la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  resistente a Tg en el tGo. Nuestros resultados con siRNA para la SPCA demuestran que prácticamente se abole la recaptación de  $\text{Ca}^{2+}$  del componente resistente a Tg del tGo (**Fig. R21B**). Así, la  $[\text{Ca}^{2+}]_{tGo}$  en el equilibrio y la velocidad inicial de recaptación de  $\text{Ca}^{2+}$  presentan una disminución de aproximadamente un 98%. En el cGo la recaptación resistente a Tg fue mucho menor que en el tGo, pero se redujo también por el tratamiento con siRNA (**Fig. R21C**). En conjunto, nuestros resultados demuestran que la captación resistente a Tg que se encuentra en el tGo está mediada por la SPCA1.

¿Cuál es la relevancia funcional de esta heterogeneidad en la distribución de ATPasas en los distintos compartimentos del Go?

## 5. DISCUSIÓN.

---

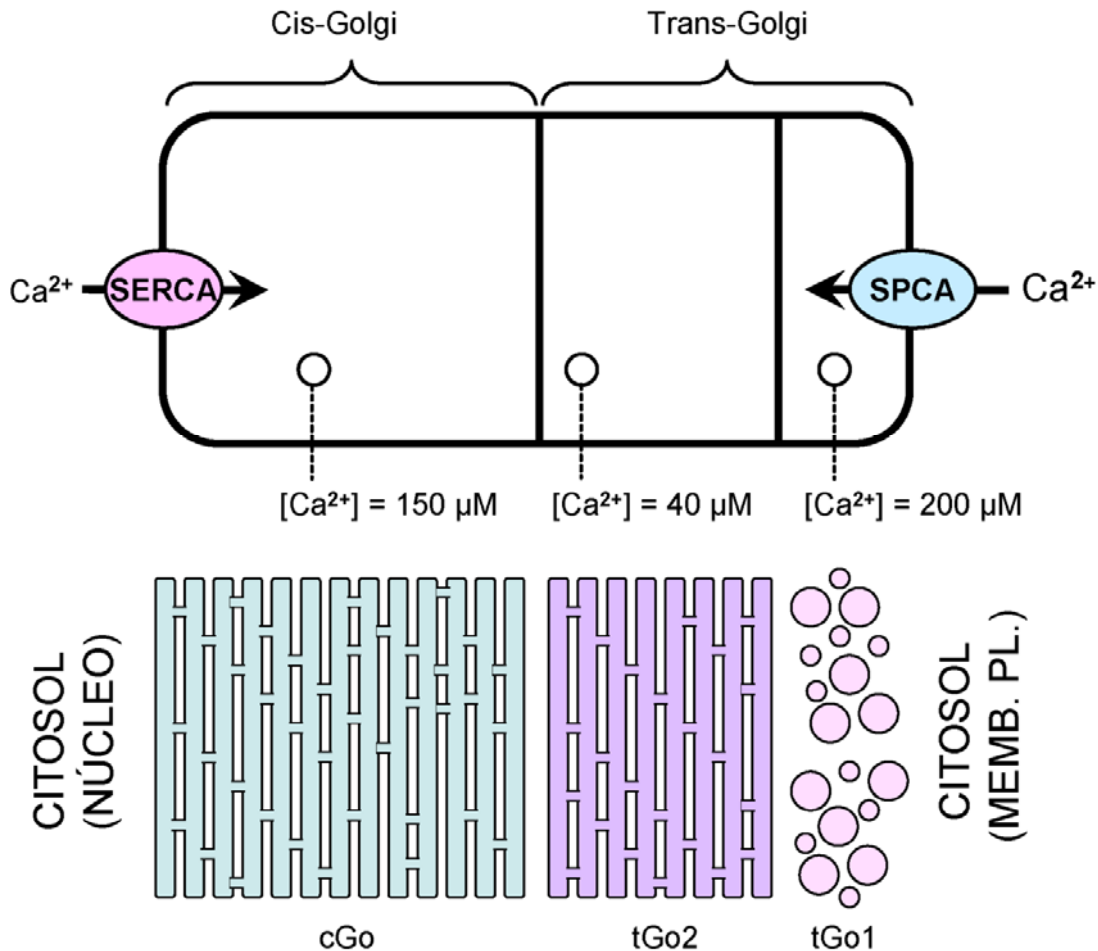
Se ha postulado que la actividad de la SPCA1 es requisito indispensable para la correcta clasificación y transporte de proteínas en el tGo mediante la interacción con una proteína citoplasmática llamada ADF/Cofilina. El silenciamiento de SPCA1 con siRNA induce la retención de proteínas de secreción en el TGN (von Blume y cols., 2011). En otro laboratorio también se ha observado que el silenciamiento de SPCA1 reduce el tráfico de proteínas RE-Go-membrana plasmática (Lissandron y cols., 2010). En experimentos preliminares realizados en nuestro laboratorio con una línea celular de HeLa que expresa de forma estable la peroxidasa del rábano (HRP) (von Blume y cols., 2011) obtenemos resultados coherentes con las observaciones mencionadas más arriba. Así, el tratamiento con Tg 20 nM, que bloquea completamente la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  en RE, pero no en tGo, inhibe poco la secreción de HRP; pero si se combina con la ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , que probablemente induce un vaciamiento mayor de tGo, inhibe intensamente la secreción. De estas observaciones se puede especular que el relleno de  $\text{Ca}^{2+}$  del compartimento de  $\text{Ca}^{2+}$  resistente a Tg y enriquecido en SPCA1 es necesario para que ocurra la secreción de proteínas. Por otro lado, el hecho de que el tGo (y la SPCA) tenga mayor afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$  que el RE (y la SERCA) puede tener sus implicaciones funcionales, de modo que aún en condiciones de baja  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , que ocasionan vaciamiento del RE, el tGo mantendría mejor su contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  y, en consecuencia, su función en el procesamiento de proteínas.

En resumen, podemos concluir que hemos detectado y caracterizado un compartimento de  $\text{Ca}^{2+}$  distinto en el tGo con las siguientes características: i) es resistente a los inhibidores clásicos de SERCA (Tg y TBH) (**Figs. R15B y R15C**), ii) alberga una  $[\text{Ca}^{2+}]$  alta, de aproximadamente 200  $\mu\text{M}$  (**Figs. R17A y R17C**); iii) la cinética de captación de  $\text{Ca}^{2+}$  concuerda con los valores de afinidad de la SPCA ( $K_d = 40$  nM, **Tabla 2**) y iv) se abole por silenciamiento de la SPCA1. La información disponible en la literatura (Lissandron y cols., 2010; von Blume y cols., 2011) y nuestros resultados preliminares (**Fig. R22**) sugieren que el adecuado relleno de  $\text{Ca}^{2+}$  de este subcompartimento del tGo es crucial para la secreción de proteínas.

La **figura D2** resume un modelo simplificado de nuestras propuestas acerca de la estructura funcional y la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  de las dos zonas principales, *cis* y *trans*, que componen esta compleja estructura. El cGo tiene características funcionales similares a las del RE: es un compartimento de alto  $\text{Ca}^{2+}$  (aunque la concentración es solo 1/3 de la del RE) y su bombeo de  $\text{Ca}^{2+}$  es llevado a cabo por la SERCA. El tGo es un compartimento heterogéneo compuesto de 2 subcompartimentos. Una fracción del 20-25% contiene la SPCA1, que utiliza para el bombeo de  $\text{Ca}^{2+}$  (tGo1 en la figura). Por este motivo, tGo1 es resistente a la

TBH y a la Tg (a concentraciones de 20 nM, aunque puede inhibirse por concentraciones extremadamente altas de Tg,  $\geq 1 \mu\text{M}$ ).

### Compartimentos funcionales del Aparato de Golgi



**Figura D2. Modelo Go en células HeLa.**

El compartimento tGo1 tiene un alto contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  (alrededor de 200 nM). La otra fracción de tGo, tGo2, comprende el 80% de tGo, y tiene un contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  menor (del orden de 40  $\mu\text{M}$ ). Sus mecanismos de bombeo son muy débiles (**Figs. R18 y R19**), de ahí que se alcance un contenido menor en el estado estacionario. Parece que no hay comunicación (difusión de  $\text{Ca}^{2+}$ ) entre tGo1 y tGo2, pues puede rellenarse tGo1 (por ejemplo en presencia de TBH) sin relleno aparente de tGo2 (**Fig. R18**). Tal como se representa esquemáticamente en la **figura D2**, nos imaginamos cGo como una pila de cisternas comunicadas entre sí y aisladas de un segundo sistema de cisternas (tGo2) también comunicadas entre sí. Finalmente, nos imaginamos tGo1 como un



## 5. DISCUSIÓN.

---

sistema de vesículas sin conexión con tGo2. La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en cada uno de estos subcompartimentos se mantendría independientemente. Mención especial merece el tGo1, que por poseer una ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  de mayor afinidad (SPCA1) mantendría más tenazmente su alto contenido de  $\text{Ca}^{2+}$ , con cierta independencia de los cambios de  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , preservándose así el procesamiento de las proteínas. Todos los compartimentos del Go contienen receptores/canales de  $\text{IP}_3$  que pueden liberar esencialmente todo el  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado en su matriz (**Fig. R13**). Pueden, por tanto, participar en respuestas fisiológicas mediadas por  $\text{Ca}^{2+}$  a través de esta vía de señalización. Tanto cGo como tGo poseen también RyRs, que producen una liberación incompleta de  $\text{Ca}^{2+}$ , de aproximadamente el 50% del  $\text{Ca}^{2+}$  contenido. Sin embargo, no encontramos receptores funcionales para NAADP o cADPR.

**6 CONCLUSIONES.**

- 1) Se han desarrollado y caracterizado tres nuevas sondas de  $\text{Ca}^{2+}$  derivadas de la fotoproteína aequorina que hacen posible estudiar la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  en el aparato de Golgi (Go) en células vivas, tanto en el lado *cis* (cGo) como en el *trans* (tGo). Estas sondas permiten medidas tanto en poblaciones celulares por bioluminiscencia como en célula única por fluorescencia. Se han generado además tres líneas estables de células HeLa que expresan las 3 nuevas sondas del Go y otra que expresa la sonda para el retículo endoplásmico (RE) desarrollada anteriormente en nuestro laboratorio. Estas líneas son una herramienta muy útil para estudiar en profundidad la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  en estos dos orgánulos.
- 2) Los depósitos intracelulares de calcio del retículo endoplásmico (RE) de las células HEK293 son heterogéneos en el bombeo de  $\text{Ca}^{2+}$ . Aparte de SERCA2b contienen SERCA3d, que genera un componente de la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  que es insensible a la tert-butilhidroquinona (TBH). Ambos subcompartimentos poseen receptores de  $\text{IP}_3$ . Las células HeLa expresan SERCA3d muy escasamente (20 veces menos que las HEK293) y tampoco muestran captación de  $\text{Ca}^{2+}$  resistente a TBH en su RE, de modo que el depósito de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE es homogéneo en las células HeLa.
- 3) Hemos estudiado con gran detalle el aparato de Golgi (Go) en las células HeLa. El Go acumula  $\text{Ca}^{2+}$  tanto en su lado *cis* (cGo) como en el *trans* (tGo), y es capaz de liberarlo tanto por activación de receptores de  $\text{IP}_3$  como de rianodina. El uso de las sondas de  $\text{Ca}^{2+}$  desarrolladas aquí ha permitido poner de manifiesto las similitudes y diferencias funcionales de cGo y tGo y compararlas con el comportamiento del RE.
- 4) El cGo es un compartimento homogéneo, capaz de acumular  $\text{Ca}^{2+}$  a concentraciones próximas a 150  $\mu\text{M}$  vía SERCA2 y con muy poca expresión funcional de SPCA1.
- 5) El tGo está compuesto por dos subcompartimentos diferentes, tGo1 y tGo2, que pueden distinguirse por: i) la inhibición del tGo1 con taspargina o TBH; ii) el consumo de la aequorina contenida en tGo1 por preincubación en presencia  $\text{Ca}^{2+}$  y TBH; o iii) el bloqueo de la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el tGo1 por el silenciamiento de SPCA1 con siRNA. No hay difusión de  $\text{Ca}^{2+}$  entre tGo1 y tGo2.

## **6. CONCLUSIONES.**

---

- 6) El compartimento tGo1 contiene aproximadamente el 25 % de la aequorina del tGo, posee actividad SPCA y acumula  $\text{Ca}^{2+}$  a gradientes cercanos a 200  $\mu\text{M}$ . La matriz de tGo1 no tiene continuidad difusional con tGo2, por lo que pensamos que podría estar compuesto por vesículas situadas en el extremo más *trans* del aparato de Golgi.
- 7) El compartimento tGo2 contiene el 75 % de la aequorina del tGo, no contiene SPCA1, y tiene una capacidad de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  relativamente baja a través de SERCA. Desarrolla gradientes de  $\text{Ca}^{2+}$  modestos (40  $\mu\text{M}$ ) y lo consideramos como un compartimento de transición entre cGo y tGo1.
- 8) La captación de  $\text{Ca}^{2+}$  por tGo1 es de mucha mayor afinidad que en el RE o de los otros compartimentos de Go, por lo que este reservorio es capaz de mantener alto su contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  incluso cuando baja el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico a niveles que ocasionan el vaciamiento de los otros depósitos intracelulares. El mantenimiento del alto contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  en este compartimento parece esencial para el procesamiento de proteínas en el Go.

## 7 REFERENCIAS.

- Albensi, B.C. (2007). The NMDA receptor/ion channel complex: a drug target for modulating synaptic plasticity and excitotoxicity. *Curr Pharm Des* 13, 3185-3194.
- Alonso, M.T., Barrero, M.J., Carnicero, E., Montero, M., Garcia-Sancho, J., and Alvarez, J. (1998). Functional measurements of  $[Ca^{2+}]$  in the endoplasmic reticulum using a herpes virus to deliver targeted aequorin. *Cell Calcium* 24, 87-96.
- Alonso, M.T., Barrero, M.J., Michelena, P., Carnicero, E., Cuchillo, I., Garcia, A.G., Garcia-Sancho, J., Montero, M., and Alvarez, J. (1999).  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release in chromaffin cells seen from inside the ER with targeted aequorin. *J Cell Biol* 144, 241-254.
- Alonso, M.T., Villalobos, C., Chamero, P., Alvarez, J., and Garcia-Sancho, J. (2006). Calcium microdomains in mitochondria and nucleus. *Cell Calcium* 40, 513-525.
- Altimimi, H.F., and Schnetkamp, P.P. (2007).  $Na^{+}/Ca^{2+}-K^{+}$  exchangers (NCKX): functional properties and physiological roles. *Channels (Austin)* 1, 62-69.
- Alvarez, J., and Montero, M. (2002). Measuring  $[Ca^{2+}]$  in the endoplasmic reticulum with aequorin. *Cell Calcium* 32, 251-260.
- Alvarez, J., Montero, M., and Garcia-Sancho, J. (1999). Subcellular  $Ca^{2+}$  Dynamics. *News Physiol Sci* 14, 161-168.
- Ambudkar, I.S., Ong, H.L., Liu, X., Bandyopadhyay, B.C., and Cheng, K.T. (2007). TRPC1: the link between functionally distinct store-operated calcium channels. *Cell Calcium* 42, 213-223.
- Appenzeller-Herzog, C., and Hauri, H.P. (2006). The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. *J Cell Sci* 119, 2173-2183.
- Babcock, D.F., Herrington, J., Goodwin, P.C., Park, Y.B., and Hille, B. (1997). Mitochondrial participation in the intracellular  $Ca^{2+}$  network. *J Cell Biol* 136, 833-844.
- Barrans, J.D., Allen, P.D., Stamatou, D., Dzau, V.J., and Liew, C.C. (2002). Global gene expression profiling of end-stage dilated cardiomyopathy using a human cardiovascular-based cDNA microarray. *Am J Pathol* 160, 2035-2043.
- Baughman, J.M., Perocchi, F., Girgis, H.S., Plovanich, M., Belcher-Timme, C.A., Sancak, Y., Bao, X.R., Strittmatter, L., Goldberger, O., Bogorad, R.L., *et al.* (2011). Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 476, 341-345.
- Baumann, O., and Walz, B. (2001). Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. *Int Rev Cytol* 205, 149-214.
- Behne, M.J., Tu, C.L., Aronchik, I., Epstein, E., Bench, G., Bikle, D.D., Pozzan, T., and Mauro, T.M. (2003). Human keratinocyte ATP2C1 localizes to the Golgi and controls Golgi  $Ca^{2+}$  stores. *J Invest Dermatol* 121, 688-694.
- Ben-Amor, N., Redondo, P.C., Bartegi, A., Pariente, J.A., Salido, G.M., and Rosado, J.A. (2006). A role for 5,6-epoxyeicosatrienoic acid in calcium entry by de novo conformational coupling in human platelets. *J Physiol* 570, 309-323.
- Benaim, G., Zurini, M., and Carafoli, E. (1984). Different conformational states of the purified  $Ca^{2+}$ -ATPase of the erythrocyte plasma membrane revealed by controlled trypsin proteolysis. *J Biol Chem* 259, 8471-8477.
- Berg, T.O., Stromhaug, P.E., Berg, T., and Seglen, P.O. (1994). Separation of lysosomes and autophagosomes by means of glycyL-phenylalanine-naphthylamide, a lysosome-disrupting cathepsin-C substrate. *Eur J Biochem* 221, 595-602.
- Bernardi, P., and Rasola, A. (2007). Calcium and cell death: the mitochondrial connection. *Subcell Biochem* 45, 481-506.

## **7. REFERENCIAS.**

---

- Berridge, M.J. (1997). Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Physiol* *499 (Pt 2)*, 291-306.
- Berridge, M.J. (2002). The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium* *32*, 235-249.
- Berridge, M.J. (2012). *Cell Signaling*.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., and Roderick, H.L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* *4*, 517-529.
- Berridge, M.J., and Irvine, R.F. (1984). Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* *312*, 315-321.
- Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* *1*, 11-21.
- Bers, D.M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* *415*, 198-205.
- Bers, D.M., Patton, C.W., and Nuccitelli, R. (1994). A practical guide to the preparation of Ca<sup>2+</sup> buffers. *Methods Cell Biol* *40*, 3-29.
- Bezin, S., Charpentier, G., Fossier, P., and Cancela, J.M. (2006). The Ca<sup>2+</sup>-releasing messenger NAADP, a new player in the nervous system. *J Physiol Paris* *99*, 111-118.
- Bezprozvanny, I., Watras, J., and Ehrlich, B.E. (1991). Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature* *351*, 751-754.
- Bird, G.S., Aziz, O., Lievreumont, J.P., Wedel, B.J., Trebak, M., Vazquez, G., and Putney, J.W., Jr. (2004). Mechanisms of phospholipase C-regulated calcium entry. *Curr Mol Med* *4*, 291-301.
- Blaustein, M.P., and Hodgkin, A.L. (1969). The effect of cyanide on the efflux of calcium from squid axons. *J Physiol* *200*, 497-527.
- Blondel, O., Moody, M.M., Depaoli, A.M., Sharp, A.H., Ross, C.A., Swift, H., and Bell, G.I. (1994). Localization of inositol trisphosphate receptor subtype 3 to insulin and somatostatin secretory granules and regulation of expression in islets and insulinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 7777-7781.
- Bobe, R., Bredoux, R., Corvazier, E., Andersen, J.P., Clausen, J.D., Dode, L., Kovacs, T., and Enouf, J. (2004). Identification, expression, function, and localization of a novel (sixth) isoform of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase 3 gene. *J Biol Chem* *279*, 24297-24306.
- Bootman, M.D., Berridge, M.J., and Roderick, H.L. (2002). Calcium signalling: more messengers, more channels, more complexity. *Curr Biol* *12*, R563-565.
- Bouchard, R., Pattarini, R., and Geiger, J.D. (2003). Presence and functional significance of presynaptic ryanodine receptors. *Prog Neurobiol* *69*, 391-418.
- Bradley, J., Reisert, J., and Frings, S. (2005). Regulation of cyclic nucleotide-gated channels. *Curr Opin Neurobiol* *15*, 343-349.
- Brailoiu, E., Churamani, D., Cai, X., Schlaue, M.G., Brailoiu, G.C., Gao, X., Hooper, R., Boulware, M.J., Dun, N.J., Marchant, J.S., *et al.* (2009). Essential requirement for two-pore channel 1 in NAADP-mediated calcium signaling. *J Cell Biol* *186*, 201-209.
- Brini, M., and Carafoli, E. (2009). Calcium pumps in health and disease. *Physiol Rev* *89*, 1341-1378.
- Brini, M., Marsault, R., Bastianutto, C., Alvarez, J., Pozzan, T., and Rizzuto, R. (1995). Transfected aequorin in the measurement of cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>). A critical evaluation. *J Biol Chem* *270*, 9896-9903.
- Brinkmeier, H. (2011). TRP channels in skeletal muscle: gene expression, function and implications for disease. *Adv Exp Med Biol* *704*, 749-758.

- Brouland, J.P., Gelebart, P., Kovacs, T., Enouf, J., Grossmann, J., and Papp, B. (2005). The loss of sarco/endoplasmic reticulum calcium transport ATPase 3 expression is an early event during the multistep process of colon carcinogenesis. *Am J Pathol* 167, 233-242.
- Buck, E., Zimanyi, I., Abramson, J.J., and Pessah, I.N. (1992). Ryanodine stabilizes multiple conformational states of the skeletal muscle calcium release channel. *J Biol Chem* 267, 23560-23567.
- Burgoyne, R.D., and Weiss, J.L. (2001). The neuronal calcium sensor family of Ca<sup>2+</sup>-binding proteins. *Biochem J* 353, 1-12.
- Burns, K., Atkinson, E.A., Bleackley, R.C., and Michalak, M. (1994). Calreticulin: from Ca<sup>2+</sup> binding to control of gene expression. *Trends Cell Biol* 4, 152-154.
- Cahalan, M.D. (2009). STIMulating store-operated Ca(2+) entry. *Nat Cell Biol* 11, 669-677.
- Cai, W., Hisatsune, C., Nakamura, K., Nakamura, T., Inoue, T., and Mikoshiba, K. (2004). Activity-dependent expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 in hippocampal neurons. *J Biol Chem* 279, 23691-23698.
- Calcraft, P.J., Ruas, M., Pan, Z., Cheng, X., Arredouani, A., Hao, X., Tang, J., Rietdorf, K., Teboul, L., Chuang, K.T., *et al.* (2009). NAADP mobilizes calcium from acidic organelles through two-pore channels. *Nature* 459, 596-600.
- Callewaert, G., Parys, J.B., De Smedt, H., Raeymaekers, L., Wuytack, F., Vanoevelen, J., Van Baelen, K., Simoni, A., Rizzuto, R., and Missiaen, L. (2003). Similar Ca(2+)-signaling properties in keratinocytes and in COS-1 cells overexpressing the secretory-pathway Ca(2+)-ATPase SPCA1. *Cell Calcium* 34, 157-162.
- Camello, C., Lomax, R., Petersen, O.H., and Tepikin, A.V. (2002). Calcium leak from intracellular stores--the enigma of calcium signalling. *Cell Calcium* 32, 355-361.
- Cancela, J.M. (2001). Specific Ca<sup>2+</sup> signaling evoked by cholecystokinin and acetylcholine: the roles of NAADP, cADPR, and IP3. *Annu Rev Physiol* 63, 99-117.
- Cancela, J.M., Gerasimenko, O.V., Gerasimenko, J.V., Tepikin, A.V., and Petersen, O.H. (2000). Two different but converging messenger pathways to intracellular Ca(2+) release: the roles of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate, cyclic ADP-ribose and inositol trisphosphate. *EMBO J* 19, 2549-2557.
- Carafoli, E. (1994). Biogenesis: plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme. *FASEB J* 8, 993-1002.
- Carafoli, E. (2004). Calcium-mediated cellular signals: a story of failures. *Trends Biochem Sci* 29, 371-379.
- Carafoli, E., and Brini, M. (2000). Calcium pumps: structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport. *Curr Opin Chem Biol* 4, 152-161.
- Carafoli, E., Santella, L., Branca, D., and Brini, M. (2001). Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 36, 107-260.
- Carafoli, E., Weiland, S., and Lehninger, A.L. (1965). Active Accumulation of Sr<sup>2+</sup> by Rat-Liver Mitochondria. I. General Features. *Biochim Biophys Acta* 97, 88-98.
- Catterall, W.A. (1991). Functional subunit structure of voltage-gated calcium channels. *Science* 253, 1499-1500.
- Catterall, W.A. (2011). Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a003947.
- Catterall, W.A., Perez-Reyes, E., Snutch, T.P., and Striessnig, J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 57, 411-425.
- Cavallini, L., Coassin, M., and Alexandre, A. (1995). Two classes of agonist-sensitive Ca<sup>2+</sup> stores in platelets, as identified by their differential sensitivity to 2,5-di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone and thapsigargin. *Biochem J* 310 ( Pt 2), 449-452.

## 7. REFERENCIAS.

---

- Clapham, D.E. (2007). Calcium signaling. *Cell* *131*, 1047-1058.
- Contractor, A., Mulle, C., and Swanson, G.T. (2011). Kainate receptors coming of age: milestones of two decades of research. *Trends Neurosci* *34*, 154-163.
- Csordas, G., Renken, C., Varnai, P., Walter, L., Weaver, D., Buttle, K.F., Balla, T., Mannella, C.A., and Hajnoczky, G. (2006). Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J Cell Biol* *174*, 915-921.
- Chamero, P., Manjarres, I.M., Garcia-Verdugo, J.M., Villalobos, C., Alonso, M.T., and Garcia-Sancho, J. (2008). Nuclear calcium signaling by inositol trisphosphate in GH3 pituitary cells. *Cell Calcium* *43*, 205-214.
- Chandra, S., Kable, E.P., Morrison, G.H., and Webb, W.W. (1991). Calcium sequestration in the Golgi apparatus of cultured mammalian cells revealed by laser scanning confocal microscopy and ion microscopy. *J Cell Sci* *100 (Pt 4)*, 747-752.
- Chandrasekera, C.P., and Lytton, J. (2003). Inhibition of human SERCA3 by PL/IM430. Molecular analysis of the interaction. *J Biol Chem* *278*, 12482-12488.
- Churchill, G.C., Okada, Y., Thomas, J.M., Genazzani, A.A., Patel, S., and Galione, A. (2002). NAADP mobilizes Ca(2+) from reserve granules, lysosome-related organelles, in sea urchin eggs. *Cell* *111*, 703-708.
- D'Hondt, C., Ponsaerts, R., De Smedt, H., Vinken, M., De Vuyst, E., De Bock, M., Wang, N., Rogiers, V., Leybaert, L., Himpens, B., *et al.* (2011). Pannexin channels in ATP release and beyond: an unexpected rendezvous at the endoplasmic reticulum. *Cell Signal* *23*, 305-316.
- Dally, S., Monceau, V., Corvazier, E., Bredoux, R., Raies, A., Bobe, R., del Monte, F., and Enouf, J. (2009). Compartmentalized expression of three novel sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase 3 isoforms including the switch to ER stress, SERCA3f, in non-failing and failing human heart. *Cell Calcium* *45*, 144-154.
- De Smedt, F., Verjans, B., Mailloux, P., and Erneux, C. (1994). Cloning and expression of human brain type I inositol 1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase. High levels of mRNA in cerebellar Purkinje cells. *FEBS Lett* *347*, 69-72.
- De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabo, I., and Rizzuto, R. (2011). A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* *476*, 336-340.
- Deluca, H.F., and Engstrom, G.W. (1961). Calcium uptake by rat kidney mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* *47*, 1744-1750.
- Di Jeso, B., Pereira, R., Consiglio, E., Formisano, S., Satrustegui, J., and Sandoval, I.V. (1998). Demonstration of a Ca<sup>2+</sup> requirement for thyroglobulin dimerization and export to the golgi complex. *Eur J Biochem* *252*, 583-590.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., and Traynelis, S.F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* *51*, 7-61.
- Dode, L., Andersen, J.P., Raeymaekers, L., Missiaen, L., Vilsen, B., and Wuytack, F. (2005). Functional comparison between secretory pathway Ca<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup>-ATPase (SPCA) 1 and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA) 1 isoforms by steady-state and transient kinetic analyses. *J Biol Chem* *280*, 39124-39134.
- Dolmetsch, R.E., Pajvani, U., Fife, K., Spotts, J.M., and Greenberg, M.E. (2001). Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science* *294*, 333-339.
- Drahota, Z., Carafoli, E., Rossi, C.S., Gamble, R.L., and Lehninger, A.L. (1965). The Steady State Maintenance of Accumulated Ca<sup>++</sup> in Rat Liver Mitochondria. *J Biol Chem* *240*, 2712-2720.
- Du, G.G., Ashley, C.C., and Lea, T.J. (1996). Ca<sup>2+</sup> effluxes from the sarcoplasmic reticulum vesicles of frog muscle: effects of cyclopiazonic acid and thapsigargin. *Cell Calcium* *20*, 355-359.
- Du, G.G., Sandhu, B., Khanna, V.K., Guo, X.H., and MacLennan, D.H. (2002). Topology of the Ca<sup>2+</sup> release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum (RyR1). *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 16725-16730.

- Du, W., McMahon, T.J., Zhang, Z.S., Stiber, J.A., Meissner, G., and Eu, J.P. (2006). Excitation-contraction coupling in airway smooth muscle. *J Biol Chem* *281*, 30143-30151.
- Egan, T.M., Samways, D.S., and Li, Z. (2006). Biophysics of P2X receptors. *Pflugers Arch* *452*, 501-512.
- Egebjerg, J., and Heinemann, S.F. (1993). Ca<sup>2+</sup> permeability of unedited and edited versions of the kainate selective glutamate receptor GluR6. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 755-759.
- Emmanouilidou, E., Teschemacher, A.G., Pouli, A.E., Nicholls, L.I., Seward, E.P., and Rutter, G.A. (1999). Imaging Ca<sup>2+</sup> concentration changes at the secretory vesicle surface with a recombinant targeted cameleon. *Curr Biol* *9*, 915-918.
- Ertel, E.A., Campbell, K.P., Harpold, M.M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T.P., Tanabe, T., Birnbaumer, L., *et al.* (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* *25*, 533-535.
- Fabiato, A. (1983). Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol* *245*, C1-14.
- Faddy, H.M., Smart, C.E., Xu, R., Lee, G.Y., Kenny, P.A., Feng, M., Rao, R., Brown, M.A., Bissell, M.J., Roberts-Thomson, S.J., *et al.* (2008). Localization of plasma membrane and secretory calcium pumps in the mammary gland. *Biochem Biophys Res Commun* *369*, 977-981.
- Fonteriz, R.I., Sanchez, A., Mollinedo, F., Collado-Escobar, D., and Garcia-Sancho, J. (1991). The role of intracellular acidification in calcium mobilization in human neutrophils. *Biochim Biophys Acta* *1093*, 1-6.
- Forgac, M. (2007). Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol* *8*, 917-929.
- French, A.P., Mills, S., Swarup, R., Bennett, M.J., and Pridmore, T.P. (2008). Colocalization of fluorescent markers in confocal microscope images of plant cells. *Nat Protoc* *3*, 619-628.
- Gallione, A., Evans, A.M., Ma, J., Parrington, J., Arredouani, A., Cheng, X., and Zhu, M.X. (2009). The acid test: the discovery of two-pore channels (TPCs) as NAADP-gated endolysosomal Ca<sup>2+</sup> release channels. *Pflugers Arch* *458*, 869-876.
- Galvan, D.L., Borrego-Diaz, E., Perez, P.J., and Mignery, G.A. (1999). Subunit oligomerization, and topology of the inositol 1,4, 5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem* *274*, 29483-29492.
- Gerasimenko, J.V., Flowerdew, S.E., Voronina, S.G., Sukhomlin, T.K., Tepikin, A.V., Petersen, O.H., and Gerasimenko, O.V. (2006a). Bile acids induce Ca<sup>2+</sup> release from both the endoplasmic reticulum and acidic intracellular calcium stores through activation of inositol trisphosphate receptors and ryanodine receptors. *J Biol Chem* *281*, 40154-40163.
- Gerasimenko, J.V., Sherwood, M., Tepikin, A.V., Petersen, O.H., and Gerasimenko, O.V. (2006b). NAADP, cADPR and IP3 all release Ca<sup>2+</sup> from the endoplasmic reticulum and an acidic store in the secretory granule area. *J Cell Sci* *119*, 226-238.
- Girotti, M., and Banting, G. (1996). TGN38-green fluorescent protein hybrid proteins expressed in stably transfected eukaryotic cells provide a tool for the real-time, in vivo study of membrane traffic pathways and suggest a possible role for ratTGN38. *J Cell Sci* *109 (Pt 12)*, 2915-2926.
- Glick, B.S. (2000). Organization of the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol* *12*, 450-456.
- Glick, B.S., and Luini, A. (2011). Models for Golgi traffic: a critical assessment. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *3*, a005215.
- Goncalves, P.P., Meireles, S.M., Gravato, C., and Vale, M.G. (1998). Ca<sup>2+</sup>-H<sup>+</sup> antiport activity in synaptic vesicles isolated from sheep brain cortex. *Neurosci Lett* *247*, 87-90.
- Gorelick, F.S., and Shugrue, C. (2001). Exiting the endoplasmic reticulum. *Mol Cell Endocrinol* *177*, 13-18.



## 7. REFERENCIAS.

---

- Greeb, J., and Shull, G.E. (1989). Molecular cloning of a third isoform of the calmodulin-sensitive plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-transporting ATPase that is expressed predominantly in brain and skeletal muscle. *J Biol Chem* *264*, 18569-18576.
- Griesbeck, O., Baird, G.S., Campbell, R.E., Zacharias, D.A., and Tsien, R.Y. (2001). Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications. *J Biol Chem* *276*, 29188-29194.
- Griffiths, G., Pepperkok, R., Locker, J.K., and Kreis, T.E. (1995). Immunocytochemical localization of beta-COP to the ER-Golgi boundary and the TGN. *J Cell Sci* *108 (Pt 8)*, 2839-2856.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R.Y. (1985). A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* *260*, 3440-3450.
- Guinamard, R., Salle, L., and Simard, C. (2011). The non-selective monovalent cationic channels TRPM4 and TRPM5. *Adv Exp Med Biol* *704*, 147-171.
- Hadri, L., Pavoine, C., Lipskaia, L., Yacoubi, S., and Lompre, A.M. (2006). Transcription of the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase type 3 gene, ATP2A3, is regulated by the calcineurin/NFAT pathway in endothelial cells. *Biochem J* *394*, 27-33.
- Hamilton, S.L. (2005). Ryanodine receptors. *Cell Calcium* *38*, 253-260.
- Hammond, A.T., and Glick, B.S. (2000). Dynamics of transitional endoplasmic reticulum sites in vertebrate cells. *Mol Biol Cell* *11*, 3013-3030.
- Hao, L., Rigaud, J.L., and Inesi, G. (1994). Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> countertransport and electrogenicity in proteoliposomes containing erythrocyte plasma membrane Ca-ATPase and exogenous lipids. *J Biol Chem* *269*, 14268-14275.
- Hattori, M., Suzuki, A.Z., Higo, T., Miyauchi, H., Michikawa, T., Nakamura, T., Inoue, T., and Mikoshiba, K. (2004). Distinct roles of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor types 1 and 3 in Ca<sup>2+</sup> signaling. *J Biol Chem* *279*, 11967-11975.
- Hetzer, M.W., Walther, T.C., and Mattaj, I.W. (2005). Pushing the envelope: structure, function, and dynamics of the nuclear periphery. *Annu Rev Cell Dev Biol* *21*, 347-380.
- Hewavitharana, T., Deng, X., Soboloff, J., and Gill, D.L. (2007). Role of STIM and Orai proteins in the store-operated calcium signaling pathway. *Cell Calcium* *42*, 173-182.
- Hilden, S.A., and Madias, N.E. (1989). H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange in rabbit renal cortical endosomes. *J Membr Biol* *112*, 131-138.
- Hofer, A.M., Schlue, W.R., Curci, S., and Machen, T.E. (1995). Spatial distribution and quantitation of free luminal [Ca] within the InsP<sub>3</sub>-sensitive internal store of individual BHK-21 cells: ion dependence of InsP<sub>3</sub>-induced Ca release and reloading. *FASEB J* *9*, 788-798.
- Hu, Z., Bonifas, J.M., Beech, J., Bench, G., Shigihara, T., Ogawa, H., Ikeda, S., Mauro, T., and Epstein, E.H., Jr. (2000a). Mutations in ATP2C1, encoding a calcium pump, cause Hailey-Hailey disease. *Nature genetics* *24*, 61-65.
- Hu, Z., Bonifas, J.M., Beech, J., Bench, G., Shigihara, T., Ogawa, H., Ikeda, S., Mauro, T., and Epstein, E.H., Jr. (2000b). Mutations in ATP2C1, encoding a calcium pump, cause Hailey-Hailey disease. *Nat Genet* *24*, 61-65.
- Huang, H., Nagaraja, R.Y., Garside, M.L., Akemann, W., Knopfel, T., and Empson, R.M. (2010). Contribution of plasma membrane Ca ATPase to cerebellar synapse function. *World journal of biological chemistry* *1*, 95-102.
- Huettnner, J.E. (2003). Kainate receptors and synaptic transmission. *Prog Neurobiol* *70*, 387-407.
- Ichas, F., Jouaville, L.S., and Mazat, J.P. (1997). Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell* *89*, 1145-1153.

- Ivessa, N.E., De Lemos-Chiarandini, C., Gravotta, D., Sabatini, D.D., and Kreibich, G. (1995). The Brefeldin A-induced retrograde transport from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum depends on calcium sequestered to intracellular stores. *J Biol Chem* *270*, 25960-25967.
- Jardin, I., Ben Amor, N., Bartegi, A., Pariente, J.A., Salido, G.M., and Rosado, J.A. (2007). Differential involvement of thrombin receptors in Ca<sup>2+</sup> release from two different intracellular stores in human platelets. *Biochem J* *407*, 167-174.
- Johnson, J.D., Klausen, C., Habibi, H.R., and Chang, J.P. (2002). Function-specific calcium stores selectively regulate growth hormone secretion, storage, and mRNA level. *Am J Physiol Endocrinol Metab* *282*, E810-819.
- Jung, D.W., Baysal, K., and Brierley, G.P. (1995). The sodium-calcium antiport of heart mitochondria is not electroneutral. *J Biol Chem* *270*, 672-678.
- Juska, A., Jardin, I., and Rosado, J.A. (2008). Physical properties of two types of calcium stores and SERCAs in human platelets. *Mol Cell Biochem* *317*, 9-18.
- Kaczmarek-Hajek, K., Lorinczi, E., Hausmann, R., and Nicke, A. (2012). Molecular and functional properties of P2X receptors--recent progress and persisting challenges. *Purinergic Signal* *8*, 375-417.
- Kasri, N.N., Holmes, A.M., Bultynck, G., Parys, J.B., Bootman, M.D., Rietdorf, K., Missiaen, L., McDonald, F., De Smedt, H., Conway, S.J., *et al.* (2004). Regulation of InsP3 receptor activity by neuronal Ca<sup>2+</sup>-binding proteins. *EMBO J* *23*, 312-321.
- Kasri, N.N., Kocks, S.L., Verbert, L., Hebert, S.S., Callewaert, G., Parys, J.B., Missiaen, L., and De Smedt, H. (2006). Up-regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 is responsible for a decreased endoplasmic-reticulum Ca<sup>2+</sup> content in presenilin double knock-out cells. *Cell Calcium* *40*, 41-51.
- Kass, G.E., Duddy, S.K., Moore, G.A., and Orrenius, S. (1989). 2,5-Di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone rapidly elevates cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration by mobilizing the inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca<sup>2+</sup> pool. *J Biol Chem* *264*, 15192-15198.
- Khakh, B.S., and North, R.A. (2006). P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature* *442*, 527-532.
- Khosravani, H., and Zamponi, G.W. (2006). Voltage-gated calcium channels and idiopathic generalized epilepsies. *Physiol Rev* *86*, 941-966.
- Kim, J.H., Johannes, L., Goud, B., Antony, C., Lingwood, C.A., Daneman, R., and Grinstein, S. (1998). Noninvasive measurement of the pH of the endoplasmic reticulum at rest and during calcium release. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 2997-3002.
- Klumperman, J. (2000). Transport between ER and Golgi. *Curr Opin Cell Biol* *12*, 445-449.
- Klumperman, J., Schweizer, A., Clausen, H., Tang, B.L., Hong, W., Oorschot, V., and Hauri, H.P. (1998). The recycling pathway of protein ERGIC-53 and dynamics of the ER-Golgi intermediate compartment. *J Cell Sci* *111 (Pt 22)*, 3411-3425.
- Koller, A., Schlossmann, J., Ashman, K., Uttenweiler-Joseph, S., Ruth, P., and Hofmann, F. (2003). Association of phospholamban with a cGMP kinase signaling complex. *Biochem Biophys Res Commun* *300*, 155-160.
- Ladinsky, M.S., Mastrorarde, D.N., McIntosh, J.R., Howell, K.E., and Staehelin, L.A. (1999). Golgi structure in three dimensions: functional insights from the normal rat kidney cell. *J Cell Biol* *144*, 1135-1149.
- Lai, P., and Michelangeli, F. (2012). Bis(2-hydroxy-3-tert-butyl-5-methyl-phenyl)-methane (bis-phenol) is a potent and selective inhibitor of the secretory pathway Ca<sup>2+</sup>(+) ATPase (SPCA1). *Biochem Biophys Res Commun* *424*, 616-619.
- Lang, S., Erdmann, F., Jung, M., Wagner, R., Cavalie, A., and Zimmermann, R. (2011). Sec61 complexes form ubiquitous ER Ca<sup>2+</sup> leak channels. *Channels (Austin)* *5*, 228-235.

## 7. REFERENCIAS.

---

- Lanner, J.T., Georgiou, D.K., Joshi, A.D., and Hamilton, S.L. (2010). Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a003996.
- Lape, M., Elam, C., Versluis, M., Kempton, R., and Paula, S. (2008). Molecular determinants of sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase inhibition by hydroquinone-based compounds. *Proteins* 70, 639-649.
- Leonard, S., and Bertrand, D. (2001). Neuronal nicotinic receptors: from structure to function. *Nicotine Tob Res* 3, 203-223.
- Lev, S. (2010). Non-vesicular lipid transport by lipid-transfer proteins and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 739-750.
- Lewis, R.S. (2007). The molecular choreography of a store-operated calcium channel. *Nature* 446, 284-287.
- Li, Z., Matsuoka, S., Hryshko, L.V., Nicoll, D.A., Bersohn, M.M., Burke, E.P., Lifton, R.P., and Philipson, K.D. (1994). Cloning of the NCX2 isoform of the plasma membrane Na(+)-Ca2+ exchanger. *J Biol Chem* 269, 17434-17439.
- Lin, P., Yao, Y., Hofmeister, R., Tsien, R.Y., and Farquhar, M.G. (1999). Overexpression of CALNUP (nucleobindin) increases agonist and thapsigargin releasable Ca2+ storage in the Golgi. *J Cell Biol* 145, 279-289.
- Liou, J., Kim, M.L., Heo, W.D., Jones, J.T., Myers, J.W., Ferrell, J.E., Jr., and Meyer, T. (2005). STIM is a Ca2+ sensor essential for Ca2+-store-depletion-triggered Ca2+ influx. *Curr Biol* 15, 1235-1241.
- Lipp, P., Laine, M., Tovey, S.C., Burrell, K.M., Berridge, M.J., Li, W., and Bootman, M.D. (2000). Functional InsP3 receptors that may modulate excitation-contraction coupling in the heart. *Curr Biol* 10, 939-942.
- Lissandron, V., Podini, P., Pizzo, P., and Pozzan, T. (2010). Unique characteristics of Ca2+ homeostasis of the trans-Golgi compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 9198-9203.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Lopez, J.J., Camello-Almaraz, C., Pariente, J.A., Salido, G.M., and Rosado, J.A. (2005). Ca2+ accumulation into acidic organelles mediated by Ca2+- and vacuolar H+-ATPases in human platelets. *Biochem J* 390, 243-252.
- Low, W., Kasir, J., and Rahamimoff, H. (1993). Cloning of the rat heart Na(+)-Ca2+ exchanger and its functional expression in HeLa cells. *FEBS Lett* 376, 63-67.
- Lytton, J., Westlin, M., Burk, S.E., Shull, G.E., and MacLennan, D.H. (1992). Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *J Biol Chem* 267, 14483-14489.
- Llopis, J., McCaffery, J.M., Miyawaki, A., Farquhar, M.G., and Tsien, R.Y. (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.
- MacLennan, D.H., and Green, N.M. (2000). Structural biology. Pumping ions. *Nature* 405, 633-634.
- MacLennan, D.H., and Kranias, E.G. (2003). Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 566-577.
- Mangoni, M.E., and Nargeot, J. (2008). Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiol Rev* 88, 919-982.
- Manjarres, I.M., Chamero, P., Domingo, B., Molina, F., Llopis, J., Alonso, M.T., and Garcia-Sancho, J. (2008). Red and green aequorins for simultaneous monitoring of Ca2+ signals from two different organelles. *Pflugers Arch* 455, 961-970.
- Maranto, A.R. (1994). Primary structure, ligand binding, and localization of the human type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor expressed in intestinal epithelium. *J Biol Chem* 269, 1222-1230.
- Martin, V., Bredoux, R., Corvazier, E., Van Gorp, R., Kovacs, T., Gelebart, P., and Enouf, J. (2002). Three novel sarco/endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase (SERCA) 3 isoforms. Expression, regulation, and function of the membranes of the SERCA3 family. *J Biol Chem* 277, 24442-24452.

- Maruyama, Y., and Petersen, O.H. (1994). Delay in granular fusion evoked by repetitive cytosolic Ca<sup>2+</sup> spikes in mouse pancreatic acinar cells. *Cell Calcium* *16*, 419-430.
- Mason, M.J., Garcia-Rodriguez, C., and Grinstein, S. (1991). Coupling between intracellular Ca<sup>2+</sup> stores and the Ca<sup>2+</sup> permeability of the plasma membrane. Comparison of the effects of thapsigargin, 2,5-di-(tert-butyl)-1,4-hydroquinone, and cyclopiazonic acid in rat thymic lymphocytes. *J Biol Chem* *266*, 20856-20862.
- Meldolesi, J., and Pozzan, T. (1998). The heterogeneity of ER Ca<sup>2+</sup> stores has a key role in nonmuscle cell signaling and function. *J Cell Biol* *142*, 1395-1398.
- Mellman, I., and Warren, G. (2000). The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell* *100*, 99-112.
- Midgett, C.R., and Madden, D.R. (2008). The quaternary structure of a calcium-permeable AMPA receptor: conservation of shape and symmetry across functionally distinct subunit assemblies. *J Mol Biol* *382*, 578-584.
- Mignery, G.A., Sudhof, T.C., Takei, K., and De Camilli, P. (1989). Putative receptor for inositol 1,4,5-trisphosphate similar to ryanodine receptor. *Nature* *342*, 192-195.
- Miguel-Velado, E., Moreno-Dominguez, A., Colinas, O., Ciudad, P., Heras, M., Perez-Garcia, M.T., and Lopez-Lopez, J.R. (2005). Contribution of Kv channels to phenotypic remodeling of human uterine artery smooth muscle cells. *Circ Res* *97*, 1280-1287.
- Mironov, S.L. (2008). Metabotropic glutamate receptors activate dendritic calcium waves and TRPM channels which drive rhythmic respiratory patterns in mice. *J Physiol* *586*, 2277-2291.
- Missiaen, L., Dode, L., Vanoevelen, J., Raeymaekers, L., and Wuytack, F. (2007). Calcium in the Golgi apparatus. *Cell Calcium* *47*, 405-416.
- Missiaen, L., Raeymaekers, L., Dode, L., Vanoevelen, J., Van Baelen, K., Parys, J.B., Callewaert, G., De Smedt, H., Segaeert, S., and Wuytack, F. (2004a). SPCA1 pumps and Hailey-Hailey disease. *Biochem Biophys Res Commun* *322*, 1204-1213.
- Missiaen, L., Van Acker, K., Parys, J.B., De Smedt, H., Van Baelen, K., Weidema, A.F., Vanoevelen, J., Raeymaekers, L., Renders, J., Callewaert, G., *et al.* (2001). Baseline cytosolic Ca<sup>2+</sup> oscillations derived from a non-endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> store. *J Biol Chem* *276*, 39161-39170.
- Missiaen, L., Van Acker, K., Van Baelen, K., Raeymaekers, L., Wuytack, F., Parys, J.B., De Smedt, H., Vanoevelen, J., Dode, L., Rizzuto, R., *et al.* (2004b). 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.
- Miyakawa, T., Maeda, A., Yamazawa, T., Hirose, K., Kurosaki, T., and Iino, M. (1999). Encoding of Ca<sup>2+</sup> signals by differential expression of IP3 receptor subtypes. *EMBO J* *18*, 1303-1308.
- Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y., and Unwin, N. (2003). Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* *423*, 949-955.
- Montero, M., Alonso, M.T., Carnicero, E., Cuchillo-Ibanez, I., Albillos, A., Garcia, A.G., Garcia-Sancho, J., and Alvarez, J. (2000). Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transients that modulate secretion. *Nat Cell Biol* *2*, 57-61.
- Montero, M., Alvarez, J., Scheenen, W.J., Rizzuto, R., Meldolesi, J., and Pozzan, T. (1997). Ca<sup>2+</sup> homeostasis in the endoplasmic reticulum: coexistence of high and low [Ca<sup>2+</sup>] subcompartments in intact HeLa cells. *J Cell Biol* *139*, 601-611.
- Montero, M., Brini, M., Marsault, R., Alvarez, J., Sitia, R., Pozzan, T., and Rizzuto, R. (1995). Monitoring dynamic changes in free Ca<sup>2+</sup> concentration in the endoplasmic reticulum of intact cells. *EMBO J* *14*, 5467-5475.
- Moore, G.A., Kass, G.E., Duddy, S.K., Farrell, G.C., Llopis, J., and Orrenius, S. (1990). 2,5-Di(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone--a novel mobilizer of the inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca<sup>2+</sup> pool. *Free Radic Res Commun* *8*, 337-345.

## 7. REFERENCIAS.

---

- Morgan, A.J., Platt, F.M., Lloyd-Evans, E., and Galione, A. (2011). Molecular mechanisms of endolysosomal Ca<sup>2+</sup> signalling in health and disease. *Biochem J* 439, 349-374.
- Moriyama, Y., and Nelson, N. (1989). H<sup>+</sup>-translocating ATPase in Golgi apparatus. Characterization as vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase and its subunit structures. *J Biol Chem* 264, 18445-18450.
- Nakagawa, T. (2010). The biochemistry, ultrastructure, and subunit assembly mechanism of AMPA receptors. *Mol Neurobiol* 42, 161-184.
- Nakano, A., and Luini, A. (2010). Passage through the Golgi. *Curr Opin Cell Biol* 22, 471-478.
- Nicoll, D.A., Ottolia, M., Goldhaber, J.I., and Philipson, K.D. (2013). 20 years from NCX purification and cloning: milestones. *Adv Exp Med Biol* 961, 17-23.
- Nicoll, D.A., Quednau, B.D., Qui, Z., Xia, Y.R., Lusic, A.J., and Philipson, K.D. (1996). Cloning of a third mammalian Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger, NCX3. *J Biol Chem* 271, 24914-24921.
- Novikoff, P.M., Novikoff, A.M., Quintana, N., and Hauw, J.J. (1971). Golgi apparatus, GERL, and lysosomes of neurons in rat dorsal root ganglia, studied by thick section and thin section cytochemistry. *J Cell Biol* 50, 859-886.
- Nunez, L., Senovilla, L., Sanz-Blasco, S., Chamero, P., Alonso, M.T., Villalobos, C., and Garcia-Sancho, J. (2007). Bioluminescence imaging of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> dynamics in soma and neurites of individual adult mouse sympathetic neurons. *J Physiol* 580, 385-395.
- Ong, H.L., Liu, X., Tsaneva-Atanasova, K., Singh, B.B., Bandyopadhyay, B.C., Swaim, W.D., Russell, J.T., Hegde, R.S., Sherman, A., and Ambudkar, I.S. (2007). Relocalization of STIM1 for activation of store-operated Ca(2+) entry is determined by the depletion of subplasma membrane endoplasmic reticulum Ca(2+) store. *J Biol Chem* 282, 12176-12185.
- Paoletti, P., and Neyton, J. (2007). NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 7, 39-47.
- Papp, B., Enyedi, A., Paszty, K., Kovacs, T., Sarkadi, B., Gardos, G., Magnier, C., Wuytack, F., and Enouf, J. (1992). Simultaneous presence of two distinct endoplasmic-reticulum-type calcium-pump isoforms in human cells. Characterization by radio-immunoblotting and inhibition by 2,5-di-(t-butyl)-1,4-benzohydroquinone. *Biochem J* 288 ( Pt 1), 297-302.
- Parekh, A.B., and Penner, R. (1997). Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev* 77, 901-930.
- Park, M.K., Choi, Y.M., Kang, Y.K., and Petersen, O.H. (2008). The endoplasmic reticulum as an integrator of multiple dendritic events. *Neuroscientist* 14, 68-77.
- Patel, S., and Docampo, R. (2010). Acidic calcium stores open for business: expanding the potential for intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling. *Trends Cell Biol* 20, 277-286.
- Pegoraro, C., Pollet, N., and Monsoro-Burq, A.H. (2011). Tissue-specific expression of Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPases (ATP2A/SERCA) 1, 2, 3 during *Xenopus laevis* development. *Gene expression patterns : GEP* 11, 122-128.
- Peinelt, C., Vig, M., Koomoa, D.L., Beck, A., Nadler, M.J., Koblan-Huberson, M., Lis, A., Fleig, A., Penner, R., and Kinet, J.P. (2006). Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nat Cell Biol* 8, 771-773.
- Periasamy, M., and Kalyanasundaram, A. (2007). SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle Nerve* 35, 430-442.
- Perocchi, F., Gohil, V.M., Girgis, H.S., Bao, X.R., McCombs, J.E., Palmer, A.E., and Mootha, V.K. (2010). MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca(2+) uptake. *Nature* 467, 291-296.
- Pinton, P., Ferrari, D., Magalhaes, P., Schulze-Osthoff, K., Di Virgilio, F., Pozzan, T., and Rizzuto, R. (2000). Reduced loading of intracellular Ca(2+) stores and downregulation of capacitative Ca(2+) influx in Bcl-2-overexpressing cells. *J Cell Biol* 148, 857-862.

- Pinton, P., Pozzan, T., and Rizzuto, R. (1998). The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca<sup>2+</sup> store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *EMBO J* *17*, 5298-5308.
- Pizzo, P., Lissandron, V., Capitanio, P., and Pozzan, T. (2011). Ca<sup>2+</sup> signalling in the Golgi apparatus. *Cell Calcium* *50*, 184-192.
- Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P., and Meldolesi, J. (1994). Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev* *74*, 595-636.
- Prakriya, M., Feske, S., Gwack, Y., Srikanth, S., Rao, A., and Hogan, P.G. (2006). Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature* *443*, 230-233.
- Puthenveedu, M.A., and Linstedt, A.D. (2005). Subcompartmentalizing the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol* *17*, 369-375.
- Putney, J.W. (2010). Pharmacology of store-operated calcium channels. *Mol Interv* *10*, 209-218.
- Putney, J.W. (2011). Origins of the concept of store-operated calcium entry. *Front Biosci (Schol Ed)* *3*, 980-984.
- Putney, J.W., Jr. (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* *7*, 1-12.
- Putney, J.W., Jr. (1990). Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* *11*, 611-624.
- Putney, J.W., Jr. (2004). The enigmatic TRPCs: multifunctional cation channels. *Trends Cell Biol* *14*, 282-286.
- Quesada, I., Villalobos, C., Nunez, L., Chamero, P., Alonso, M.T., Nadal, A., and Garcia-Sancho, J. (2008). Glucose induces synchronous mitochondrial calcium oscillations in intact pancreatic islets. *Cell Calcium* *43*, 39-47.
- Rambourg, A., Gachet, E., Clermont, Y., and Kepes, F. (1996). Modifications of the Golgi apparatus in *Saccharomyces cerevisiae* lacking microtubules. *Anat Rec* *246*, 162-168.
- Ramsey, I.S., Delling, M., and Clapham, D.E. (2006). An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol* *68*, 619-647.
- Reed, K.C., and Bygrave, F.L. (1974). The inhibition of mitochondrial calcium transport by lanthanides and ruthenium red. *Biochem J* *140*, 143-155.
- Reeves, J.P., and Hale, C.C. (1984). The stoichiometry of the cardiac sodium-calcium exchange system. *J Biol Chem* *259*, 7733-7739.
- Reuter, H. (1979). Properties of two inward membrane currents in the heart. *Annu Rev Physiol* *41*, 413-424.
- Reuter, H., and Seitz, N. (1968). The ionic dependence of calcium efflux from guinea pig auricles. *Naunyn-Schmiedeberg's Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* *259*, 190.
- Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F.S., Fogarty, K.E., Lifshitz, L.M., Tuft, R.A., and Pozzan, T. (1998). Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> responses. *Science* *280*, 1763-1766.
- Robb-Gaspers, L.D., Burnett, P., Rutter, G.A., Denton, R.M., Rizzuto, R., and Thomas, A.P. (1998). Integrating cytosolic calcium signals into mitochondrial metabolic responses. *EMBO J* *17*, 4987-5000.
- Rodriguez-Garcia, A.R., J. Navas-Navarro, P., Aulestia, F.J., Gallego-Sandin, S. Garcia-Sancho, J. and Alonso, M.T (2013). GAP, a new aequorin-based fluorescent indicator for imaging Ca<sup>2+</sup> in organelles. (In consideration for publication).
- Rome, L.C. (2006). Design and function of superfast muscles: new insights into the physiology of skeletal muscle. *Annu Rev Physiol* *68*, 193-221.
- Roos, J., DiGregorio, P.J., Yeromin, A.V., Ohlsen, K., Lioudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J.A., Wagner, S.L., Cahalan, M.D., *et al.* (2005). STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca<sup>2+</sup> channel function. *J Cell Biol* *169*, 435-445.

## 7. REFERENCIAS.

---

- Rossi, D., and Sorrentino, V. (2002). Molecular genetics of ryanodine receptors Ca<sup>2+</sup>-release channels. *Cell Calcium* *32*, 307-319.
- Rossman, A.C. (2011). The physiology of the nicotinic acetylcholine receptor and its importance in the administration of anesthesia. *AANA J* *79*, 433-440.
- Rousseau, E., Ladine, J., Liu, Q.Y., and Meissner, G. (1988). Activation of the Ca<sup>2+</sup> release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by caffeine and related compounds. *Arch Biochem Biophys* *267*, 75-86.
- Rudolph, H.K., Antebi, A., Fink, G.R., Buckley, C.M., Dorman, T.E., LeVitre, J., Davidow, L.S., Mao, J.I., and Moir, D.T. (1989). The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in PMR1, a member of a Ca<sup>2+</sup> ATPase family. *Cell* *58*, 133-145.
- Rutter, G.A., Theler, J.M., Li, G., and Wollheim, C.B. (1994). Ca<sup>2+</sup> stores in insulin-secreting cells: lack of effect of cADP ribose. *Cell Calcium* *16*, 71-80.
- Saftig, P., and Klumperman, J. (2009). Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol* *10*, 623-635.
- Sambrook, J., Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: a laboratory manual* (Third Edition).
- SantoDomingo, J., Fonteriz, R.I., Lobaton, C.D., Montero, M., Moreno, A., and Alvarez, J. (2010). Ca<sup>2+</sup> dynamics in the secretory vesicles of neurosecretory PC12 and INS1 cells. *Cell Mol Neurobiol* *30*, 1267-1274.
- Seidler, N.W., Jona, I., Vegh, M., and Martonosi, A. (1989). Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* *264*, 17816-17823.
- Serysheva, I., Ludtke, S.J., Baker, M.R., Chiu, W., and Hamilton, S.L. (2002). Structure of the voltage-gated L-type Ca<sup>2+</sup> channel by electron cryomicroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 10370-10375.
- Shibata, Y., Voeltz, G.K., and Rapoport, T.A. (2006). Rough sheets and smooth tubules. *Cell* *126*, 435-439.
- Shimomura, O., Johnson, F.H., and Morise, H. (1974). Mechanism of the luminescent intramolecular reaction of aequorin. *Biochemistry* *13*, 3278-3286.
- Shimomura, O., Musicki, B., Kishi, Y., and Inouye, S. (1993). Light-emitting properties of recombinant semi-synthetic aequorins and recombinant fluorescein-conjugated aequorin for measuring cellular calcium. *Cell Calcium* *14*, 373-378.
- Short, A.D., Winston, G.P., and Taylor, C.W. (2000). Different receptors use inositol trisphosphate to mobilize Ca<sup>2+</sup> from different intracellular pools. *Biochem J* *351 Pt 3*, 683-686.
- Shuttleworth, T.J. (2012). STIM and Orai proteins and the non-capacitative ARC channels. *Front Biosci* *17*, 847-860.
- Simmen, T., Aslan, J.E., Blagoveshchenskaya, A.D., Thomas, L., Wan, L., Xiang, Y., Feliciangeli, S.F., Hung, C.H., Crump, C.M., and Thomas, G. (2005). PACS-2 controls endoplasmic reticulum-mitochondria communication and Bid-mediated apoptosis. *EMBO J* *24*, 717-729.
- Singaravelu, K., Nelson, C., Bakowski, D., de Brito, O.M., Ng, S.W., Di Capite, J., Powell, T., Scorrano, L., and Parekh, A.B. (2011). Mitofusin 2 regulates STIM1 migration from the Ca<sup>2+</sup> store to the plasma membrane in cells with depolarized mitochondria. *J Biol Chem* *286*, 12189-12201.
- Smit, M.J., Leurs, R., Bloemers, S.M., Tertoolen, L.G., Bast, A., De Laat, S.W., and Timmerman, H. (1993). Extracellular ATP elevates cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> in HeLa cells by the interaction with a 5'-nucleotide receptor. *Eur J Pharmacol* *247*, 223-226.
- Spang, A. (2009). On vesicle formation and tethering in the ER-Golgi shuttle. *Curr Opin Cell Biol* *21*, 531-536.
- Spassova, M.A., Soboloff, J., He, L.P., Hewavitharana, T., Xu, W., Venkatachalam, K., van Rossum, D.B., Patterson, R.L., and Gill, D.L. (2004). Calcium entry mediated by SOCs and TRP channels: variations and enigma. *Biochim Biophys Acta* *1742*, 9-20.

- Stahl, W.L., Eakin, T.J., Owens, J.W., Jr., Breining, J.F., Filuk, P.E., and Anderson, W.R. (1992). Plasma membrane Ca(2+)-ATPase isoforms: distribution of mRNAs in rat brain by in situ hybridization. *Brain Res Mol Brain Res* 16, 223-231.
- Stawski, P., Janovjak, H., and Trauner, D. (2010). Pharmacology of ionotropic glutamate receptors: A structural perspective. *Bioorg Med Chem* 18, 7759-7772.
- Strehler, E.E., and Zacharias, D.A. (2001). Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol Rev* 81, 21-50.
- Styrt, B., and Klemperer, M.S. (1988). Lysosomotropic amines modulate neutrophil calcium homeostasis. *J Cell Physiol* 135, 309-316.
- Sudbrak, R., Brown, J., Dobson-Stone, C., Carter, S., Ramser, J., White, J., Healy, E., Dissanayake, M., Larregue, M., Perrussel, M., *et al.* (2000). Hailey-Hailey disease is caused by mutations in ATP2C1 encoding a novel Ca(2+) pump. *Human molecular genetics* 9, 1131-1140.
- Sukumaran, M., Penn, A.C., and Greger, I.H. (2012). AMPA receptor assembly: atomic determinants and built-in modulators. *Adv Exp Med Biol* 970, 241-264.
- Supnet, C., and Bezprozvanny, I. (2011). Presenilins as endoplasmic reticulum calcium leak channels and Alzheimer's disease pathogenesis. *Sci China Life Sci* 54, 744-751.
- Taylor, C.W., da Fonseca, P.C., and Morris, E.P. (2004). IP(3) receptors: the search for structure. *Trends Biochem Sci* 29, 210-219.
- Taylor, C.W., Genazzani, A.A., and Morris, S.A. (1999). Expression of inositol trisphosphate receptors. *Cell Calcium* 26, 237-251.
- Thastrup, O., Dawson, A.P., Scharff, O., Foder, B., Cullen, P.J., Drobak, B.K., Bjerrum, P.J., Christensen, S.B., and Hanley, M.R. (1989). Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. *Agents Actions* 27, 17-23.
- Thirion, S., Troadec, J.D., Pivovarova, N.B., Pagnotta, S., Andrews, S.B., Leapman, R.D., and Nicaise, G. (1999). Stimulus-secretion coupling in neurohypophysial nerve endings: a role for intravesicular sodium? *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3206-3210.
- Toyoshima, C. (2008). Structural aspects of ion pumping by Ca<sup>2+</sup>-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys* 476, 3-11.
- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., and Ogawa, H. (2000). Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* 405, 647-655.
- Tripathy, A., Xu, L., Mann, G., and Meissner, G. (1995). Calmodulin activation and inhibition of skeletal muscle Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor). *Biophys J* 69, 106-119.
- Trudeau, M.C., and Zagotta, W.N. (2002). Mechanism of calcium/calmodulin inhibition of rod cyclic nucleotide-gated channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8424-8429.
- Tsien, R.W. (1983). Calcium channels in excitable cell membranes. *Annu Rev Physiol* 45, 341-358.
- Tsugorka, A., Rios, E., and Blatter, L.A. (1995). Imaging elementary events of calcium release in skeletal muscle cells. *Science* 269, 1723-1726.
- Tu, H., Nelson, O., Bezprozvanny, A., Wang, Z., Lee, S.F., Hao, Y.H., Serneels, L., De Strooper, B., Yu, G., and Bezprozvanny, I. (2006). Presenilins form ER Ca<sup>2+</sup> leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer's disease-linked mutations. *Cell* 126, 981-993.



## 7. REFERENCIAS.

---

- Van Baelen, K., Vanoevelen, J., Callewaert, G., Parys, J.B., De Smedt, H., Raeymaekers, L., Rizzuto, R., Missiaen, L., and Wuytack, F. (2003). The contribution of the SPCA1 Ca<sup>2+</sup> pump to the Ca<sup>2+</sup> accumulation in the Golgi apparatus of HeLa cells assessed via RNA-mediated interference. *Biochem Biophys Res Commun* *306*, 430-436.
- Vangheluwe, P., Raeymaekers, L., Dode, L., and Wuytack, F. (2005). Modulating sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase 2 (SERCA2) activity: cell biological implications. *Cell Calcium* *38*, 291-302.
- Vangheluwe, P., Sepulveda, M.R., Missiaen, L., Raeymaekers, L., Wuytack, F., and Vanoevelen, J. (2009). Intracellular Ca<sup>2+</sup>- and Mn<sup>2+</sup>-transport ATPases. *Chem Rev* *109*, 4733-4759.
- Vanoevelen, J., Dode, L., Van Baelen, K., Fairclough, R.J., Missiaen, L., Raeymaekers, L., and Wuytack, F. (2005a). The secretory pathway Ca<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup>-ATPase 2 is a Golgi-localized pump with high affinity for Ca<sup>2+</sup> ions. *J Biol Chem* *280*, 22800-22808.
- Vanoevelen, J., Raeymaekers, L., Dode, L., Parys, J.B., De Smedt, H., Callewaert, G., Wuytack, F., and Missiaen, L. (2005b). Cytosolic Ca<sup>2+</sup> signals depending on the functional state of the Golgi in HeLa cells. *Cell Calcium* *38*, 489-495.
- Vanoevelen, J., Raeymaekers, L., Parys, J.B., De Smedt, H., Van Baelen, K., Callewaert, G., Wuytack, F., and Missiaen, L. (2004). Inositol trisphosphate producing agonists do not mobilize the thapsigargin-insensitive part of the endoplasmic-reticulum and Golgi Ca<sup>2+</sup> store. *Cell Calcium* *35*, 115-121.
- Varadi, A., Johnson-Cadwell, L.I., Cirulli, V., Yoon, Y., Allan, V.J., and Rutter, G.A. (2004). Cytoplasmic dynein regulates the subcellular distribution of mitochondria by controlling the recruitment of the fission factor dynamin-related protein-1. *J Cell Sci* *117*, 4389-4400.
- Vay, L., Gu, C., and McNaughton, P.A. (2012). The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. *Br J Pharmacol* *165*, 787-801.
- Vial, C., Roberts, J.A., and Evans, R.J. (2004). Molecular properties of ATP-gated P2X receptor ion channels. *Trends Pharmacol Sci* *25*, 487-493.
- Villalobos, C., Nadal, A., Nunez, L., Quesada, I., Chamero, P., Alonso, M.T., and Garcia-Sancho, J. (2005). Bioluminescence imaging of nuclear calcium oscillations in intact pancreatic islets of Langerhans from the mouse. *Cell Calcium* *38*, 131-139.
- Villalobos, C., Nunez, L., Chamero, P., Alonso, M.T., and Garcia-Sancho, J. (2001). Mitochondrial [Ca<sup>2+</sup>] oscillations driven by local high [Ca<sup>2+</sup>] domains generated by spontaneous electric activity. *J Biol Chem* *276*, 40293-40297.
- Villalobos, C., Nunez, L., and Garcia-Sancho, J. (1996). Functional glutamate receptors in a subpopulation of anterior pituitary cells. *FASEB J* *10*, 654-660.
- Villalobos, C., Nunez, L., and Garcia-Sancho, J. (1997). Mechanisms for stimulation of rat anterior pituitary cells by arginine and other amino acids. *J Physiol* *502 ( Pt 2)*, 421-431.
- Villalobos, C., Nunez, L., Montero, M., Garcia, A.G., Alonso, M.T., Chamero, P., Alvarez, J., and Garcia-Sancho, J. (2002). Redistribution of Ca<sup>2+</sup> among cytosol and organelle during stimulation of bovine chromaffin cells. *FASEB J* *16*, 343-353.
- von Blume, J., Alleaume, A.M., Cantero-Recasens, G., Curwin, A., Carreras-Sureda, A., Zimmermann, T., van Galen, J., Wakana, Y., Valverde, M.A., and Malhotra, V. (2011). ADF/cofilin regulates secretory cargo sorting at the TGN via the Ca<sup>2+</sup> ATPase SPCA1. *Dev Cell* *20*, 652-662.
- Wang, X., Zhang, X., Dong, X.P., Samie, M., Li, X., Cheng, X., Goschka, A., Shen, D., Zhou, Y., Harlow, J., *et al.* (2012). TPC proteins are phosphoinositide-activated sodium-selective ion channels in endosomes and lysosomes. *Cell* *151*, 372-383.
- Welter-Stahl, L., da Silva, C.M., Schachter, J., Persechini, P.M., Souza, H.S., Ojcius, D.M., and Coutinho-Silva, R. (2009). Expression of purinergic receptors and modulation of P2X7 function by the inflammatory cytokine IFN $\gamma$  in human epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* *1788*, 1176-1187.

- West, M., Zurek, N., Hoenger, A., and Voeltz, G.K. (2011). A 3D analysis of yeast ER structure reveals how ER domains are organized by membrane curvature. *J Cell Biol* *193*, 333-346.
- Wootton, L.L., Argent, C.C., Wheatley, M., and Michelangeli, F. (2004). The expression, activity and localisation of the secretory pathway Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SPCA1) in different mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta* *1664*, 189-197.
- Wootton, L.L., and Michelangeli, F. (2006). The effects of the phenylalanine 256 to valine mutation on the sensitivity of sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase (SERCA) Ca<sup>2+</sup> pump isoforms 1, 2, and 3 to thapsigargin and other inhibitors. *J Biol Chem* *281*, 6970-6976.
- Worthington, R.A., Dutton, J.L., Poronnik, P., Bennett, M.R., and Barden, J.A. (1999). Localisation of P2X receptors in human salivary gland epithelial cells and human embryonic kidney cells by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis/Western blotting and immunofluorescence. *Electrophoresis* *20*, 2065-2070.
- Wu, K.D., Lee, W.S., Wey, J., Bungard, D., and Lytton, J. (1995). Localization and quantification of endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase isoform transcripts. *Am J Physiol* *269*, C775-784.
- Wuytack, F., Papp, B., Verboomen, H., Raeymaekers, L., Dode, L., Bobe, R., Enouf, J., Bokkala, S., Authi, K.S., and Casteels, R. (1994). A sarco/endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase 3-type Ca<sup>2+</sup> pump is expressed in platelets, in lymphoid cells, and in mast cells. *J Biol Chem* *269*, 1410-1416.
- Xiang, M., Mohamalawari, D., and Rao, R. (2005). A novel isoform of the secretory pathway Ca<sup>2+</sup>,Mn(2+)-ATPase, hSPCA2, has unusual properties and is expressed in the brain. *J Biol Chem* *280*, 11608-11614.
- Yeromin, A.V., Zhang, S.L., Jiang, W., Yu, Y., Safrina, O., and Cahalan, M.D. (2006). Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature* *443*, 226-229.
- Yildirim, E., and Birnbaumer, L. (2007). TRPC2: molecular biology and functional importance. *Handb Exp Pharmacol*, 53-75.
- Ying, W.L., Emerson, J., Clarke, M.J., and Sanadi, D.R. (1991). Inhibition of mitochondrial calcium ion transport by an oxo-bridged dinuclear ruthenium ammine complex. *Biochemistry* *30*, 4949-4952.
- Yoo, S.H., and Albanesi, J.P. (1990). Inositol 1,4,5-trisphosphate-triggered Ca<sup>2+</sup> release from bovine adrenal medullary secretory vesicles. *J Biol Chem* *265*, 13446-13448.
- Yu, X., Carroll, S., Rigaud, J.L., and Inesi, G. (1993). H<sup>+</sup> countertransport and electrogenicity of the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> pump in reconstituted proteoliposomes. *Biophys J* *64*, 1232-1242.
- Zerfaoui, M., Fukuda, M., Langlet, C., Mathieu, S., Suzuki, M., Lombardo, D., and El-Battari, A. (2002). The cytosolic and transmembrane domains of the beta 1,6 N-acetylglucosaminyltransferase (C2GnT) function as a cis to medial/Golgi-targeting determinant. *Glycobiology* *12*, 15-24.
- Zha, X., Chandra, S., Ridsdale, A.J., and Morrison, G.H. (1995). Golgi apparatus is involved in intracellular Ca<sup>2+</sup> regulation in epithelial LLC-PK1 cells. *Am J Physiol* *268*, C1133-1140.
- Zhorov, B.S., and Tikhonov, D.B. (2004). Potassium, sodium, calcium and glutamate-gated channels: pore architecture and ligand action. *J Neurochem* *88*, 782-799.
- Zhou, Z., and Neher, E. (1993). Mobile and immobile calcium buffers in bovine adrenal chromaffin cells. *J Physiol* *469*, 245-273.
- Zhu, M.X., Ma, J., Parrington, J., Calcraft, P.J., Galione, A., and Evans, A.M. (2009). Calcium signaling via two-pore channels: local or global, that is the question. *Am J Physiol Cell Physiol* *298*, C430-441.