



TESIS DOCTORAL

**Papel de los canales TRPC6 y TRPA1 en la
homeostasis del Ca²⁺ intracelular**

Letizia Albarrán Alonso

Departamento de Fisiología

Conformidad de los Directores:

Fdo: Juan Antonio Rosado Dionisio

Fdo: José Javier López Barba



FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

Campus universitario

Avenida de la

Universidad s/n 10003

Cáceres

Telf.: 927 25 71 39

D. Juan Antonio Rosado Dionisio, Doctor en Fisiología y Profesor Titular de Fisiología en la Facultad de Veterinaria en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura y **D. José Javier López Barba**, Doctor en Fisiología e Investigador Contratado "Juan de la Cierva" del Departamento de Fisiología en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura,

INFORMAN

Que la presente memoria presentada por Dña. Letizia Albarrán Alonso, con el título **"Papel de los canales TRPC6 y TRPA1 en la homeostasis del Ca²⁺ intracelular"**, ha sido realizada bajo nuestra dirección, en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Extremadura. Durante el período de realización de la Tesis, la doctoranda realizó una estancia de tres meses en el Instituto Nacional de Sanidad e Investigación Médica "INSERM" de París (Francia). La Tesis ha sido informada favorablemente por dos expertos Europeos en el área de Fisiología. Por ello consideramos que la Tesis reúne los requisitos de originalidad para ser juzgada y optar a la mención "Doctor Internacional" y autorizamos su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Cáceres, a 7 de septiembre de 2015:

Fdo: D. Juan Antonio Rosado Dionisio

Fdo: D. José Javier López Barba

Este trabajo de investigación ha sido realizado con cargo a los siguientes proyectos:

Proyecto de investigación **BFU2010-21043-C02-01** del
Ministerio de Economía y Competitividad.

Proyecto de investigación **BFU2013-45564-C2-1-P** del
Ministerio de Economía y Competitividad.

Ayuda a grupos de investigación Junta de Extremadura-FEDER **GR10010**

Letizia Albarrán Alonso ha disfrutado de una beca-contrato **BES-2011- 043356** para la
formación predoctoral de personal investigador del Ministerio de Economía y
Competitividad.



ABREVIATURAS	15
INTRODUCCIÓN.....	17
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	23
1. PLAQUETAS	25
1.1. DESARROLLO PLAQUETARIO.....	26
1.2. ESTRUCTURA PLAQUETARIA.....	27
1.3. FUNCIÓN PLAQUETARIA	35
1.4. REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN PLAQUETARIA.....	37
2. CULTIVOS CELULARES.....	39
2.1. MEG01.....	39
2.2. DAMI	40
2.3. NG115-401L	40
2.4. SH-SY5Y	41
3. HOMEOSTASIS DEL Ca^{2+}	41
3.1. MECANISMOS QUE INCREMENTAN LA $[Ca^{2+}]_c$	42
3.2. MECANISMOS QUE DISMINUYEN LA $[Ca^{2+}]_c$	52
OBJETIVOS	55
METODOLOGÍA	61
1. REACTIVOS	63
2. OBTENCIÓN DE PLAQUETAS HUMANAS.....	64
3. OBTENCIÓN DE PLAQUETAS MURINAS	66
4. CULTIVO CELULAR.....	70
5. DETERMINACIÓN DE LA $[Ca^{2+}]_c$. FLUORIMETRÍA.	72
6. DETERMINACIÓN DE LA ENTRADA DE MANGANESO.....	75

7. TÉCNICAS PARA EL AISLAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	75
8. DETERMINACIÓN DE LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA.....	84
9. MICROSCOPIA CONFOCAL (O TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA)	84
10. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	85
RESULTADOS.....	87
1. TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL ANKYRIN-1 (TRPA1) MODULATES STORE-OPERATED Ca ²⁺ ENTRY BY REGULATION OF STIM1-ORAI1 ASSOCIATION.....	91
2. TRPC6 PARTICIPATES IN THE REGULATION OF CYTOSOLIC BASAL CALCIUM CONCENTRATION IN MURINE RESTING PLATELETS.....	101
3. THE CANONICAL TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL 6 (TRPC6) CHANNEL IS SENSITIVE TO EXTRACELLULAR PH IN MOUSE PLATELETS.....	109
4. STIM1 REGULATES TRPC6 HETEROMULTIMERIZATION AND SUBCELLULAR LOCATION.....	117
DISCUSIÓN.....	127
CONCLUSIONES.....	147
BIBLIOGRAFÍA	153

ABREVIATURAS

- $[Ca^{2+}]_c$: concentración de Ca^{2+} citosólica
- **5-HT**: 5-hidroxitriptamina
- **AA**: Ácido araquidónico
- **ACD**: Ácido cítrico dextrosa
- **ADP**: Adenín dinucleótido fosfato
- **ADPR_c**: ADP ribosa cíclica
- **AM**: grupo acetoximetiléster
- **AMP_c**: Adenosín monofosfato cíclico
- **ATP**: Adenosín trinucleótido fosfato
- **BSA**: Albúmina de suero bovino
- **CAD**: *CRAC-activating domain*, dominio activador de CRAC
- **CICR**: Liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+}
- **CMD**: *CRAC-modulatory domain*, dominio modulador de CRAC
- **CTID**: *C-terminal inhibitory domain*, dominio C-terminal inhibidor
- **DAG**: Diacilglicerol
- **DMEM**: Medio Eagle modificado por Dulbecco
- **DTT**: Ditiotreitól
- **ECC**: Entrada capacitativa de Ca^{2+}
- **ENCC**: Entrada no capacitativa de Ca^{2+}
- **ETON**: *Extended transmembrane Orai1 N-terminal*, prolongación del último segmento transmembrana de Orai
- **Fc**: Fragmento cristalizante de inmunoglobulina
- **Fura-2/AM**: fura-2 acetoximetiléster
- **GMP_c**: Guanosín monofosfato cíclico
- **GFP**: *Green fluorescent protein*, proteína verde fluorescente
- **HBS**: Tampón hepes salino
- **HRP**: Peroxidasa de rábano picante
- **ICAM-2**: Molécula de adhesión intercelular
- **IgG**; Inmunoglobulina G
- **IL**: Interleucina
- **IP₃**: inositol-1-4-5-trifosfato
- **IP₃R**: Receptor de IP₃
- **IRES**: Sitio Interno de Entrada al Ribosoma
- **K_d**: Constante de disociación
- **KO**: Ratón mutante (Knock out)
- **LAMP**: Proteína lisosomal asociada a la membrana
- **LB**: Buffer de Laemmli
- **LRG**: Glicoproteínas ricas en leucina
- **MAP**: Proteínas asociadas a microtúbulos
- **NAADP**: Nicotinado de adenina dinucleótido fosfato
- **NADP**: Nicotinadenín dinucleótido fosfato
- **NCX**: Intercambiador Na^+/Ca^{2+}
- **NO**: óxido nítrico
- **OASF**: *Orai1-activating small fragment*, fragmento pequeño activador de Orai1
- **PAF**: Factor activador de plaquetas
- **PAI-1**: Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1
- **PAR**: Receptores activados por proteasas
- **PBS**: Tampón fosfato salino
- **PCR**: Reacción en cadena de la polimerasa
- **PDGF**: Factor de crecimiento derivado de la plaqueta
- **PIP₂**: Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
- **PKA**: Proteína cinasa A
- **PKC**: Proteína cinasa C
- **PLA₂**: Fosfolipasa A₂
- **PLC**: Fosfolipasa C
- **PMA**: forbo 12-miristato 13-acetato
- **PMCA**: ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática
- **PPP**: Plasma pobre en plaquetas
- **PRP**: Plasma rico en plaquetas
- **RE**: Retículo endoplasmático
- **ROC**: Canal operado por receptor
- **ROS**: Especies reactivas de oxígeno
- **RPMI 1640**: Medio Roswell Park Memorial Institute
- **RyR**: Receptor de rianodina
- **SAM**: Dominio alfa estéril
- **SB**: Sorensen buffer
- **SCA**: Sistema canalicular abierto
- **SCaMPER**: Canal liberador de Ca^{2+} sensible a esfingolípidos
- **SERCA**: ATPasa de Ca^{2+} del retículo endoplásmico
- **SMOC**: Canal operado por segundos mensajeros

- **SOAR:** *STIM1-Orai1 activating region*, región de STIM1 activadora de Orai1
- **SOC:** Canal operado por el vaciamiento de los depósitos
- **STD:** Sistema tubular denso
- **STIM1:** *Stromal interaction molecule 1*
- **STIM2:** *Stromal interaction molecule 2*
- **TAE:** Tampón Tris-Acetato-EDTA
- **TBST:** Solución salina de trizma con detergente Tween-20
- **TG:** Tapsigargina
- **TM:** dominio transmembrana
- **TP:** Receptor de tromboxano
- **TPC:** Canal de doble poro (sensible a NAADP)
- **TPO:** trombopoyetina
- **TRP:** *Transient Receptor Potential channel*, canal de potencial receptor transitorio
- **TRPC:** TRP canónico
- **TXA2:** Tromboxano A2
- **UV:** Radiación ultravioleta
- **VOC:** Canal operado por voltaje
- **VWF:** Factor de Von Willebrand
- **WT:** Ratón salvaje (Wild Type)

Introducción

INTRODUCCIÓN

El ión calcio (Ca^{2+}) es uno de los mensajeros intracelulares más universales y ampliamente distribuidos en el reino animal. Algunos agonistas celulares modulan la concentración de Ca^{2+} libre citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) para controlar diversas funciones celulares, entre las que se incluyen respuestas rápidas como la contracción muscular, secreción y agregación plaquetaria, y otras más lentas como la expresión de genes y el crecimiento celular.

En una célula en reposo la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ es mantenida a concentraciones bajas, del orden nanomolar, mientras que cuando las células son estimuladas con determinados agonistas, se incrementa de forma rápida hasta alcanzar concentraciones del rango micromolar. Las células tienen dos fuentes principales de Ca^{2+} , los depósitos intracelulares, principalmente el retículo endoplasmático (RE), que constituyen una fuente finita de Ca^{2+} , y el medio extracelular, que supone una fuente inagotable de Ca^{2+} para la célula. En ocasiones, la liberación de Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares resulta insuficiente para la completa activación de determinadas funciones celulares que necesitan incrementos más sostenidos en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$. En estas condiciones, la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular desempeña un importante papel.

La salida de Ca^{2+} desde el RE, puede activar *per se* la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular a través de la activación de canales iónicos operados por los almacenes (SOCs). Esta corriente iónica se denomina corriente de Ca^{2+} activada por liberación de Ca^{2+} , I_{CRAC} .

El principal mecanismo de entrada de Ca^{2+} extracelular en células no excitables es la entrada capacitativa de Ca^{2+} (ECC). Aunque este mecanismo no se conoce con exactitud en la actualidad, se ha identificado la proteína STIM1 como el sensor de Ca^{2+} del RE, la proteína Orai1 como parte del poro del canal que media I_{CRAC} , la primera corriente capacitativa descrita, y los homólogos en mamíferos de los canales TRP de *Drosophila* como canales permeables a cationes que generan otro tipo de corriente capacitativa no selectiva para Ca^{2+} denominada I_{SOC} . Actualmente, el modelo de ECC propuesto defiende la formación de un complejo ternario formado por las proteínas STIM, Orai y TRPC que produce la activación del mecanismo tras el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} . Según este modelo, STIM1 es capaz de regular directa o indirectamente todas las proteínas TRPC tras el vaciamiento de los depósitos, con excepción de TRPC7. La primera evidencia de ello se demostró inicialmente en células HEK293, en las que se observó una interacción funcional entre STIM1 y TRPC1 tras el vaciamiento de los depósitos. Asimismo, STIM1 se asocia directamente con subunidades de los canales TRPC2, TRPC4 y TRPC5 y regula directamente los canales TRPC3 y TRPC6 (Yuan et al. 2007). Esto último parece que ocurre a través de la heteromultimerización de diferentes

proteínas TRPC aunque en el caso de TRPC6 se han descrito interacciones directas con STIM1 en plaquetas humanas (Jardin et al. 2009a).

Teniendo en cuenta éstas y otras consideraciones, que ampliaremos a continuación en el capítulo de antecedentes bibliográficos, hemos llevado a cabo en los laboratorios del Departamento de Fisiología en la Facultad de Veterinaria, durante el período 2011-2015, y bajo la dirección de los doctores J.A. Rosado y J. J. López, experimentos para determinar con mayor precisión científica algunos mecanismos que permitan ampliar nuestro conocimiento de la ECC. Particularmente, hemos centrado nuestra atención en las proteínas de la superfamilia TRP y más concretamente en las subfamilias TRPC y TRPA. De ahí que hayamos titulado esta Tesis “Papel de los canales TRPC6 y TRPA1 en la homeostasis del Ca²⁺ intracelular”, que sometemos a la consideración del Tribunal Evaluador y con la que aspiramos a la obtención del grado de Doctora Internacional por la Universidad de Extremadura.

INTRODUCTION

The ion calcium (Ca^{2+}) is almost an universal intracellular messenger involved in the regulation of cellular physiology. The cytosolic free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) is modulated by agonists to control different functions including fast responses such as muscle contraction or platelet aggregation and other slower responses like gene expression and cell growth.

The resting $[\text{Ca}^{2+}]_c$ is normally maintained low, in the range nanomolar, but when cells are stimulated it increases reaching micromolar concentrations. Cells have mainly two sources of Ca^{2+} , the intracellular stores, which are finite compartments, and extracellular medium, which imply an endless source of Ca^{2+} . Agonists cause Ca^{2+} release from finite intracellular Ca^{2+} compartments which usually results in a transient increase in $[\text{Ca}^{2+}]_c$; however, a number of cellular processes, as well as the refilling of the intracellular Ca^{2+} pools, require a sustained and more extensive rise in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ and thus, Ca^{2+} entry mechanisms play a relevant role.

Ca^{2+} release from the ER activates Ca^{2+} entry from outside the cell by activation of the store operated channels (SOCs, from Store-Operated Channels). This incoming stream of Ca^{2+} is known as Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release (ICRAC, from Ca^{2+} -release- activated Ca^{2+} current).

Store-operated Ca^{2+} entry (SOCE), also termed store-mediated or capacitative Ca^{2+} entry, is a major mechanism for Ca^{2+} influx in electrically non-excitabile cells. Although SOCE mechanism is not completely understood, STIM1 has been identified as the Ca^{2+} sensor located in the ER; Orai1, as the pore-forming subunit of the channels mediating I_{CRAC} ; and the members of the TRPC subfamily as the channels mediating another capacitative Ca^{2+} current called I_{SOC} . At the moment, there is a body of evidence supporting the formation of ternary complexes between STIM, Orai and TRPC in SOCE activation. According to this model, the participation of TRPC proteins as SOC subunits received support from studies reporting that, upon Ca^{2+} store depletion, STIM1 is able to regulate directly or indirectly all TRPC proteins, with the exception of TRPC7. Functional and direct association between STIM and TRPC proteins was evidenced for the first time in HEK293 upon Ca^{2+} store depletion. Furthermore, STIM1 has also been reported to associate directly to TRPC2, TRPC and TRPC5 channel subunits and to regulate indirectly TRPC3 and TRPC6 channels (Yuan et al. 2007). The latter has been reported to occur through the heteromultimerization of TRPC proteins, although a direct interaction between endogenous TRPC6 and STIM1 has been reported in human platelets (Jardin et al. 2009a).

Given these and other considerations, which will be explained below, we have conducted experiments to determine with more scientific accuracy some mechanisms that will

expand our understanding of SOCE, at the laboratories of the Department of Physiology in the Faculty of Veterinary Medicine, during the period 2011-2015, and under the supervision of the doctors J.A. Rosado and J.J. López,. In particular, we focused our attention on the TRP superfamily and, more specifically, on TRPC and TRPA subfamilies. We have therefore entitled this Thesis "Role of TRPC6 and TRPA1 channels in homeostasis of intracellular Ca²⁺", which we submit for consideration by the Evaluation Tribunal and with which we aim to obtain the degree of International Doctor of the University of Extremadura.

Antecedentes bibliográficos

1. Plaquetas

Las plaquetas o trombocitos son componentes celulares de la sangre cuya función principal es detener el sangrado mediante la agregación y el taponamiento de la lesión del vaso sanguíneo. Inicialmente fueron descritas en 1865 por Max Schultze como "esférulas" de menor tamaño que los glóbulos rojos que ocasionalmente se aglutinaban y podían participar en acumulaciones de material fibroso, pero fue el patólogo italiano Giulio Bizzozero quien en 1882 demostró que eran el primer componente de la sangre en adherirse *in vivo* a las paredes de un vaso sanguíneo lesionado y que, *in vitro*, eran los primeros componentes de la sangre en adherirse a filamentos que subsecuentemente se cubrían de fibrina. Estos hallazgos junto con los estudios llevados a cabo años después por Eberth y Schimmelbusch constituyen el fundamento de la actual comprensión de la hemostasia.

Las plaquetas se originan a partir de la fragmentación citoplasmática de los megacariocitos de la médula ósea. Son células anucleadas, por lo que no tienen ADN genómico, pero contienen ARN mensajero derivado de los megacariocitos y la maquinaria traslacional necesaria para la síntesis de proteínas. Del volumen plaquetario total, 1/3 se encuentran retenidas en el bazo mientras que los 2/3 restantes circulan en la sangre. Aunque inicialmente fueron descritas como pequeñas partículas inertes, en la actualidad se conoce que son células con una gran complejidad estructural y bioquímica, lo cual permite que en condiciones normales las plaquetas circulantes no se adhieran a la superficie endotelial ni entre ellas, pero cuando hay una lesión se unan a estructuras subendoteliales expuestas, se activen y se agreguen unas a otras, iniciando así la formación del tapón hemostático primario.

En condiciones fisiológicas normales tienen forma de disco biconvexo con un diámetro variable en función de la especie, oscilando desde los 0,5 μm en plaquetas murinas a los 3 μm en las humanas. Su forma y reducido tamaño permiten que sean empujadas hacia regiones periféricas del vaso sanguíneo, desde donde realizan una función de vigilancia de la integridad del endotelio vascular. Las plaquetas circulan en concentraciones de 1,5-3,5 $\times 10^8$ plaquetas/mL en humanos, mientras que en ratones sanos estos recuentos son bastante más elevados alcanzando los 10-15 $\times 10^8$ plaquetas/mL (Levin et al. 1994). Permanecen en la circulación durante un promedio de 10 días en humanos y 4 días en ratones, tras lo cual entran en un proceso de senescencia y son eliminadas por macrófagos del sistema retículo-histiocitario del bazo, hígado y médula ósea (Frojmovic et al. 1982; Baker et al. 1997). Observando al microscopio óptico frotis de sangre periférica coloreados con la tinción de

Giemsa, se presentan como pequeñas células granulares de aspecto rojizo; mientras que al microscopio electrónico aparecen como elementos discoidales biconvexos de superficie lisa salvo por pequeñas invaginaciones. Tras la activación plaquetaria, su morfología se transforma en irregular y esférica con multitud de pseudópodos (White 1987).

1.1. DESARROLLO PLAQUETARIO

El desarrollo megacarioblástico y la formación de plaquetas están regulados a múltiples niveles por diferentes citocinas, entre las que se encuentran las interleucinas (IL) IL-3, IL-6 y IL-1 (Kaushansky 2003), así como por trombopoyetina (TPO), que promueven la proliferación de los megacarioblastos (Yang et al. 1986; Segal et al. 1988). La TPO es una citocina purificada que se define por ser el principal elemento regulador de la trombopoyesis (Kaushansky 2006), puesto que regula todas las fases del desarrollo megacarioblástico, desde el estadio de célula hematopoyética puripotencial hasta la maduración citoplasmática. Sin embargo, se ha descrito que ninguna citocina es esencial en las fases finales de la trombopoyesis (producción de proplaquetas y plaquetas) en estudios realizados *in vitro*, pudiendo incluso la TPO inhibir alguna de estas fases (Ito et al. 1996).

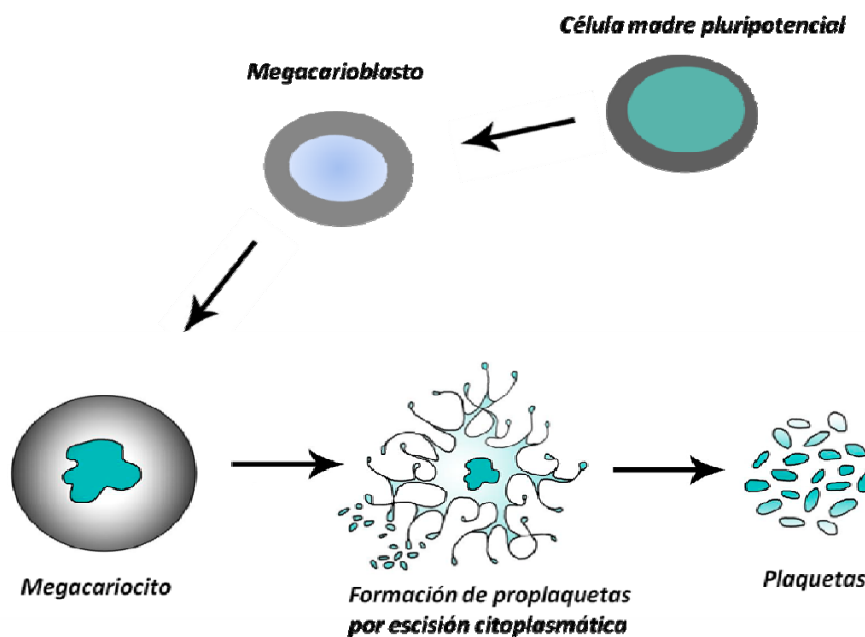


Fig 1. Desarrollo plaquetario.

La proliferación y diferenciación de los megacarioblastos tras un proceso de poliploidización produce megacariocitos, células altamente especializadas que producirán plaquetas a través de un proceso que presenta algunas características relacionadas con la apoptosis, como la reorganización del citoesqueleto, la condensación de la membrana y

fragmentación de su citoplasma (Kaushansky 2008). Estas similitudes hacen que el mecanismo de producción de plaquetas haya sido propuesto como un proceso de apoptosis especializado o muerte celular programada de los megacariocitos en los que se destruye el núcleo senescente (Ito et al. 1996). De hecho, se ha descrito que la activación de caspasas es necesaria para la producción de proplaquetas (De Botton et al. 2002) y algunos agentes proapoptóticos como el óxido nítrico (NO) participan en la liberación de proplaquetas en líneas celulares megacarioblásticas, como la MEG-01, funcionando conjuntamente con la TPO para aumentar la liberación de plaquetas al medio (Battinelli et al. 2000; Battinelli et al. 2001). El proceso de la producción de plaquetas a partir de los megacariocitos se produce tras numerosas replicaciones del ADN pero sin división celular, un proceso denominado endocitosis (Nagata et al. 1997b; Vitrat et al. 1998).

1.2. ESTRUCTURA PLAQUETARIA

La principal característica de la plaqueta es la anteriormente mencionada ausencia de núcleo. Sin embargo, la plaqueta se caracteriza además por presentar la siguiente estructura:

1.2.1. Membrana plasmática

Como en todos los tipos celulares, en plaquetas la membrana plasmática es el principal elemento que permite la comunicación de la célula con el medio externo y, en consecuencia es una de las principales estructuras que participan en su fisiología.

Presenta una estructura trilaminar que contiene fosfolípidos, glicolípidos y glicoproteínas. Los fosfolípidos están distribuidos de forma asimétrica en la bicapa de la membrana, localizándose los que tienen carga negativa, como el fosfatidilinositol, la fosfatidilserina y la fosfatidiletanolamina, en la capa interna. Los fosfolípidos actúan como sustratos para las enzimas fosfolipasas durante la activación plaquetaria. Algunos de ellos tienen además propiedades agregantes o procoagulantes de forma que cuando la plaqueta es activada se produce una reorganización de los componentes de la membrana haciéndolos más accesibles.

Las glicoproteínas se caracterizan por presentar cadenas ramificadas de polisacáridos que forman una cubierta exterior, denominada glicocálix, y le confieren una carga negativa a la superficie de la plaqueta (Handagama et al. 1993). Actúan como receptores de los agonistas fisiológicos de las plaquetas (adenín dinucleótido fosfato (ADP), tromboxano A₂(TXA₂), trombina), proteínas adhesivas (fibrinógeno, fibronectina, etc) y para ligandos como el

colágeno (Lowenberg et al. 2010) mediando en las tres funciones principales de éstas: adhesión a la pared vascular, agregación e interacción con otras células.

Del mismo modo que en el caso de los fosfolípidos, la composición en glicoproteínas de la membrana plasmática depende en gran medida del estado de activación celular. Durante el proceso de secreción, se produce la fusión de membranas internas con la membrana plasmática haciendo que determinadas glicoproteínas expresadas exclusivamente en estructuras intracelulares pasen a expresarse en la membrana plasmática después de la activación y secreción plaquetaria.

Las glicoproteínas se clasifican en distintas subfamilias que engloban las integrinas, glicoproteínas ricas en leucina y selectinas.

Entre los receptores de la familia de las integrinas el más abundante es el **GP1Ib/IIIa**, el cual se encuentra en forma de heterodímeros $\alpha_{11b}\beta_3$ dependientes de Ca^{2+} . Su principal función es la de unir fibrinógeno y, en determinadas circunstancias, el Factor de Von Willebrand (VWF). Este complejo es muy abundante y se encuentra homogéneamente distribuido en la superficie de plaquetas activadas. No obstante, estudios de inmunomarcaje han demostrado que el 30% del total de esta integrina se localiza en la membrana externa de los gránulos α (D'Souza et al. 1990). La principal función de esta fracción intracelular es la incorporación y almacenamiento de fibrinógeno en dichos gránulos (Handagama et al. 1993; Cramer et al. 1994; Ma et al. 2006). Esta integrina desempeña un papel importante en la activación de la plaqueta, momento en el cual establece una interacción estable entre el VWF y la matriz extracelular usando el fibrinógeno como molécula puente para la formación del trombo plaquetario (Savage et al. 1998).

El resto de receptores de la familia de las integrinas aparecen en menor proporción pero también intervienen en la funcionalidad plaquetaria. Entre ellos encontramos el **GP1a/IIa** (heterodímeros $\alpha_2\beta_1$), que actúa como receptor de colágeno y participa también en el proceso de adhesión a la matriz extracelular, así como en la agregación inducida por colágeno; y los receptores **GP1c/IIa** ($\alpha_5\beta_1$), **GP1c'/IIa** ($\alpha_6\beta$) y el **receptor de la vitronectina** ($\alpha_v\beta$), que son glicoproteínas minoritarias de la membrana que actúan como receptores de fibronectina, laminina y vitronectina respectivamente.

La subfamilia de glicoproteínas ricas en leucina (LRG) está formada por proteínas con funciones diversas que comparten una secuencia común de 24 aminoácidos rica en residuos de leucina. En este grupo se incluye el complejo **GP1b/IX/V**, un receptor específico implicado

en la adhesión de las plaquetas al subendotelio vascular. Se trata de la segunda glicoproteína más abundante de la membrana. Estructuralmente está formada por 4 subunidades que mantienen la secuencia LRR (leucinas altamente conservadas), esencial para el correcto funcionamiento del complejo (Hocking et al. 1998). Dicho complejo interactúa con estructuras subendoteliales, principalmente con el colágeno a través del VWF que actúa como ligando adhesivo en el sitio donde se ha producido la lesión tisular, permitiendo la adhesión firme de las plaquetas al colágeno. Además, este receptor también funciona como sitio de unión de alta afinidad para la trombina participando en la propagación de la respuesta a dicho agonista y regulando la coagulación sanguínea, la interacción entre el factor XI y la trombina y la activación plaquetaria (Celikel et al. 2003). Para permitir la correcta unión de la trombina, este receptor debe estar constituido por las tres glicoproteínas, ya que la ausencia de una de ellas en ratones deficientes en GPV, provoca un aumento de la sensibilidad a la trombina, dando lugar a un incremento de la trombogénesis y de la formación de émbolos *in vivo* (Ni et al. 2001).

La **GPIV** también denominada CD36 es una glicoproteína mayoritaria de la membrana plaquetaria en reposo que funciona como receptor de trombospondina y de fibras de colágeno de tipo I. No obstante, también se ha demostrado su presencia en la membrana de los gránulos α , y el aumento de su expresión en superficie tras la estimulación de las plaquetas con trombina.

Otra glicoproteína relevante es la **GP VI**, localizada exclusivamente en plaquetas y megacariocitos maduros. Funcionalmente se asocia con el receptor Fc- γ (FcR γ), que proporciona actividad tirosina cinasa al complejo (Nieswandt et al. 2000). Desempeña un papel fundamental en la activación y agregación plaquetaria inducida por colágeno, constituyendo junto a la GPIV y GPIa/IIa, el receptor más importante de colágeno en plaquetas. Esta unión del GPVI al ligando se produce tras la unión de la plaqueta al mismo mediada por el receptor GPIa/IIa (Verkleij et al. 1998). En el caso de plaquetas murinas se ha observado que la GPVI es el principal receptor de colágeno implicado en la señalización y activación plaquetaria (Nieswandt et al. 2003).

Las selectinas son receptores de adhesión que forman una familia de glicoproteínas integrales de la membrana, y pueden formar uniones hetero y homotípicas, transitorias y específicas. Presentan una estructura conservada que incluye un dominio tipo lectina, un dominio factor de crecimiento epidérmico, dos o más dominios tipo proteína reguladora del complemento, una región transmembranal y una región intracitoplasmática en el extremo

carboxilo terminal. Se han identificado a tres miembros de esta familia, los cuales corresponden a los antígenos de diferenciación leucocitaria CD62L (L-selectina), CD62P (P-selectina) y CD62E (E-selectina); estas tres moléculas reconocen y se unen, a través de su dominio tipo lectina, a diversos oligosacáridos, los cuales están usualmente conjugados con proteínas transmembranales. En plaquetas tiene gran importancia la selectina P (CD62P), que se expresa constitutivamente pero es almacenada en gránulos intracitoplásmicos; al activarse las plaquetas la selectina P es translocada a la membrana plasmática, permitiendo la interacción con sus ligandos.

Además de las glicoproteínas citadas anteriormente, la membrana plaquetaria posee otros receptores específicos de diversos agonistas acoplados a proteínas G. En estos casos la unión del ligando a su receptor desencadena la producción de segundos mensajeros que elevan las concentraciones de calcio citoplasmáticas y activan sistemas enzimáticos y vías de señalización que intervienen en la activación plaquetaria (Rink et al. 1990). Podemos destacar entre ellos:

- **Receptores de trombina:** La trombina es el principal agonista fisiológico de las plaquetas, siendo capaz de inducir su activación a pequeñas concentraciones (0,01 U/mL) provocando un aumento rápido de la concentración de Ca^{2+} citosólica $[Ca^{2+}]_c$ y desencadenando con ello el inicio de procesos dependientes de Ca^{2+} , como la activación de la fosfolipasa A_2 (PLA_2). Los receptores de trombina pertenecen a la familia de receptores activados por proteasas (PAR, del inglés *Protease-activated receptor*), aunque también se ha descrito que existen en la membrana plasmática otras proteínas que pueden en menor medida actuar también como receptores (O'Brien et al. 2001). De los cuatro miembros conocidos de la familia PAR, sólo PAR1 y PAR4 se expresan en plaquetas humanas, mientras que PAR3 y PAR4 lo hacen en plaquetas murinas. Su activación se produce cuando la trombina se une al extremo N terminal del receptor, liberándolo y exponiendo un nuevo extremo amino del receptor. El PAR3 por su parte actúa promoviendo la escisión de PAR4 en plaquetas de ratón. El receptor PAR4 presenta una afinidad por la trombina sensiblemente menor a la de los otros receptores debido en parte a la ausencia de la secuencia de reconocimiento de la hirudina que puede interactuar con el sitio de unión a la trombina (Vu et al. 1991; Blackhart et al. 1994; Kahn et al. 1998).

- **Receptores de ADP:** Se encuentran presentes en las plaquetas tanto humanas como murinas, al igual en muchos otros tipos celulares. El ADP es un importante agonista fisiológico que desempeña un papel fundamental en la fisiología hemostática y trombótica que se

encuentra almacenado en los gránulos densos de las plaquetas y es liberado tras su activación. También es liberado por los eritrocitos cuando se produce un daño vascular provocando a su vez la activación de las plaquetas. El ADP desencadena la formación de TXA₂, fosforilación de proteínas, incremento de la [Ca²⁺]_c, cambio de forma, agregación y secreción plaquetaria. Este mecanismo se produce a través de dos receptores purinérgicos acoplados a proteínas G, denominados P2Y1 y P2Y12, cuya activación conjunta es necesaria para que la respuesta al agonista sea completa (Daniel et al. 1998; Jin et al. 1998; Murugappa et al. 2006).

Existe un tercer tipo de receptor purinérgico denominado P2X1 acoplado de forma directa a un canal catiónico no selectivo que induce entrada de Ca²⁺ y de Na⁺ (Vial et al. 1997), que fue inicialmente identificado como receptor de ADP pero posteriormente se describió como receptor del ATP, que es liberado de los gránulos densos junto con el ADP (Mahaut-Smith et al. 2000).

- **Receptores de tromboxano:** El TXA₂ es un metabolito del ácido araquidónico (AA) generado por la acción de la tromboxano sintetasa en las plaquetas que induce un aumento de la [Ca²⁺]_c, contribuyendo así a la agregación plaquetaria por medio de su activación. El TXA₂ actúa sobre el receptor TXA₂ (TP), del que se han descrito dos variantes generadas por splicing alternativo, TPα y TPβ, ambas expresadas tanto en plaquetas humanas como murinas (Hirata et al. 1996; Thomas et al. 1998).

1.2.2. Sistema canalicular abierto (SCA)

Se trata de un sistema complejo de vesículas y canales interconectados a la membrana, que se ramifican a través del citoplasma actuando como una ampliación de ella, y consta de glicocálix, unidad de membrana y región submembranosa. Cuando la plaqueta es activada, sufre un cambio morfológico por el cual se evagina aumentando la superficie secretora de la célula y se transforma también en elemento secretor (Flaumenhaft 2003). Además, el SCA sirve también como reservorio de proteínas y receptores de membrana. Por ejemplo, una gran parte de los receptores de trombina se encuentran en el SCA en plaquetas en reposo, esperando ser transportadas a la membrana celular cuando son activadas. Recientemente se ha descrito que el SCA podría constituir un entorno adecuado para el reciclado de Ca²⁺ pericelular generado por el intercambiador Na⁺/Ca²⁺ (Sage et al. 2013) (Sage SO, Pugh N, Farndale RW, Harper AG. *Physiol Rep.* 2013 Oct;1(5):e00085. doi: 10.1002/phy2.85.).

1.2.3. Sistema tubular denso (STD)

Es una estructura característica de las plaquetas que debe su nombre a la opacidad que presenta al ser observado al microscopio electrónico. Su función es similar a la del RE liso de otros tipos celulares, sirviendo principalmente como almacén de Ca^{2+} en plaquetas. Está formado por un sistema de canales internos cerrados situado cerca de los microtúbulos, rodeando a las organelas. Presenta en su membrana bombas de Ca^{2+} que mantienen la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en el rango de nanomolar en las plaquetas en reposo. El calcio bombeado hacia el STD es secuestrado por la calreticulina, una proteína que une Ca^{2+} . Cuando la célula es activada por agonistas, se inicia una cascada de señales que acaba produciendo síntesis de inositol-1-4-5-trifosfato (IP_3), que producirá liberación de Ca^{2+} desde el STD (White 1972; Berridge 1995).

1.2.4. Citoesqueleto

La forma discoidal de las plaquetas en reposo es mantenida por un citoesqueleto especializado que además participa en funciones celulares como la exocitosis, endocitosis y transporte intracelular. Es una estructura muy especializada que permite la rápida respuesta plaquetaria ante un daño tisular produciendo un cambio morfológico y favoreciendo la emisión de pseudópodos. Está constituido principalmente por el anillo marginal de microtúbulos, el citoesqueleto de actina y un gel contráctil o esqueleto de membrana de espectrina.

El anillo marginal de microtúbulos es una de las estructuras características de las plaquetas. Descrito inicialmente por White y colaboradores, está formado principalmente por dímeros o polímeros de tubulina dependiendo del estado celular. Su estructura está conservada por proteínas llamadas MAP (Proteínas asociadas a microtúbulos). Junto con el citoesqueleto de actina es el encargado de mantener la forma discoidal de las plaquetas debido a su posicionamiento en la zona periférica de éstas. Con la activación plaquetaria se pierde dicha morfología debido a la desorganización de los microtúbulos (White 1968; Kenney et al. 1985). Durante la ECC, este anillo actúa como barrera evitando la entrada constitutiva de Ca^{2+} y apoyando la ECC mediada por los depósitos ácidos (Redondo et al. 2007).

La actina es la proteína más abundante en las plaquetas, que se encuentra, al igual que el anillo de microtúbulos, en un equilibrio dinámico de dímeros y polímeros. Alrededor del 40% del total de actina se organiza formando filamentos (F-actina), mientras que el 60% restante (G-actina) se almacena formando un complejo con β -4-timosina que es transformado en filamentos tras producirse la activación plaquetaria (Hartwig et al. 1991; Safer et al. 1994).

El esqueleto de espectrina envuelve la superficie citoplasmática del SCA y de los sistemas de membrana que se desplazan hacia el centro debido a la contracción del gel. Está constituido por largas cadenas de espectrina que interaccionan entre sí y se unen a filamentos de actina generando poros triangulares (Fox et al. 1987; Fox et al. 1988).

1.2.5. Gránulos de secreción

La plaqueta contiene, distribuidos por su citoplasma, un gran número de gránulos delimitados por una membrana, que se diferencian por su contenido interno, pudiéndose clasificar atendiendo a su ultraestructura en 4 tipos diferentes:

- **Gránulos α** , los más abundantes. Se forman durante la maduración temprana de los megacariocitos y aparecen en forma de pequeñas vesículas y de gránulos inmaduros que transitan a través de cuerpos multivesiculares hasta alcanzar su tamaño y densidad definitiva (Heijnen et al. 1998). Poseen en su interior una gran diversidad de proteínas, algunas de las cuales son específicas de plaquetas, mientras que otras son homólogas a proteínas plasmáticas o tisulares. Durante la secreción, el contenido granular es liberado participando en el proceso de hemostasia, produciendo un efecto pro-coagulante, estimulando la adhesión y agregación, y en definitiva favoreciendo el proceso de reparación tisular del endotelio lesionado. En su membrana contienen diferentes receptores moleculares, entre los que se puede destacar la P-selectina, ausente en la membrana plasmática de una plaqueta en reposo, pero cuya expresión aumenta en dicha membrana plasmática tras la activación plaquetaria debido a la fusión de la misma con la membrana de los gránulos. La expresión de P-selectina en la membrana plasmática es un parámetro utilizado para determinar el grado de activación celular (Stenberg et al. 1985; Furie et al. 2001).

- **Gránulos densos**, denominados de este modo debido a que presentan una gran opacidad en la zona central al microscopio electrónico atribuida a la presencia de Ca^{2+} . Se visualizan entre 2 y 7 gránulos densos por plaqueta con un diámetro aproximado de 200 a 300 nm. Son orgánulos de almacenaje de serotonina, de Ca^{2+} y Mg^{2+} y de un pool no metabólico de ADP y ATP. Su membrana presenta varios receptores, algunos específicos de este tipo de gránulos como la GP53 (granulofisina-CD63), y otros comunes al resto de membranas, como GPIIb/IIIa y P-selectina (Israels et al. 1992; Berger et al. 1993). Como en el caso de los gránulos α , después de la activación, el contenido de los gránulos densos es liberado por fusión directa de su membrana con la membrana plasmática, quedando las proteínas de membrana traslocadas a la superficie celular.

- **Lisomas**, que se encuentran en número reducido. Son gránulos pequeños, de diámetro inferior a 300 nm caracterizados por su contenido rico en enzimas hidrolíticas, principalmente hidrolasas ácidas. Al igual que en los casos anteriores, la activación plaquetaria produce la liberación del contenido, en este caso enzimático, cuya función es ejercida por interacciones con la pared vascular y por la digestión de los componentes de la matriz subendotelial. En el interior de la plaqueta participan en procesos de autofagia eliminando fragmentos citoplasmáticos. Presentan en su superficie diversas proteínas lisosomales asociadas a la membrana (LAMP-1, LAMP-2) y CD63 que se redistribuyen a la membrana plasmática tras la activación plaquetaria (Carlsson et al. 1988; Metzelaar et al. 1991).

- **Microperoxisomas**, que son pequeños gránulos con actividad peroxidasa y catalasa que se asemejan a los peroxisomas observados en otros tipos celulares.

1.2.6. Otros orgánulos

Además de las estructuras descritas con anterioridad, las plaquetas presentan otros orgánulos que desempeñan funciones esenciales en su metabolismo, entre los que se incluyen mitocondrias, gránulos de glucógeno e inclusiones lipídicas. Durante los procesos de agregación, secreción y retracción del coágulo, las plaquetas necesitan disponer de forma inmediata de grandes cantidades de energía, motivo por el cual presentan una vía glicolítica muy activa, así como la biosíntesis y degradación de glucógeno.

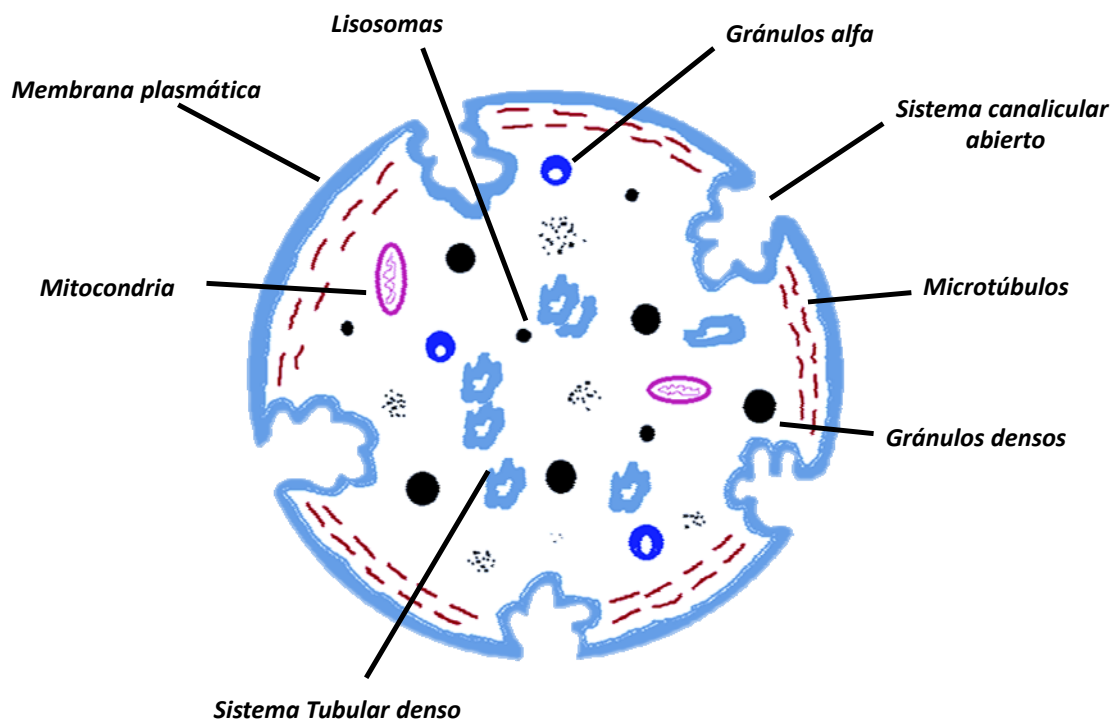


Fig 2. Esquema simplificado de la estructura plaquetaria.

1.3. FUNCIÓN PLAQUETARIA

Como se ha mencionado anteriormente, las plaquetas desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la hemostasia, evitando la pérdida sanguínea al dañarse un vaso e intentando restablecer la integridad de éste. En condiciones normales, las plaquetas circulan libremente por los vasos sanguíneos sin interactuar con otras plaquetas ni con el endotelio vascular. Cuando se produce un daño endotelial, bien causado por una lesión vascular o por la ruptura de una placa aterosclerótica, se desencadenan una serie de eventos que llevan a la formación de un tapón hemostático rico en plaquetas. Dependiendo del evento inicial que desencadena el proceso, puede representar un proceso hemostático normal o un proceso patológico de trombosis vascular. En cualquier caso, se desencadenan una serie de mecanismos bioquímicos y celulares que se clasifican en 4 etapas: adhesión, activación, secreción y agregación.

- Adhesión: Este proceso comienza con el transporte por difusión de las plaquetas hacia la superficie reactiva y la interacción de los receptores de la membrana plaquetaria con sus ligandos en las estructuras de la pared lesionada, proceso que no se inicia si el endotelio no está dañado (Packham et al. 1984). En los instantes posteriores a la lesión, las plaquetas se adhieren a las fibras de colágeno del subendotelio vascular a través de la glicoproteína GPIa/IIa. El VWF estabiliza esta unión formando un enlace entre un receptor plaquetario situado en la glicoproteína Ib/IX y las fibras de colágeno subendoteliales (Packham et al. 1984). Las plaquetas, una vez preactivadas, exponen al exterior nuevos receptores, los receptores de colágeno $\alpha_2\beta_1$ y GPVI, el receptor de fibronectina $\alpha_5\beta_1$ y el receptor de fibrinógeno GPIIb/IIIa para favorecer y estabilizar la unión de las plaquetas al subendotelio que ha sufrido el daño. Además, durante este proceso, las plaquetas sufren un cambio morfológico por el cual emiten pseudópodos, reducen la resistencia al flujo y reclutan otras células para intentar detener la hemorragia (Fuster et al. 1992).

- Activación: Puede estar desencadenada por numerosos estímulos mecánicos o bioquímicos. Muchos de los agonistas son producidos o liberados por las propias plaquetas después de la adhesión a la pared del vaso, iniciando un proceso cíclico que amplifica aún más la respuesta frente al estímulo inicial. Los agonistas plaquetarios se unen a los receptores de la superficie y estimulan la transducción de señales a través de la membrana. La hidrólisis enzimática de los fosfolípidos de la membrana se lleva a cabo por dos vías, una mediada por la fosfolipasa C (PLC) y otra por la fosfolipasa A_2 (PLA₂), las cuales determinan la formación de segundos mensajeros activadores de vías bioquímicas intracelulares comunes.

La activación de la fosfolipasa C inicia el metabolismo de los fosfoinosítidos entre cuyos productos se encuentran dos segundos mensajeros, el IP₃ y diacilglicerol (DAG) (Berridge 1987). El IP₃ estimula la movilización de Ca²⁺ desde el STD necesaria para la activación de otras enzimas intracelulares. El DAG activa PLC, causando fosforilación proteica, secreción de gránulos y expresión de receptores de fibrinógeno.

La segunda vía de señalización intracelular implica a la PLA₂, que después de la activación AA de las membranas celulares, el cual posteriormente será transformado TXA₂. El TXA₂ es un potente agonista plaquetario por sí mismo, suponiendo por tanto otro proceso cíclico que favorece la trombosis (Rink et al. 1990).

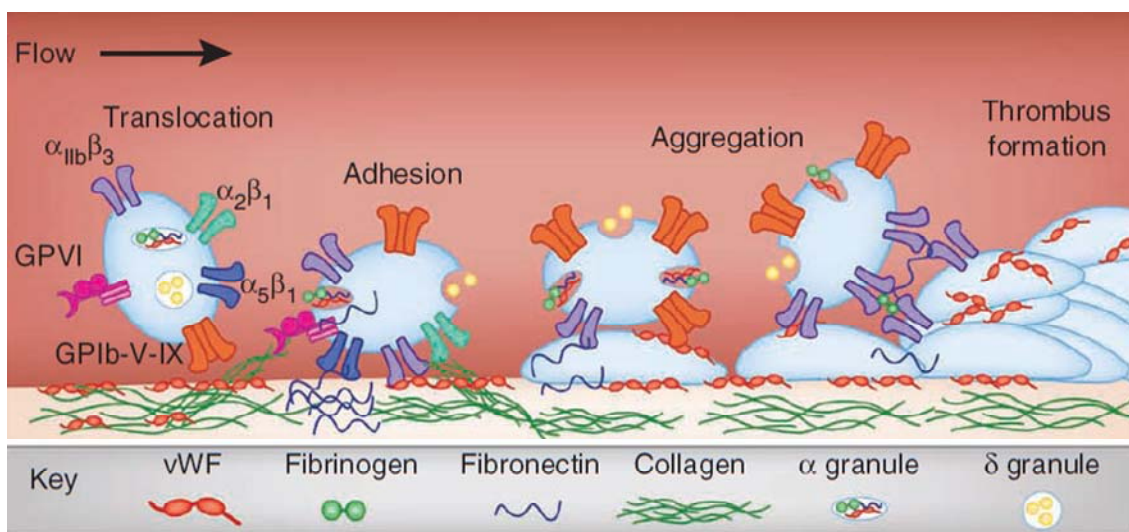


Fig 3. Esquema de los principales eventos que se producen durante la función plaquetaria (Jackson 2011).

- Secreción: Es uno de los procesos clave en el mecanismo de activación plaquetaria. Implica la exocitosis o secreción del contenido de los diferentes gránulos de almacenamiento que contienen las plaquetas para favorecer el proceso de formación del tapón hemostático y detención de la hemorragia (Stenberg et al. 1984). La secreción lisosomal principalmente se basa en hidrolasas ácidas (catepsinas) que digieren el material endocitado, y ocurre más lentamente que la producida en gránulos α y gránulos densos (Holmsen et al. 1970; Holmsen et al. 1979). Por su parte, los gránulos densos secretan grandes cantidades de ADP, así como cationes divalentes (Ca²⁺, Mg²⁺), serotonina y pirofosfatos que promueven el reclutamiento y activación de nuevas plaquetas en el lugar de la lesión vascular. Del mismo modo, el contenido liberado por los gránulos α favorece la función plaquetaria, dado que en estos gránulos se almacenan diversas sustancias procoagulantes como es el caso del factor 4 plaquetario cuya unión a la heparina neutraliza su actividad anticoagulante, o el factor 5 plaquetario que estimula la producción de trombina adicional (Ginsberg et al. 1980; Rand et al. 1994).

- Agregación. Este mecanismo es indispensable en el control y mantenimiento de la hemostasia. Consiste básicamente en la unión de plaquetas activadas entre sí para formar un trombo. Después de la activación producida por la lesión vascular o por estimulación directa con agonistas, se producen una serie de alteraciones que implican la expresión y activación de receptores funcionales en la membrana, procedentes por ejemplo de la fusión de membranas internas, que determinan la interacción plaqueta-plaqueta. Entre ellos, se requiere por ejemplo la activación del complejo GPIIb/IIIa, que se expone en la membrana tras la estimulación con agonistas fisiológicos como el ADP, la trombina, el colágeno o el TXA₂, y tiene la capacidad para fijar diferentes glucoproteínas como el fibrinógeno o el VWF. Sin embargo, en condiciones fisiológicas es el fibrinógeno la principal proteína que se une de forma bivalente a los receptores y establece los puentes de agregación entre plaquetas. La capacidad del receptor plaquetario para unirse a proteínas tan diversas se debe a que en todas aparece la secuencia aminoacídica común Arg-Glu-Asp (RGD) y Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) que actúan como elementos específicos de fijación al receptor (Schottelius et al. 2009).

1.4. REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN PLAQUETARIA

Las condiciones presentes en el torrente circulatorio (estrés mecánico por el arrastre del fluido, choque contra las paredes y otras células, contacto con sustancias como el ATP liberado al fragmentarse los eritrocitos...) podrían hacer que las plaquetas se activaran, produciendo problemas cardiovasculares. Es por ello que el mecanismo de agregación plaquetaria tiene que estar regulado de forma muy precisa, para que se produzca únicamente en el sitio de daño vascular.

1.4.1. Mecanismos activadores de la función plaquetaria

Entre estos mecanismos están el colágeno, la trombina o el estrés mecánico del flujo sanguíneo, que produce agregación plaquetaria por el enlace del VWF con la GPIb/V/IX, con una gran participación del ADP liberado. La exposición de la P-selectina en las membranas de células endoteliales y plaquetas se encarga de mediar la interacción intercelular mediante el reconocimiento de estructuras hidrocarbonadas ricas en ácido siálico y fucosa. Por último, también son mecanismos activadores de la adhesión/agregación la liberación al torrente sanguíneo de diversos agentes que inducen, por sí mismos o sinérgicamente, la agregación de las plaquetas, como son el ADP liberado al fragmentarse los eritrocitos. También lo es la liberación del factor activador de plaquetas (PAF) por las plaquetas y otras células como los neutrófilos, basófilos, células endoteliales, macrófagos o el propio tejido dañado. Este PAF es

un fosfolípido que estimula la agregación plaquetaria y modula la respuesta alérgica e inflamatoria. Otra sustancia activadora es el TXA₂ liberado por parte de los leucocitos activados.

Para que las plaquetas participen en la hemostasia y la trombosis, se necesita un estímulo inicial, como puede ser la lesión con exposición de la membrana basal rica en colágeno o la disfunción endotelial con desequilibrio entre la producción de mediadores anti y proagregantes (Pulcinelli et al. 1995).

Al adherirse al endotelio, las plaquetas son capaces de atraer más plaquetas P-selectina positivas y además se producirá el reclutamiento y activación de los leucocitos, los cuales se unen de forma irreversible a la superficie plaquetaria mediante la molécula de adhesión intercelular (ICAM-2). Por otra parte, se produce también la activación del receptor para el fibrinógeno soluble, y la participación de los fosfolípidos de la membrana plaquetaria como co-factores para la cascada de reacciones enzimáticas de la coagulación, de forma que se favorece la formación del trombo arterial (Chow et al. 1992).

Asimismo, ciertos componentes de los gránulos plaquetarios liberados en la activación influyen sobre otras células. Entre ellas el factor de crecimiento derivado de la plaqueta (PDGF), que estimula la proliferación celular y tiene un importante papel en la cicatrización de heridas y la aterogénesis (Heldin 1992). Otras de estas sustancias son el TXA₂ o el 5-hidroxitriptamina (5-HT), ambos potentes vasoconstrictores; y el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1), con acción antifibrinolítica (Alessi et al. 2007).

1.4.2. Mecanismos inhibidores de la función plaquetaria

Para inhibir la adhesión plaquetaria en un endotelio sano, las células del mismo liberan mediadores químicos entre los que se encuentran la heparina (que actúa previniendo la estimulación de los receptores de trombina), las prostaglandinas (PG) y la prostaciclina (estas dos últimas regulan de forma negativa la función de diversas vías señalizadoras de la plaqueta). La PGE₂ o PGI₂ estimulan la síntesis de adenosín monofosfato cíclico (AMP_c), que activa la proteína cinasa A (PKA), la cual fosforila diversas proteínas, lo cual produce una reducción de la liberación de Ca²⁺. La activación de la PKA inhibe además la PLC y la PLA₂ y la polimerización de actina (Andersen et al. 1980). Por otra parte, hay que destacar también el papel del NO, que es un producto del metabolismo de los aminoácidos, que se sintetiza en las células endoteliales y en las plaquetas bajo condiciones de estrés, y que estimula la síntesis de guanosin monofosfato cíclico (GMP_c), de forma que actúa de manera similar al AMP_c. De

hecho, tanto el GMP_c como el AMP_c trabajan sinérgicamente, regulando la función plaquetaria (Moore et al., 2010). En último lugar, las células del endotelio vascular expresan en sus membranas CD39, una enzima que posee actividad ATP difosfohidrolasa, que degrada ATP y ADP, reduciendo así la capacidad de ambos para estimular las plaquetas (Kanthi et al. 2014).

2. Cultivos celulares

2.1. MEG01

Los megacarioblastos son de gran utilidad en investigación dado que presentan numerosas respuestas similares a las que se observan en plaquetas y megacariocitos. Además, son un excelente modelo para investigar procesos de señalización celular en la línea celular megacarioblástica.

Las células MEG01 constituyen una línea celular megacarioblástica obtenida en 1983 en la Escuela de Medicina de la Universidad de Nagoya, Japón, a partir de células de médula ósea de un paciente con una crisis blástica de leucemia mieloide crónica.

Morfológicamente son células redondeadas, en ocasiones ovoideas, con el mismo tamaño aproximadamente que los blastos originales de los que proceden, con un núcleo también redondeado con cromatina fina y uno o varios nucléolos. El citoplasma es relativamente basófilo y contiene varias vacuolas. A veces emite protrusiones citoplasmáticas a modo de pseudópodos (Ogura et al. 1985).

Son células positivas para el factor VIII citoplasmático, y el GPIIb/IIIa de superficie; para la reacción de PAS (Periodic Acid Schiff, una técnica histoquímica para la detección de hidratos de carbono, libres o conjugados, en los tejidos cuando están en cantidades relativamente grandes); para la alfa-naftil acetato esterasa y para la fosfatasa ácida. Son negativas para la mieloperoxidasa, alfa-naftil butirato esterasa, naftol ASD- cloroacetato esterasa y fosfatasa alcalina.

Presentan tinción positiva con anticuerpos monoclonales BA-1 (anti células B, granulocito), HPL-3 (anti GPIIb/IIIa), y 20.3 (anti monocito, plaqueta), aunque son negativas para otras series antigénicas linfoides y mieloides.

En esta tesis doctoral, se ha utilizado la línea MEG01 debido a que supone un modelo muy útil en el estudio de la megacariopoyesis, la maduración megacariocítica y los mecanismos de biosíntesis de proteínas durante el proceso de formación de plaquetas maduras.

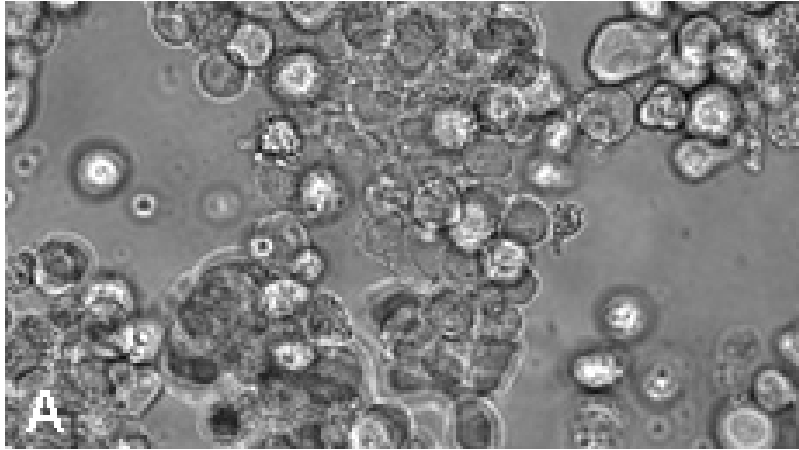


Fig 4. Células MEG01 observadas al microscopio óptico.

2.2. DAMI

Estas células se aislaron inicialmente de sangre periférica de un paciente con leucemia mieloide aguda, y ha sido utilizado tradicionalmente como herramienta para el estudio de la diferenciación eritroide, linfoide y mieloide. Los cultivos posteriores al aislamiento mantuvieron el fenotipo típico de los megacariocitos y como consecuencia todas las células que formaban el cultivo expresaban GPIb y el complejo GPIIb/IIIa, ambos descritos en los precursores de los megacariocitos de la médula ósea, los promegacarioblastos.

En la actualidad son utilizados en investigación porque se asemejan bastante bioquímica, morfológica y funcionalmente a los megacariocitos humanos a pesar de proceder también de células leucémicas. Por ello, las células DAMI también se utilizan como herramienta para el estudio de cuestiones relativas a la diferenciación megacariocítica y a los factores nucleares y citoplasmáticos que podrían estar implicados en la expresión diferencial de diferentes genes y en el perfil bioquímico de las células progenitoras. Debido a las dificultades para obtener preparaciones de megacariocitos humanos, estas células se suelen utilizar como modelo megacariocítico no tumoral.

2.3. NG115-401L

Se trata de una línea celular somática derivada de la hibridación de la línea de neuroblastoma de ratón N115TG-2 y la línea de glioma de rata C6BV-1 (Hatanaka et al. 1981). Presentan los antígenos neuronales A2B5, Chol-I y neurofilamentos proteicos, pero no expresan marcadores fibrilares gliales (Richardson et al. 1984). Por tanto esta línea celular antigénicamente se asemeja a una neurona colinérgica. El análisis del cariotipo demuestra que el hibridoma es

muy estable, pero con pocos cromosomas de rata por lo cual no presenta antígenos de rata ni características gliales, y fenotípicamente se asemeja a un tipo celular murino.

En los experimentos realizados para el desarrollo de esta tesis doctoral se ha utilizado esta línea celular debido a que se caracteriza por tener una expresión muy baja, casi inexistente, de la proteína STIM1 endógena, facilitando el estudio de las implicaciones de esta proteína en la ECC.

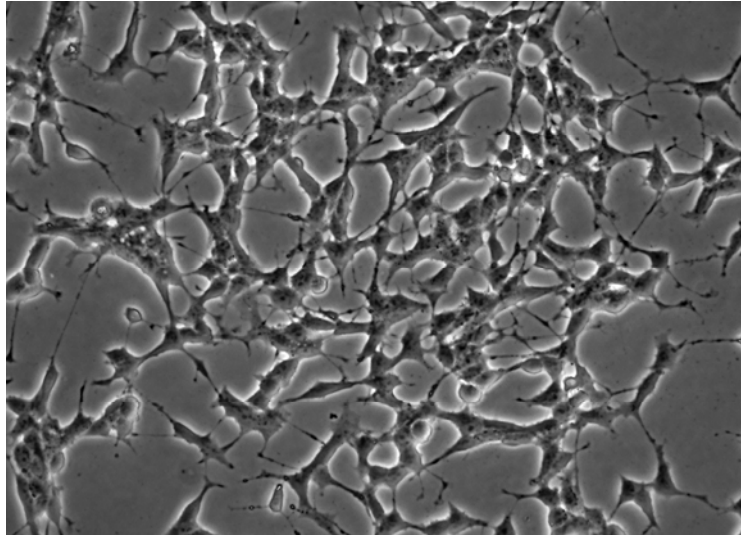


Fig 5. Células NG115-401L observadas al microscopio óptico.

2.4. SH-SY5Y

Es una línea celular humana ampliamente utilizada en investigación. Procede de otra línea celular llamada SK-N-SH aislada a partir de una biopsia de médula ósea de un paciente con neuroblastoma. Normalmente son usadas como modelo para el estudio de la función y diferenciación neuronal, puesto que presentan receptores adrenérgicos y dopaminérgicos

3. Homeostasis del Ca^{2+}

El ión Ca^{2+} es un segundo mensajero intracelular ampliamente distribuido en el reino animal, que participa en numerosos procesos celulares como son la fecundación, la contracción muscular, secreción, agregación plaquetaria e incluso la muerte celular programada o apoptosis. Por ello, diferentes sistemas modulan la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ para regular estas funciones, y en estado de reposo celular la mantienen a pequeñas concentraciones, en el rango de 10-100 nM. Cuando la célula es estimulada, por agonistas o estímulos físico-químicos, la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ puede alcanzar concentraciones del orden micromolar (Parekh et al. 2005) gracias al

Ca^{2+} procedente del medio extracelular, cuya concentración aproximada es de 1,2 mM, y del RE, principal depósito intracelular sensible a agonistas, cuya concentración de iones de Ca^{2+} libre oscila entre 21 μM y 2 mM, dependiendo del tipo celular investigado (Bygrave et al. 1996). El elevado gradiente electroquímico que existe en una célula en reposo es regulado mediante una sofisticada maquinaria para almacenar el Ca^{2+} en los depósitos intracelulares o para expulsarlo al exterior celular, mediante el uso de las ATPasas. Del mismo modo, las células poseen mecanismos que permiten la liberación de Ca^{2+} desde los almacenes intracelulares o el paso a través de las membranas a través de canales más o menos específicos para Ca^{2+} , que se encuentran cerrados cuando la célula está en estado de reposo evitando de esta forma el incremento continuo de Ca^{2+} en el citoplasma que produciría apoptosis y muerte celular.

La cinética de aumento de las concentraciones de Ca^{2+} es muy variable en cuanto a velocidad, amplitud y patrón espacio-temporal, lo que aporta una gran versatilidad debido a la posible combinación de las diferentes variables implicadas en la señalización, permitiendo así obtener señales con muy diversas respuestas celulares (Bootman et al. 2001).

En la ruta de señalización por Ca^{2+} se pueden diferenciar cuatro fases sucesivas (Berridge 2001). En primer lugar se produce la señalización mediada por un estímulo que genera la movilización de Ca^{2+} , seguidamente se activan los mecanismos que incrementan la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, que a su vez estimulan determinados procesos sensibles a la concentración de Ca^{2+} para finalmente activar los mecanismos que restauran la concentración basal de Ca^{2+} .

3.1. MECANISMOS QUE INCREMENTAN LA $[\text{Ca}^{2+}]_c$

La liberación de Ca^{2+} desde los compartimentos intracelulares finitos produce un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Sin embargo, determinados procesos celulares, así como el rellenado de los depósitos internos, requieren un incremento mayor y sostenido en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, por lo que los mecanismos de entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular tienen también un papel esencial en la fisiología celular.

3.1.1. Liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares

Cuando en la membrana plasmática se produce la unión de un ligando a su receptor, se produce la activación de la PLC, que genera dos segundos mensajeros intracelulares: el IP_3 y el DAG. El IP_3 a su vez induce la liberación de Ca^{2+} desde el RE a través de la unión a su receptor localizado en la membrana de dicho orgánulo, que sufre un cambio conformacional

permitiendo así la salida masiva de Ca^{2+} al citosol (Streb et al. 1983). Por su parte, el DAG activa la proteína cinasa C (PKC) (Berridge 1997).

-Receptores de IP_3 (IP_3R). Fueron descritos inicialmente por Furuichi (Furuichi et al. 1989), y se encuentran localizados principalmente en la membrana del RE. Cuando se unen a su ligando sufren un cambio conformacional que produce su apertura permitiendo la liberación desde los depósitos intracelulares (Berridge et al. 2003). Presentan en su estructura un dominio N-terminal de unión al IP_3 , un dominio regulador que incluye un sitio de unión a ATP y residuos susceptibles de fosforilación; y un dominio C-terminal con seis regiones transmembrana responsables de la agregación de todas las subunidades para formar el canal activo (Chadwick et al. 1990).

- Receptores de rianodina (RyR). Son similares a los IP_3R en cuanto a su localización, estructura y función. Los RyR son activados por rianodina (a concentraciones inferiores a $10\ \mu\text{M}$), cafeína, ADP ribosa cíclica y por Ca^{2+} (a concentraciones menores de $1\ \text{mM}$), produciendo un proceso de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR). La calmodulina (CaM) actúa como modulador de este canal, eliminando incluso el efecto conjunto que producen la rianodina, el ADP y la cafeína (Endo 2009).

- Receptores del nicotinado de adenina dinucleótido fosfato (NAADP). El NAADP, derivado desaminado del nicotinadenín dinucleótido fosfato (NADP), sintetizado por la propia célula en las mitocondrias es un mensajero capaz de liberar Ca^{2+} de los depósitos ácidos (lisosomas, endosomas y vesículas secretoras), de forma independiente al IP_3 y a la ADP ribosa cíclica (ADPR_c), a través de sus receptores específicos, los canales de doble poro (TPC) (Lopez et al. 2005; Patel et al. 2010; Zhu et al. 2010).

- Canal liberador de Ca^{2+} sensible a esfingolípidos (SCaMPER). Este canal libera Ca^{2+} intracitoplasmático, como respuesta a la unión de lípidos derivados de la esfingosina, cuya concentración se incrementa ante factores de crecimiento (como el PDGF). Sin embargo, no se conocen con exactitud las condiciones fisiológicas que producen su apertura (Young et al. 2000).

Además de estos canales localizados en las membranas de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} , existen proteínas localizadas en el interior de estos almacenes que unen Ca^{2+} en su estructura. Algunas de ellas son la calsecuestrina o la calreticulina.

3.1.2. Entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular

Como se ha mencionado anteriormente, la estimulación celular con agonistas induce un aumento de la $[Ca^{2+}]_c$ como consecuencia de la liberación de Ca^{2+} desde los almacenes intracelulares. Sin embargo, debido al carácter finito de estos depósitos en ocasiones este incremento es insuficiente, dado que numerosos procesos celulares, así como el rellenado de los depósitos de Ca^{2+} , requieren un incremento más intenso y sostenido de la $[Ca^{2+}]_c$. Es por ello que los mecanismos de entrada de Ca^{2+} en la célula desempeñan una función esencial en su fisiología.

En la membrana plasmática existen diferentes canales permeables a Ca^{2+} que presentan diferentes propiedades biofísicas. De acuerdo a su mecanismo de activación pueden ser agrupados en aquellos activados por cambios en el voltaje de la membrana, denominados canales operados por voltaje (VOCs), y aquellos operados por la ocupación de un receptor, que a su vez pueden ser clasificados en canales operados por receptor (ROCs), operados directamente por la unión de un ligando o agonista al receptor, como los receptores P2X (Fung et al. 2007), canales operados por segundos mensajeros (SMOCs) (operados por la unión de un mensajero intracelular o un segundo mensajero como ocurre en los canales TRPC activados por DAG) (Aires et al. 2007; Dietrich et al. 2007), y los canales operados por el vaciamiento de los depósitos (SOCs), activados por el vaciamiento de los depósitos de Ca^{2+} sensibles a agonistas (Parekh et al. 2005).

Entrada de Ca^{2+} activada por el vaciamiento de los depósitos intracelulares o entrada capacitativa de calcio (ECC)

La ECC es uno de los principales mecanismos de entrada de Ca^{2+} en células no excitables, estando regulado por el estado de relleno de los almacenes intracelulares de Ca^{2+} . Además, también tiene un papel importante en células excitables (Dominguez-Rodriguez et al. 2012; Koss et al. 2013; Xia et al. 2014).

Fue descrita por primera vez en 1986 por Putney, quien observó que una vez vaciados los reservorios intracelulares de Ca^{2+} , se produce la apertura de canales permeables a Ca^{2+} localizados en la membrana plasmática, que se encontraban cerrados en la célula en reposo. Estos canales permitirían una entrada masiva de Ca^{2+} al citoplasma, el relleno de los depósitos de Ca^{2+} y el cierre de los canales bloqueando la entrada de Ca^{2+} (Putney 1986). Originalmente se propusieron varios modelos para explicar la activación de los canales operados por depósito:

1.- Modelo difusible. Sugiere que al producirse el vaciamiento de los depósitos se generan moléculas difusibles que operan los SOCs en la membrana plasmática iniciando así la ECC. Las posibles moléculas difusibles propuestas para este modelo fueron: pequeños cambios en la concentración citosólica de GMP_c (Pandol et al. 1990; Rosado et al. 2001a), algunas tirosinas cinasas (Sargeant et al. 1993), pequeñas proteínas de unión a GTP (Bird et al. 1993; Fasolato et al. 1993), la generación de un producto del citocromo P450 (Alvarez et al. 1992) o la generación de un factor no proteico aún no caracterizado denominado CIF (Randriamampita et al. 1993). Sin embargo, tras la imposibilidad de identificar esta molécula, este modelo fue abandonándose.

2.- Modelo de acoplamiento conformacional constitutivo. Este modelo sugiere que el RE debería estar suficientemente cerca de la membrana plasmática para permitir una asociación permanente o constitutiva de los elementos de ambas estructuras. Este modelo fue propuesto inicialmente por Irvine e implicaba IP₃R en la membrana del RE y receptores de IP₄ en la membrana plasmática (Irvine et al. 1987; Irvine 1990).

3.- Modelo de acoplamiento conformacional "de novo". Esta hipótesis propone una alternativa al modelo anterior y se basa en un acoplamiento dinámico y reversible entre el IP₃R en el RE y los SOCs en la membrana plasmática. De acuerdo a este modelo, algunos microdominios del RE que incluyen los IP₃R y se encuentran ligeramente distantes de la membrana plasmática, son transportados hacia ella para favorecer la interacción reversible entre los IP₃R y los SOCs. Este transporte es mediado por el citoesqueleto de actina, que en estado de reposo impide la asociación constitutiva, pero durante la activación celular se reorganiza para permitir el acoplamiento (Rosado et al. 2000a; Rosado et al. 2000b).

4.- Modelo de secreción. Este modelo sugiere que, una vez vaciados los reservorios intracelulares de Ca²⁺, se produce una traslocación e inserción de canales ya formados desde el RE en la membrana plasmática mediante fusión de membranas (Fasolato et al. 1993).

Sin embargo, años después con el descubrimiento de nuevas proteínas implicadas en el mecanismo de ECC, como es el caso del sensor de Ca²⁺ del RE, STIM1, en 2005, estas hipótesis tuvieron que ser reconsideradas y reformuladas.

La ECC es un complejo mecanismo en el que se encuentran involucradas una gran variedad de proteínas que interactúan entre sí. Las principales son:

- STIM1 (*Stromal Interaction Molecule 1*). Es una proteína identificada en 2005 como el sensor de Ca²⁺ del RE responsable de la comunicación del estado de relleno del mismo a los

canales SOC de la membrana plasmática (Liou et al. 2005; Roos et al. 2005; Zhang et al. 2005). Es una proteína muy ubicua que consta de 685 aa con un peso molecular de 90 kDa aproximadamente. Su estructura se caracteriza por presentar en la región N-terminal localizada en el lumen del RE, un dominio EF-hand que actúa como el sensor de Ca^{2+} . La afinidad de este dominio por el Ca^{2+} es muy baja (0,5-1 mM) (Stathopoulos et al. 2009), de forma que, con los depósitos llenos, la alta concentración de Ca^{2+} en el interior de los mismos favorece la unión, pero una vez se produce el vaciamiento de estos depósitos, el dominio EF-hand queda libre. Cuando esto ocurre, STIM1 sufre un cambio conformacional que le permitirá unirse y activar los canales de la membrana plasmática (Liou et al. 2005). Además, STIM1 contiene otros dominios EF-hand funcionales ocultos, que no unen Ca^{2+} , pero son esenciales para la asociación intramolecular con un dominio alfa estéril (SAM) implicado en la respuesta conformacional de STIM1 al vaciamiento de los depósitos, y un único dominio transmembrana altamente conservado (Soboloff et al. 2006). El extremo C-terminal localizado en el citoplasma presenta tres dominios *coiled-coil*, que participan en la oligomerización de STIM1, una región rica en prolina/serina y un dominio polibásico al final de la proteína (Hogan et al. 2010). El fragmento citosólico de STIM1 contiene varios dominios funcionales que son relevantes para la activación de la ECC, entre los que se incluyen: 1) dominio CMD (*CRAC-modulatory domain*), que constituye un mecanismo de retroalimentación negativo para la entrada de Ca^{2+} induciendo la inactivación rápida de los canales Orai1 dependiente de Ca^{2+} (Derler et al. 2009), 2) un dominio inhibidor denominado CTID (*C-terminal inhibitory domain*), que regula la interacción de la proteína inhibidora de STIM1, SARAF, con el SOAR (región de STIM1 activadora de Orai1) evitando la activación constitutiva de la ECC (Jha et al. 2013) y 3) una región de STIM1 activadora de Orai1. Esta última, fue descrita simultáneamente por diferentes laboratorios que coincidiendo en las regiones esenciales difieren en algunos aminoácidos. Así, el OASF (*Orai-activating small fragment*), localizado entre los aa 233-474, incluye los tres dominios *coiled-coil*; la región SOAR (*STIM1 Orai1-activating region*), situada entre los aa 344-442 presenta las mínimas regiones esenciales para la interacción STIM1/Orai1; el CAD (*CRAC-activating domain*) localizado entre los aa 342-448 desempeña un papel importante en la agrupación de los canales Orai1/CRAC; y el CC9, que se sitúa entre los aa 339-446 (Kawasaki et al. 2009; Muik et al. 2009; Park et al. 2009; Yuan et al. 2009; Stathopoulos et al. 2013).

A pesar de que la principal localización de STIM1 se encuentra en la membrana del RE, un pequeño porcentaje de esta proteína se localiza en la membrana plasmática. No obstante su función no está esclarecida completamente aunque se ha descrito que podría participar en la regulación de los canales SOC actuando como sensor de Ca^{2+} del espacio extracelular a

través del dominio EF-hand orientado al medio externo (Spasova et al. 2006). Además, recientemente se ha descubierto que la fracción de STIM1 localizada en la membrana plasmática es necesaria para la activación de los canales ARC, un tipo de canales no capacitativos regulados por AA. Estos canales son heteromultímeros formados por tres subunidades de Orai1 y dos subunidades de Orai3 (Shuttleworth et al. 2007; Zhang et al. 2014).

STIM2 (*Stromal Interaction Molecule 2*) es el segundo miembro de la familia de proteínas STIM. Se expresa también de forma ubicua en humanos, aunque a niveles menores que STIM1. Sin embargo, al contrario que STIM1, STIM2 se localiza exclusivamente en la membrana del RE (Williams et al. 2001). Estas dos proteínas son similares estructuralmente, pero funcionalmente difieren en que la participación de STIM2 en la ECC no está completamente demostrada y parece depender en gran medida del tipo celular investigado. Por ejemplo, en plaquetas humanas y murinas parece tener un menor efecto en la ECC, si alguno, comparado con STIM1 (Gilio et al. 2010), mientras que en otros tipos celulares, como neuronas murinas o células dentríticas, STIM2 desempeña una función importante en la ECC (Berna-Erro et al. 2009; Bandyopadhyay et al. 2011).

- Orai1. También conocida como CRACM1. Esta proteína fue descrita en 2006 como proteína formadora del poro del canal que conduce la corriente I_{CRAC} , una corriente no activada por cambios de voltaje y altamente selectiva para Ca^{2+} . La identificación de Orai1 como parte del canal se consiguió al estudiar la mutación puntual Orai1^{R91W}, que da lugar al síndrome de inmunodeficiencia combinada severa, caracterizado por la deficiencia de corrientes I_{CRAC} en células T (Feske et al. 2006). Orai1 es una pequeña proteína de la membrana plasmática, aunque se han descrito algunas localizaciones intracelulares como reservorios que pueden ser insertados en la membrana plasmática durante la estimulación de las células con agonistas (Woodard et al. 2008). Se compone de 301 aa, lo que se traduce en una masa molecular de 33 kDa, masa que puede incrementarse debido a que es una proteína susceptible de glicosilación. Presenta ambos extremos, amino y carboxilo, en el citoplasma. Tiene 4 dominios transmembrana y el poro se halla situado entre el 2º y 3º. En su extremo amino tiene dos dominios ricos en prolina, uno rico en arginina y uno muy cercano al primer dominio transmembrana rico en arginina/lisina. Además, posee un sitio de unión a CaM antes de la primera región transmembrana, la cual produce la inactivación del canal al unirse (Mullins et al. 2009). En su extremo carboxilo presenta un dominio *coiled-coil* por el cual se une al extremo carboxilo de STIM1 (Muik et al. 2009; Park et al. 2009). Orai1 posee dominios estructurales que pueden formar un canal de Ca^{2+} muy selectivo (pNa^+/pCa^{2+}

aproximadamente de 1000). En concreto, el residuo de glutamato Glu¹⁰⁶ ha sido descrito recientemente como el filtro que define la selectividad a Ca²⁺ del canal (Rothberg et al. 2013). Asimismo, se ha descubierto que ciertos residuos del dominio ETON (*Extended transmembrane Orai1 N-terminal*) contribuyen a la unión de Orai1 con STIM1 así como a la activación de este último (Derler et al. 2013).

- TRPs. En los años 90 se propuso que los homólogos en mamíferos de los receptores de potencial transitorio (TRP, *transient receptor potential*) de *Drosophila* eran posibles canales mediadores de la ECC (Birnbaumer et al. 1996; Rosado et al. 2001b). Su nombre se debe a que la mutación de estos canales induce potenciales de membrana transitorios, por la entrada de Na⁺ y Ca²⁺, en lugar de los potenciales sostenidos que se producen en los canales no mutados (Hardie et al. 1992). En mamíferos se han identificado seis subfamilias de canales TRP: TRPC, TRPA, TRPV, TRPM, TRPML y TRPP, cada una de las cuales está constituida por diferentes isoformas. Por ejemplo, la subfamilia TRPC (TRP canónico) está formada por 7 canales (TRPC1-TRPC7), que se activan una vez producida la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) tras la estimulación con diversos agonistas en diferentes tipos celulares (Montell 2005; Parekh et al. 2005). Sin embargo, no todos los TRPCs participan en la ECC, sino que también funcionan como canales en otros tipos de entrada de Ca²⁺ no capacitativa (ENCC). La corriente generada por los canales TRP es un tipo de corriente capacitativa no selectiva para Ca²⁺ llamada *I_{SOC}* (*store-operated calcium current*) (Parekh et al. 2005). Entre ellos se destacan:

TRPC1. Es el TRP más estudiado puesto que fue el primer homólogo de los TRPs de *Drosophila* descrito en mamíferos. Se trata de un polipéptido de 793 aa que es expresado en la mayoría de tejidos humanos (Wes et al. 1995; Zhu et al. 1995). Presenta la estructura típica de los miembros de la familia TRPC, consistente en seis dominios transmembrana (TM) con el poro permeable a cationes situado entre el 5º y el 6º. En el extremo amino citosólico posee 4 repeticiones de ankirina, necesarias para la interacción con otros TRPCs, un dominio *coiled-coil*, necesario para la unión entre diferentes subunidades de TRPC1 y un sitio de unión para caveolina 1 (Vazquez et al. 2004). Por su parte, el extremo carboxilo, citosólico también, contiene el dominio típico de los TRP (EWKFAR), un dominio rico en prolina, un dominio de unión a CaM e IP₃R llamado CIRB, el cual modulará la activación de TRPC1 dependiente de Ca²⁺, y una región *coiled-coil* (Singh et al. 2002).

A pesar de que la implicación de TRPC1 en la entrada de Ca²⁺ operada por receptores está ampliamente aceptada, su implicación en la ECC parece estar reservada a ciertos modelos celulares. Es por ello, que numerosos estudios han demostrado que TRPC1 tiene un papel

fundamental en el desarrollo de la ECC de multitud de tipos celulares, como cardiomiocitos, células megacarioblásticas, mioblastos, fibroblastos o plaquetas entre otros (Xu et al. 2001; Rosado et al. 2002; Ohba et al. 2007; Galan et al. 2009; Olah et al. 2011; Almirza et al. 2012; Lopez et al. 2013). Sin embargo, existen varios estudios en los que el canal TRPC1 nativo no funciona como canal capacitativo (Sinkins et al. 1998), demostrando por tanto, que la implicación de los canales TRPC en la ECC depende del tipo celular investigado.

TRPC3. Es una proteína de 848 aa localizada en la membrana plasmática y estructuralmente muy similar al resto de miembros de la familia TRPC, aunque con ciertas particularidades. En el extremo amino, además de los dominios comunes, presenta un sitio de unión a la PLC γ en el primer dominio de ankirina y una unión para VAMP2 entre los dominios de ankirina 3 y 4 (Eder et al. 2007). Al igual que otros TRPCs, el TRPC3 forma heterotetrámeros y participa en la ENCC activada por agonistas, cuyos receptores están acoplados a proteínas G, que ponen en marcha la maquinaria de hidrólisis de PIP₂ generando DAG, que activará el canal. Además, se ha demostrado que el canal TRPC3 también está implicado en la ECC y puede ser activado por el vaciamiento de los depósitos en determinados modelos celulares (Zhu et al. 1996; Vazquez et al. 2001).

TRPC6. Se trata de un polipéptido de 931 aa que presenta también la estructura característica de la familia TRPC, pero a diferencia de TRPC1 y TRPC3 no posee sitios de unión para Cav1. El canal TRPC6 es 6 veces más selectivo a Ca²⁺ que a Na⁺. Tiene dos sitios de glicosilación en el primer y segundo bucle extracelular que determinan el funcionamiento de TRPC6 como canal operado por receptor, siendo activado de forma directa por el segundo mensajero DAG, por la fosforilación en residuos de serina y tirosina o por efecto de algunos fosfoinosítidos (Dietrich et al. 2003). En ciertos modelos celulares, cuando el canal TRPC6 tiene un comportamiento no capacitativo se encuentra formando un complejo con TRPC3 en regiones independientes de las balsas lipídicas de la membrana plasmática, donde se localizan los complejos de señalización característicos de la ECC. Sin embargo, tras el vaciamiento de los reservorios intracelulares de Ca²⁺, TRPC6 se disocia de TRPC3 e interacciona con las principales proteínas involucradas en la ECC, STIM1, Orai1 y TRPC1, funcionando en estos casos como canal capacitativo (Brechard et al. 2008; Jardin et al. 2008b; Redondo et al. 2008). En definitiva, el canal TRPC6 actúa como punto de convergencia entre las vías capacitativa y no capacitativa de entrada de Ca²⁺.

TRPA1. Denominada también ANKTM1 y P120. Es una proteína de gran tamaño (1119 aa en humanos) que tiene un peso molecular de 127 kDa. Como otros miembros de la familia

TRP, presenta seis dominios TM y la región formadora del poro se localiza entre TM5 y TM6. Se caracteriza por tener una gran cantidad de repeticiones de ankirina en la región N-terminal (hasta 18 en humanos). Los dominios de ankirina, con una longitud de 33 aa, están implicados en la interacción de TRPA1 con otras proteínas, aportan elasticidad a la molécula y son lugares esenciales de integración de múltiples señales fisiológicas que dan lugar a la activación del canal (García-Anoveros et al. 2007; Cvetkov et al. 2011). La región C-terminal consta de varios residuos básicos que confieren al canal de TRPA1 sensibilidad química y al voltaje (Samad et al. 2011). Se trata de un canal bastante polivalente puesto que puede ser activado por estímulos físicos (como el frío o la radiación ultravioleta (UV)) o ligandos endógenos (como el Ca^{2+} , especies reactivas de oxígeno (ROS) o el NO) o exógenos (como el alil isotiocianato) generando una entrada masiva de Ca^{2+} en la célula y activando en consecuencia diferentes procesos celulares (Earley et al. 2009; Cao et al. 2012; Sura et al. 2012). El ión Ca^{2+} es considerado como uno de los activadores más potentes del canal TRPA1. No en vano, dicho canal presenta un dominio EF-hand de unión a Ca^{2+} que modifica la flexibilidad del canal y determina su apertura (Zayats et al. 2013). Sin embargo, a pesar de que la taspigargina (TG), un compuesto inhibidor de las bombas encargadas de la recaptación de Ca^{2+} hacia los depósitos intracelulares muy utilizado en los estudios relacionados con la ECC, puede producir la modulación del canal TRPA1 (Jordt et al. 2004), aún no se conoce la implicación de este canal en dicho mecanismo.

Mecanismo de la entrada de Ca^{2+} operada por los depósitos

Una vez que el agonista se une a su receptor de membrana acoplado a proteínas G, se produce la activación de la PLC, que hidroliza PIP_2 y lo transforma en IP_3 y DAG. El IP_3 , por su parte, se une a su receptor localizado en el RE dando lugar a un cambio conformacional en el mismo que permitirá la liberación de Ca^{2+} desde el RE al citosol. La liberación del Ca^{2+} almacenado en los depósitos provoca que el Ca^{2+} que se encontraba unido al dominio EF-hand de STIM1 se disocie, lo cual a su vez provoca un cambio conformacional en STIM1 que activa los canales de la membrana plasmática. En reposo, STIM1 tiene ocultos los dominios *coiled-coil* por los que se activa a Orai1 y el dominio rico en prolina que activa a TRPC1. El cambio conformacional sufrido por STIM1 le permite, en primer lugar, formar homodímeros u homotetrámeros con otras moléculas de STIM1 y heterodímeros o heterotetrámeros con moléculas de STIM2. Estas uniones se formarán mediante el dominio SAM, situado en el extremo amino de las STIMs (Muik et al. 2011). Una vez que se han vaciado los reservorios de Ca^{2+} , ambas proteínas se reorganizan en regiones del RE próximas a las balsas lipídicas de la membrana plasmática, microdominios con un alto contenido en colesterol y esfingolípidos (Pani et al. 2008). La interacción entre STIM1 y Orai1 se produce en puntos muy concretos y

localizados de la célula, denominados regiones punctae, donde la separación entre la membrana plasmática y el RE es menor de 100 nm (Liou et al. 2005; Baba et al. 2006). STIM1 se une a Orai1 mediante los dominios *coiled-coil* de los extremos carboxilo de ambas proteínas, y el dominio SOAR de STIM1 activa Orai1, permitiendo la entrada de Ca^{2+} desde el exterior (Yuan et al. 2009). Asimismo, STIM1 se une a la membrana por su dominio K en el extremo C-terminal, de forma que estabiliza las uniones con las proteínas de membrana. Este mismo dominio es esencial para la activación de los canales TRPC1 y TRPC3 mediante interacción electrostática (Yuan et al. 2007). En plaquetas humanas, el vaciamiento de los depósitos intracelulares aumenta la interacción entre STIM1 y TRPC1 en un 50%, y este incremento es inhibido por la electrotransyección de un anticuerpo anti-STIM1 (Lopez et al. 2006), bloqueando además la interacción entre TRPC1 y el IP_3R que se produce tras el vaciamiento de los almacenes de Ca^{2+} (Rosado et al. 2000c). Esta interacción entre el TRPC1 y los IP_3Rs tiene un papel fundamental en la ECC en varias líneas celulares (Rosado et al. 2000c; Sundivakkam et al. 2009; Adebisi et al. 2011). Por otra parte, se ha visto que STIM1 se transloca a la membrana plasmática una vez que se han vaciado los depósitos (Zhang et al. 2005) y que esta STIM1 en la membrana plasmática es necesaria para las corrientes I_{CRAC} en células T Jurkat y la ECC en HEK293 (Spasova et al. 2006). En plaquetas humanas esta translocación necesita los filamentos de actina (Lopez et al. 2006). Sin embargo, hay autores que se oponen a la idea de la translocación de STIM1 a la membrana plasmática, y sugieren que como la distancia entre las membranas del RE y la membrana plasmática es muy pequeña (100 nm), STIM1 actuaría como si estuviera en la membrana plasmática cuando en realidad se sitúa en el RE (Mercer et al. 2006; Soboloff et al. 2006). Actualmente se cree que la falta de detección de STIM1 en la membrana plasmática en modelos celulares transfectados con STIM1 se debe a la conjugación de STIM1 con proteínas fluorescentes, que, de algún modo, impedirían la expresión de STIM1 en la membrana plasmática. Los estudios actuales sugieren que existen dos poblaciones de STIM1 localizadas en la membrana del RE, la primera identificada, y en la membrana plasmática. El papel de la STIM1 localizada en la membrana plasmática estaría relacionado con la modulación de la entrada de calcio a través de canales capacitativos (Jardin et al. 2009b) y canales regulados por AA (Zhang et al. 2014).

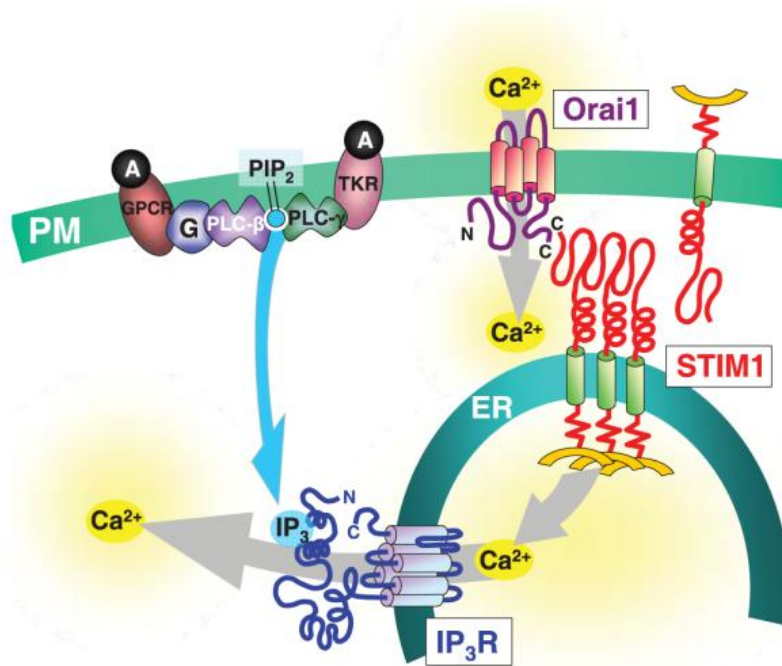


Fig 6. Esquema representativo de los elementos que participan en la ECC (Wang et al. 2008).

3.2. MECANISMOS QUE DISMINUYEN LA $[Ca^{2+}]_c$

Una vez realizada la función celular que requería el aumento de la $[Ca^{2+}]_c$, las células necesitan recuperar sus concentraciones basales de Ca^{2+} para evitar la activación de procesos apoptóticos que conllevarían a la muerte celular como consecuencia de un exceso de Ca^{2+} en el citosol. Además, algunos de estos procesos permanecen activados de forma continua para mantener la baja $[Ca^{2+}]_c$ característica de una célula en reposo.

En el proceso de recuperación de la $[Ca^{2+}]_c$ basal tiene especial importancia el papel que desempeña la bomba ATPasa de Ca^{2+} del RE (SERCA). La bomba SERCA es un polipéptido de 110 kDa que se localiza en las membranas de los almacenes intracelulares de Ca^{2+} , hacia donde lo reintroduce en un proceso realizado en contra de gradiente con el consecuente consumo de ATP. Presenta 3 dominios principales en su parte citosólica: el dominio de fosforilación y el de unión a nucleótidos, que juntos forman el sitio catalítico, y el dominio ejecutor, al que se une el Ca^{2+} y favorece los cambios conformacionales de la proteína. Cuando SERCA une dos iones Ca^{2+} en su dominio citosólico sufre un cambio conformacional por el cual dicho dominio queda orientado hacia el lumen del almacén de Ca^{2+} , donde disminuye la afinidad de los sitios de unión a Ca^{2+} por el ión, liberándolo en el interior. Esta disociación induce un nuevo cambio conformacional por el que SERCA retorna a su estado inicial (Periasamy et al. 2007). Se han identificado tres genes diferentes que dan lugar a las isoformas SERCA1, SERCA2 y SERCA3 y a una diversidad adicional de variantes de estas isoformas mediante splicing alternativo (Pozzan

et al. 1994). La regulación de esta bomba es llevada a cabo por la proteína de membrana fosfolambam (6 kDa), que inhibe la actividad SERCA1 y SERCA2 (pero no SERCA3) por bloqueo de su sitio activo. Esta inhibición se relaja cuando fosfolambam es fosforilada por PKA o proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} y CaM (CaM cinasa II) (Metcalfe et al. 2005). El inhibidor más selectivo de SERCA conocido, que no afecta a otras bombas de Ca^{2+} , es la tapsigargina (TG) (Thastrup et al. 1989), una lactona sesquiterpénica que lleva a la proteína a un estado inactivo irreversible. Otros inhibidores menos específicos son el vanadato, que sólo inhibe a la SERCA a concentraciones superiores a 20 μM (Caroni et al. 1981); el lantano, que inhibe la formación de fosfoproteína SERCA (Wuytack et al. 1992); el ácido ciclopiazónico, de carácter inhibitorio reversible, y la 2,5-di(ter-butyl)-1,4,-hidroquinona (TBHQ), de actuación similar a la primera pero con potencia de inhibición variable en función de las diferentes isoformas de SERCA (Cavallini et al. 1995), de manera que es uno de los inhibidores más versátiles para analizar la funcionalidad de las diferentes isoformas de SERCA.

La extrusión de Ca^{2+} al medio extracelular se lleva a cabo principalmente mediante la bomba de Ca^{2+} dependiente de ATP de la membrana plasmática (PMCA). Con una estructura y funcionalidad similar a las de la bomba SERCA, presenta 10 dominios TM, localizándose los extremos amino y carboxilo en la parte citoplasmática de ésta. En el bucle localizado entre TM4 y TM5 contiene el dominio catalítico, que incluye el sitio de unión a ATP, mientras que el extremo carboxilo, donde se encuentra el sitio de unión a Ca^{2+} -CaM, constituye el principal dominio regulador de PMCA (Penniston et al. 1998). Uno de los principales factores moduladores de la PMCA es el propio ión Ca^{2+} . Así, después del aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ la velocidad de salida de Ca^{2+} a través de la PMCA también aumenta (Bautista et al. 2002).

En el proceso de eliminación de Ca^{2+} hacia el medio extracelular también contribuye el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) localizado en la membrana plasmática. El NCX, con un tamaño aproximado de 108 kDa) está constituido por 11 dominios TM con sus extremos amino y carboxilo orientados hacia el citosol. El intercambio del NCX es electrogénico, pues su estequiometría es $3\text{Na}^+:1\text{Ca}^{2+}$ (Hilgemann et al. 1991), lo cual da lugar a una corriente eléctrica hacia el citoplasma por el movimiento de una carga neta positiva. Además, el NCX es sensible a cambios en el potencial de membrana y al gradiente de Na^+ , pudiendo cambiar de dirección cuando se alteran estas condiciones. Asimismo, la operación de los SOCs tras el vaciamiento de los depósitos también induce una entrada de Na^+ sustancial que seguidamente activa de forma reversa el NCX proporcionando por tanto una vía adicional de entrada de Ca^{2+} durante la ECC (Harper et al. 2007).

Asimismo, determinadas proteínas citosólicas también actúan disminuyendo la $[Ca^{2+}]_c$ mediante su unión a dicho ión. Algunas de estas proteínas son la CaM, calretinina, calbindina o parvalbúmina. La mayor parte de estas proteínas actúa tamponando la $[Ca^{2+}]_c$ de forma que, en condiciones de reposo, se mantiene la $[Ca^{2+}]_c$ baja, y mantienen así un equilibrio entre el Ca^{2+} libre y el que se encuentra unido a proteínas. En las células, tanto excitables como no excitables, entre el 98 y el 99% del Ca^{2+} intracelular se encuentra unido a proteínas (Neher et al. 1992).

Objetivos

OBJETIVOS

1. *Determinar el papel de la proteína TRPA1 en la fisiología de plaquetas y células megacarioblásticas humanas y en concreto en la ECC.*
2. *Establecer el papel del canal TRPC6 en la regulación de la concentración basal de Ca^{2+} de la célula en reposo.*
3. *Analizar la sensibilidad del canal TRPC6 a las modificaciones del pH extracelular que tienen lugar en ciertas patologías.*
4. *Explorar el papel de la proteína STIM1 en la heteromerización de los canales TRPCs que tiene lugar durante la ECC.*

OBJECTIVES

1. *To determine the role of TRPA1 in cell physiology and particularly in SOCE.*
2. *To establish the role of TRPC6 in the regulation of cytosolic basal calcium concentration.*
3. *To analyze TRPC6 sensitivity to changes in extracellular pH.*
4. *To explore the role of STIM1 in TRPC heteromultimerization that takes place during SOCE.*

Metodología

Para la consecución de los anteriores objetivos, se llevaron a cabo los siguientes procedimientos experimentales.

1. Reactivos

- ◆ 1-oleoil-2-acetil-sn-glicerol (OAG) - Calbiochem (Madrid, España).
- ◆ AITC - Sigma (Madrid, España).
- ◆ Albúmina de suero bovino (BSA) - Sigma (Madrid, España).
- ◆ Anticuerpo anti-actina - Sigma (Madrid, España).
- ◆ Anticuerpo antiinmunoglobulina G de conejo conjugado con peroxidasa de rabano. GE Healthcare (Madrid, Espana).
- ◆ Anticuerpo antiinmunoglobulina G de raton conjugado con peroxidasa de rabano.GE Healthcare (Madrid, Espana).
- ◆ Anticuerpo anti-Orai (C terminal) - Sigma (Madrid, España).
- ◆ Anticuerpo anti-SERCA2b - Abcam plc. (Cambridge, UK).
- ◆ Anticuerpo anti-STIM1 - BD Transduction Laboratories (Franklin Lakes, NJ).
- ◆ Anticuerpo anti-TRPA1 - Sigma (Madrid, España).
- ◆ Anticuerpo policlonal anti-hTRPC1 - Alomone Laboratories (Jerusalen, Israel).
- ◆ Anticuerpo policlonal anti-hTRPC6 - Alomone Laboratories (Jerusalem, Israel).
- ◆ Anticuerpo policlonal anti-TRPC3 - Abcam plc. (Cambridge, UK).
- ◆ Apirasa (grado VII) - Sigma (Madrid, España).
- ◆ Aspirina - Sigma (Madrid, España)
- ◆ Deferoxamina. Sigma (Madrid, España).
- ◆ Ditiotreititol (DTT) - Sigma (Madrid, España).
- ◆ DMSO: Dimetil sulfóxido - Sigma (Madrid, España).
- ◆ Dodecilsulfato sódico (SDS) - Sigma (Madrid, España).
- ◆ EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin - Pierce (Rockford, Estados Unidos).
- ◆ Fura-2-acetilmetil éster (fura-2/AM) - Molecular Probes (Leiden, Países Bajos).

- ◆ H₂O₂ - Sigma (Madrid, España).
- ◆ HC-030031 - Sigma (Madrid, España).
- ◆ Hyp 9 - *Sigma (Madrid, España)*.
- ◆ Marcador de Peso Molecular - Bio Rad Laboratories, Inc. (España)
- ◆ Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). *Lonza (Cologne A.G., Alemania)*.
- ◆ Nonidet P-40. Sigma (Madrid, España).
- ◆ Proteína agarosa A - Upstate Biotechnology Inc. (Madrid, España).
- ◆ RPMI 1640 - *Lonza (Cologne A.G., Alemania)*
- ◆ Tapsigargina (TG) - Sigma (Madrid, España).
- ◆ Tris - Sigma (Madrid, España).
- ◆ Tritón X-100 - Sigma (Madrid, España).
- ◆ Turbofect Transfection Reagent - Thermofisher (Madrid, España)
- ◆ Tween-20 - Sigma (Madrid, España).
- ◆ Trombina - Sigma (Madrid, España).

El resto de reactivos utilizados son de grado analítico y han sido suministrados por Panreac (España).

2. Obtención de plaquetas humanas

2.1 SELECCIÓN DE INDIVIDUOS SUSCEPTIBLES DE INVESTIGACIÓN

Las muestras de sangre utilizadas para la realización de los experimentos fueron extraídas de donantes voluntarios sanos que no tomaban fármacos, y la obtención de las mismas se realizó mediante punción venosa en el Laboratorio de Análisis Clínicos del Dr. Hernández Cruz (C/ San Antón, 10; Cáceres), o bien a partir de concentrados de plaquetas donados para la investigación por el servicio de Hematología General del Hospital San Pedro de Alcántara (Avenida Pablo Naranjo Porras, s/n; Cáceres).

Todos los procesos se llevaron a cabo cumpliendo los principios de la Declaración de Helsinki y sus revisiones posteriores para estudios en humanos, la Ley 14/2007, de

investigación biomédica, el Convenio del Consejo de Europa relativo a los Derechos Humanos y de la Biomedicina, la Declaración de la UNESCO sobre el genoma humano y los derechos humanos, la legislación para tal fin vigente en España y la Unión Europea. Asimismo, los experimentos realizados cumplieron también con los principios de los Comités de Bioética del Servicio Extremeño de Salud y de la Universidad de Extremadura.

2.2 PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE PLAQUETAS

La sangre obtenida se mezcló con una solución de ácido cítrico dextrosa (ACD) en una proporción 1:6 (ACD:sangre) para evitar la activación plaquetaria y la coagulación sanguínea.

Reactivo	Concentración (mM)	(g/L)
Ácido cítrico	85	25
Citrato sódico	78	15
Glucosa	111	20

Tabla 1. Solución ACD (pH = 7,46 mezclado con la sangre)

Una vez mezclada la sangre con la solución anticoagulante, fue centrifugada durante 5 minutos a 700 $\times g$, obteniéndose como resultado tres fracciones bien diferenciadas: una de color rojo, en el fondo, constituida por los glóbulos rojos o eritrocitos; un halo intermedio de color blanquecino, donde se encuentran los glóbulos blancos o leucocitos; y una de color amarillento, en la parte superior, denominada plasma rico en plaquetas (PRP). Tras separar el PRP, éste fue suplementado con ácido acetilsalicílico (100 μM), un inhibidor irreversible de la ciclooxigenasa COX-I, que evita la liberación de PG plaquetarias y en consecuencia la activación espontánea; y apirasa (40 $\mu g/mL$) que hidroliza el ADP y el ATP secretado por las plaquetas impidiendo la activación plaquetaria mediada por dichos agonistas.

Por último, el PRP suplementado se centrifugó a 350 $\times g$ durante 20 minutos para sedimentar las plaquetas en el fondo del tubo formando un pellet blanquecino, y así poder separarlas del plasma pobre en plaquetas (PPP) que obtendremos como sobrenadante. Tras retirar el PPP, las plaquetas fueron resuspendidas en un medio tampón HEPES salino (HBS), suplementado con apirasa (40 $\mu g/ml$).

Reactivo	Concentración (mM)	(g/L)
HEPES	10	2,383
Cloruro sódico	145	8,468
Cloruro potásico	5	0,374
Sulfato de magnesio	1	0,264
Glucosa	20	1,8
BSA	1 mg/mL	1

Tabla 2. Tampón HBS (pH = 7,4)

3. Obtención de plaquetas murinas

3.1. RATONES UTILIZADOS PARA LA INVESTIGACIÓN

Las plaquetas murinas se obtuvieron a partir de sangre de ratones sanos mutantes (TRPC6 KO, del inglés *Knock Out*) o salvajes (WT, del inglés *Wild Type*) con edades comprendidas entre las 8 y 12 semanas mediante punción en el plexo retroorbital bajo condiciones anestésicas con isoflurano cumpliendo con las recomendaciones del Comité Ético de Experimentación Animal de la UEx y respetando el RD 53/2013. Estos animales, tanto los mutantes (B6;129P2-Trpc6tm1Dgen) como los salvajes fueron obtenidos a través de la red *European Mouse Mutant Archive* (EMMA).

3.2. GENERACIÓN DEL RATÓN TRPC6 KO

Los ratones deficientes en la proteína TRPC6 fueron obtenidos de Deltagen, Inc. (San Mateo, CA, USA) y fueron generados mediante la subclonación de una región del gen *Trpc6* que contenía el exón cuatro (E4). El vector de ADN exógeno fue construido mediante la sustitución de 13 nucleótidos localizados en el E4 con un cassette de selección que contiene un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), el gen *LacZ* (que codifica para la enzima β -galactosidasa) y el gen *Neo* de resistencia al antibiótico neomicina. Dicho fragmento de ADN fue introducido mediante electroporación en células madre embrionarias (células ES), utilizadas como vehículo para introducir las modificaciones genéticas en la línea germinal del ratón. Se seleccionaron las colonias de células ES que expresaban el gen de resistencia a neomicina y se aisló su ADN para evaluarlo mediante Southern blot utilizando una sonda externa específica para el gen *Trpc6*, que permite identificar aquellos clones que han integrado mediante recombinación homóloga el alelo truncado en el locus salvaje de *Trpc6*. Los clones de células ES electroporadas que eran heterocigotas para el alelo truncado de *Trpc6* se inyectaron en blastocistos salvajes de 3,5 días para generar el ratón quimera. Los ratones

quimera fueron cruzados con ratones C56Bl6 para obtener la primera generación (F1) de ratones heterocigotos para el alelo truncado de *Trpc6*, y posteriormente los individuos resultantes se cruzaron nuevamente entre sí para obtener animales mutantes homocigotos (KO).

3.3. AISLAMIENTO DE ADN Y GENOTIPADO

Para realizar el genotipado de los ratones y verificar que se trataba de individuos homocigotos se aisló el ADN de los animales partiendo de 5 mm² de tejido auricular. Dicho tejido fue digerido con una solución de lisis de ADN durante toda la noche (Tampón de lisis de ADN). Posteriormente se precipitó tanto el SDS como las sales contenidas en la solución con cloruro sódico saturado para posteriormente separarlo mediante centrifugación durante 30 minutos a 16000 x *g*. El sobrenadante obtenido en la centrifugación se mezcló con etanol absoluto y se sometió a centrifugación durante 10 minutos a 16000 x *g* para precipitar el ADN genómico. El pellet de ADN genómico se lavó con etanol diluido al 70%, y tras evaporar el posible etanol residual del pellet, éste fue resuspendido en tampón TE.

Reactivo	Concentración (mM)	(g/L)
Tris-HCl	10	1,21
EDTA	25	7,31
NaCl	50	2,92
SDS	0,5 %	5
Proteinasa K		0,5

Tabla 3. Tampón de lisis de ADN (pH = 8)

Reactivo	Concentración (mM)	(g/L)
Tris-HCl	10	1,21
EDTA	1	0,29

Tabla 4. Tampón TE (pH = 8)

El ADN aislado se utilizó como molde de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el fin de obtener gran cantidad del fragmento de ADN de interés en un termociclador, con la ayuda de una ADN polimerasa termoestable, y así poder realizar el genotipado de los ratones utilizados en el estudio, WT como KO. Para la identificación de los alelos determinados se utilizaron los siguientes cebadores específicos: mTRPC6_genot_2F 5'-atatgccacatttaagctaggatgaac-3'; mNeo_F 5'-gggccagctcattcctcccactcat-3'; mTRPC6_genot_R 5'-agctagatctttgcctgctggacag-3'.

Las reacciones de PCR se realizaron de forma separada para los alelos WT y KO, utilizando diferentes combinaciones de cebadores en cada uno de los casos. Para amplificar el alelo salvaje, se utilizaron los cebadores mTRPC6_genot_2F y mTRPC6_genot_R (588 pb), mientras que para amplificar el alelo KO se utilizaron los cebadores mNeo_F y mTRPC6_genot_R (408 pb). El programa de PCR utilizado fue el reflejado en la siguiente tabla:

95 °C	5 minutos	35 ciclos
94 °C	30 segundos	
60 °C	30 segundos	
72 °C	30 segundos	
72 °C	10 minutos	

3.4. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa, un método normalizado que se utiliza para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN. Se fundamenta en la aplicación de una fuerza electromotriz que desplaza las moléculas a través del gel, un polímero entrelazado de porosidad variable determinada por la concentración de agarosa utilizada, que es colocado en una cubeta de electroforesis sumergido en un tampón de pH alrededor de 8. Al situar las moléculas en el gel y ser sometidas a una diferencia de potencial eléctrico, éstas se desplazarán hacia el cátodo, si están cargadas positivamente, o hacia el ánodo, si están cargadas negativamente. En el caso de los ácidos nucleicos, la dirección de migración es del electrodo negativo al positivo, debido a que a pH superiores a 5 poseen carga negativa. La velocidad de migración es inversamente proporcional al tamaño de los fragmentos de ADN de doble hélice.

En el caso de los geles de agarosa, se le añade además bromuro de etidio, una sustancia que se intercala entre las bases del ADN y es fluorescente cuando se ilumina con luz ultravioleta (UV). Tras la electroforesis, se visualiza el gel con un transiluminador de luz UV, y se observan las bandas correspondientes a las muestras de ADN aplicado así como los marcadores de peso molecular.

Los productos obtenidos en la PCR realizada para el genotipado, fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa 1% (p/v), los cuales fueron preparados disolviendo agarosa en tampón de electroforesis TAE a una temperatura aproximada de 60-70 °C.

Reactivo	Concentración (mM)	(g/L)
Trizma Base	40	4,85
EDTA	20	5,84
Ácido acético glacial		57,2 mL

Tabla 5. Tampón TAE

Posteriormente, y con la solución aún caliente, se añadió bromuro de etidio (10 mg/ml) hasta una concentración final de 0.5 µg/ml.

Tras la migración, se observó el gel bajo una lámpara UV, y se extrajeron fragmentos de aproximadamente 1 cm³ que contenían el producto de PCR. Finalmente se purificó el producto de PCR del gel utilizando el PCR NucleoSpin® Extract II Kit, y el ADN amplificado y purificado fue secuenciado por el servicio STAB-SAIUex (Universidad de Extremadura) para confirmar la correcta amplificación de la región deseada de ADN genómico.

3.5. PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE PLAQUETAS

La sangre obtenida se mezcló con ACD en las mismas proporciones que las utilizadas para el procesamiento de sangre humana. Se separó el PRP mediante centrifugación a 300 ×g, y se suplementó con ácido acetil salicílico (100 µM) y apirasa (40 µg/mL). Tras una última centrifugación a 600 ×g durante 5 minutos se obtuvo un pellet de plaquetas sedimentadas que fueron resuspendidas en una solución tampón de Tyrode, suplementado con apirasa (40 µg/mL).

Reactivo	Concentración (mM)	(g/L)
HEPES	5	1,19
Cloruro sódico	137	8,01
Cloruro potásico	2,7	0,201
Carbonato sódico	12	1,008
Fosfato sódico	0,43	0,052
Cloruro magnésico	1	0,095
Glucosa	0,35%	3,5
BSA	0,1%	1

Tabla 6. Tampón de Tyrode (pH = 7,13)

4. Cultivo celular

4.1. TIPOS CELULARES

4.1.1. MEG

Las células MEG-01 fueron adquiridas de la American Type Culture Collection (ATCC) y se cultivaron en suspensión en condiciones de humedad saturada con una presión parcial de CO₂ del 5% a 37 °C en el medio de cultivo "Roswell Park Memorial Institute" (RPMI 1640), suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina. En el momento de los experimentos, las células se resuspendieron en medio HBS.

Maduración celular o diferenciación megacariocítica

El proceso de la diferenciación megacariocítica se asocia a cambios fenotípicos y morfológicos como la adquisición de marcadores específicos de megacariocitos como CD41, CD61 y CD10 (Herrera et al. 1998). Estudios recientes sugieren el papel de la ruta MEK/MAPK en la modulación de la diferenciación megacariocítica a través de la activación de la proteína cinasa C (PKC) (Racke et al. 1997; Choi et al. 2007), un proceso comparado con el mecanismo fisiológico que ocurre en la médula en respuesta a una variedad de estímulos. Por este motivo, es posible inducir experimentalmente la maduración celular de los megacarioblastos con ésteres de forbol. En este estudio, se utilizó el forbo 12-miristato 13-acetato (PMA) a una concentración de 10 nM para inducir la maduración de las células MEG-01 durante un tiempo máximo de 4 días, periodo durante el cual las células eran incubadas con esta sustancia diluida en el medio de cultivo. Como control positivo de maduración se utilizó el nivel de expresión en superficie de Rap1b, una proteína perteneciente a la superfamilia de las Ras GTPasas que incrementa su expresión durante la diferenciación megacariocítica y es ampliamente aceptada como marcador positivo de este proceso (Nagata et al. 1997a; Balduini et al. 2004).

4.1.2. DAMI

La línea celular megacarioblástica DAMI fue adquirida de la ATCC y cultivada bajo las mismas condiciones que las células MEG-01. En el momento de los experimentos, las células se resuspendieron en medio HBS.

4.1.3. NG115-401L

Estas células fueron cultivadas en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) bajo las mismas condiciones que en los casos anteriores.

4.1.4. SH-SY5Y

Estas células fueron utilizadas como control de la línea celular anterior, puesto que se trata de una línea de neuroblastoma humano, que sí expresa de forma endógena la proteína STIM1. Se cultivan bajo las mismas condiciones que las NG115-401L.

4.2. TRANSFECCIÓN CELULAR

La transfección consiste en la introducción de material genético externo en las células eucariotas mediante plásmidos, vectores víricos u otras herramientas para la transferencia. En los estudios realizados, se realizó mediante un método por el cual el material genético que se desea introducir en la célula se mezcla con un polímero catiónico formando unos complejos estables y compactos, cargados positivamente, que protegen al ADN plasmídico de la degradación y además facilitan su liberación en el interior de la célula. Para ello se usó el Turbofect Transfection Reagent®, que muestra una alta eficiencia de transfección y una toxicidad celular muy baja. En este caso se deseaba sobreexpresar la proteína STIM1 para así poder comprobar su efecto en los mecanismos estudiados. El plásmido utilizado para la realización de estos experimentos fue amablemente suministrado por el Dr. Pingyong Xu y su construcción se hizo introduciendo la secuencia de una proteína fluorescente sensible a pH inmediatamente después de la región codificante de STIM1. La proteína resultante de la transfección con este plásmido presenta la misma distribución espacial que la proteína endógena y su coexpresión con Orai1 reconstituyó la corriente de entrada de calcio capacitativa, demostrando así que era equivalente funcionalmente a la proteína nativa.

La transfección de células NG115-401L se realizó cuando las células alcanzaron una confluencia del 80% aproximadamente, en una razón masa ADN (μg)/ volumen agente de transfección (μl) de 1:2. Tanto el agente de transfección como el ADN plasmídico fueron diluidos en medio DMEM libre de suero e incubados durante 20 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se añadió a la placa de cultivo y los experimentos fueron realizados 48 horas después.

5. Determinación de la $[Ca^{2+}]_c$. Fluorimetría.

5.1. Fura-2/AM

La sonda fura-2 acetoximetiléster (FURA-2/AM) es un fluoróforo de calcio permeable a la membrana plasmática al presentar en su estructura un grupo acetoximetiléster (AM), que una vez se introduce en el interior celular, es cortado por esterasas citosólicas que liberan el fura-2 del grupo AM impidiendo que atraviese de nuevo la membrana plasmática así como las membranas de los orgánulos intracelulares. Este fluoróforo presenta una constante de disociación (K_d) para el Ca^{2+} de 120-250 nM, en función de la temperatura, lo cual permite detectar pequeñas variaciones de Ca^{2+} muy pequeñas hasta el rango nanomolar (Grynkiewicz et al. 1985).

Presenta dos longitudes de onda de excitación, una a 340 nm y otra a 380 nm, y una longitud de onda de emisión a 505 nm, de modo que cuando el ión calcio se une al fluoróforo se produce un incremento de la fluorescencia emitida a 505 nm al excitar a la longitud de onda de 340 nm, mientras que por el contrario al excitar con una longitud de onda de 380 nm la fluorescencia emitida disminuye. Esta característica permite utilizar esta sonda como ratiométrica, ya que permite observar los máximos y mínimos de emisión a 505 nm y obtener una ratio de estos valores. La ratio de fluorescencia emitida (340/380) es proporcional a las variaciones en $[Ca^{2+}]_c$, de forma que se evitan errores derivados de una distribución no homogénea en el citosol celular, carga deficiente del marcador u otros posibles artefactos originados durante la manipulación experimental (Paredes et al. 2008).

Otra ventaja importante de este fluoróforo es que su punto isobéptico (punto de isofluorescencia) es a 360 nm, permitiendo monitorizar los cambios en la fluorescencia no dependiente de Ca^{2+} , o apreciar el apagamiento de la fluorescencia cuando la molécula se une a algunos metales pesados como el Mn^{2+} (Sage et al. 1989).

5.2. CARGA DEL INDICADOR

En el caso de los estudios realizados en plaquetas de ratón, las plaquetas resuspendidas en tampón Tyrode fueron incubadas en presencia de fura-2/AM a una concentración de 2 μ M durante 45 minutos a una temperatura de 37 °C y en oscuridad. Una vez terminada la incubación, se centrifugó la suspensión celular a 600 \times g y se resuspendieron finalmente en tampón Tyrode para realizar los experimentos.

La carga del indicador en células MEG-01 se realizó en el propio medio de cultivo incubando las células durante 30 minutos con fura-2/AM 2 μ M a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, se tomaron las células necesarias para la medición y se pusieron sobre los portas cubreobjetos previamente recubiertos con polilisina, de modo que no fue necesario centrifugar las células para retirar la sonda no unida.

Por último, las células adherentes NG115-401L, se sembraron el día previo al experimento en placas con los cubres portaobjetos en los que se realizaría la medida de Ca^{2+} el día del experimento. De esta forma, la incubación con fura-2/AM 2 μ M se realizó en el propio medio de cultivo de las células durante 30 minutos a temperatura ambiente.

5.3. DETERMINACIÓN DE LA $[Ca^{2+}]_c$ MEDIANTE MÉTODOS FLUORIMÉTRICOS

En los experimentos realizados con células MEG-01 y con células NG115-401L, los movimientos de Ca^{2+} se registraron usando un microscopio invertido de fluorescencia (Nikon Diaphot T200, Melville, NY, EEUU) asociado a un sistema de adquisición y análisis de imágenes para videomicroscopía (Hamamatsu Photonics®, Hamamatsu, Japón). El experimento se llevó a cabo bajo una perfusión continua con HBS. Las células se excitaron alternativamente a 340 y 380 nm con una lámpara asociada a un monocromador (Polychrome IV, Photonics, Hamamatsu®, Japón) y la fluorescencia emitida se registró a 505 nm con una cámara digital asociada al microscopio (Hisca CCD C-6790, Hamamatsu, Japón). Los valores se registraron y procesaron usando el software Aquacosmos 2.5 (Photonics, Hamamatsu®, Japón).

Para tratar las células se utilizó un sistema mediante el cual el estímulo diluido en HBS a la concentración deseada era perfundido directamente a la cubeta, donde además un sistema de aspiración de vacío eliminaba las soluciones sobrantes. Las variaciones en la $[Ca^{2+}]_c$ se monitorizaron y se expresaron como ratio de las fluorescencias emitidas a 505 nm por el fura-2 tras ser excitado a 340 y 380 nm.

Los estudios de movilización de calcio en plaquetas de ratón se registraron usando un espectrofluorímetro RF-6301PC (Shimadzu Corporation®, Kyoto, Japón) a partir de alícuotas de 600 μ l de suspensión celular depositadas en cubetas de cuarzo. El sistema está provisto de un sistema de microagitación y termostatación que permite mantener las células en suspensión y atemperadas a 37 °C.

En este caso, todos los agentes utilizados durante los experimentos fueron añadidos directamente en la cubeta del espectrofluorímetro. Del mismo modo que en las medidas

realizadas con el microscopio invertido, las variaciones en la $[Ca^{2+}]_c$ se monitorizaron y expresaron como ratio de las fluorescencias emitidas a 505 nm por la sonda tras ser excitada a 340 y 380 nm. La traducción de ratios de fluorescencia a $[Ca^{2+}]_c$ y el posterior calibrado se realizaron mediante el método desarrollado por Grynkiewicz (Grynkiewicz et al. 1985), aplicando para ello la fórmula siguiente:

$$[Ca^{2+}]_c = K_d * \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} * \frac{S_f}{S_b}$$

K_d = Constante de disociación del fura-2 y el Ca^{2+} (214 nM a 37 °C).

R = Ratio de la muestra (340/380).

R_{min} = Ratio mínimo cuando la concentración de Ca^{2+} es igual a 0.

R_{max} = Ratio máximo en condiciones de saturación, por calcio, del indicador.

S_f = S free (emisión del fura-2 al ser excitado a 380 nm).

S_b = S bound (emisión del fura-2 unido a Ca^{2+} al ser excitado a 380 nm).

Para obtener estos parámetros, cada experimento realizado en el espectrofluorímetro se calibró al final. Esta calibración consiste en saturar de Ca^{2+} el fura-2 de la muestra añadiendo a la cubeta una concentración final de 10 mM. Por su parte, el S_b y el R_{max} se obtuvieron al lisis de las células añadiendo una solución de Tritón X-100 (0,05%), de forma que todo el fura-2 presente en el interior celular se pone en contacto con el Ca^{2+} . El S_f y el R_{min} se obtuvieron añadiendo una solución con una concentración elevada de EGTA (500 mM) y de Trizma Base (3M) consiguiendo con ello que el Ca^{2+} se separara del fluoróforo.

5.4. DETERMINACIÓN DE LA LIBERACIÓN Y ENTRADA DE Ca^{2+}

La liberación de Ca^{2+} inducida por TG, ionomicina, OAG, trombina o hyperforina 9 (Hyp9) se estimó calculando el área bajo la curva del incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ durante los 150 segundos posteriores a la adición del compuesto, en un medio libre de Ca^{2+} , corregidas con la resta de la concentración basal de Ca^{2+} previa a la adición del estímulo en ausencia de Ca^{2+} extracelular, usando el quelante de Ca^{2+} EGTA. (Rosado et al. 2000a). Del mismo modo, la entrada de Ca^{2+} que se induce tras la adición de $CaCl_2$ a la suspensión celular se determinó calculando el área bajo la curva del incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ durante los 150 segundos posteriores a la adición de $CaCl_2$, siendo corregida con la resta de la concentración de Ca^{2+} previa a su adición.

6. Determinación de la entrada de manganeso

Esta técnica se utilizó como estrategia metodológica para monitorizar la entrada de cationes divalentes en plaquetas de ratón, puesto que la entrada de Mn^{2+} se produce por mecanismos similares a la de Ca^{2+} , y produce como consecuencia el apagamiento de la fluorescencia del fura-2 al combinarse con él.

La carga con la sonda fura-2/AM y preparación de las suspensiones celulares se realizó del mismo modo que para la medida de la concentración de Ca^{2+} , pero en este caso el flujo de Mn^{2+} fue medido cuando la muestra era excitada a una longitud isoemisiva de 360 nm. La entrada de Mn^{2+} se estimó como la pendiente de extinción de la fluorescencia al ser representada en una escala arbitraria.

En este estudio, llevado a cabo en plaquetas de ratón, para comparar la ratio de disminución de la fluorescencia del fura-2, las curvas se ajustaron a la ecuación $y = Ax + B$, donde A representa la pendiente y B es la fluorescencia del fura-2 al inicio del experimento.

7. Técnicas para el aislamiento y cuantificación de proteínas

En los ensayos llevados a cabo con proteínas es imprescindible una adecuada preparación de la muestra. El método de extracción proteica dependerá del tipo de muestra de partida, de la localización subcelular de la proteína y de las condiciones que requiera el anticuerpo para reconocer el epítipo proteico. En los estudios realizados en la presente tesis doctoral la extracción proteica se ha realizado en la mayoría de los casos mediante el uso de soluciones tampón que contienen detergentes. La estructura química de estos detergentes permite romper las membranas celulares y solubilizar las proteínas, haciendo innecesaria la aplicación de métodos mecánicos.

7.1. INMUNOPRECIPITACIÓN

La inmunoprecipitación es una técnica que permite aislar una proteína determinada de un lisado celular, utilizando para ello un anticuerpo que se une de forma específica a la proteína diana.

Las células resuspendidas en el tampón salino correspondiente (HBS o Tyrode con apirasa en el caso de las plaquetas), se repartieron en viales Eppendorf, con un volumen de 500 μ L y una concentración de $1 \cdot 10^7$ células/mL en el caso de las células MEG0, $2 \cdot 10^6$ células/mL en el

caso de las células NG115-401L y 2×10^9 células/mL en el caso de las plaquetas de ratón. Seguidamente, las células fueron tratadas a 37 °C con los agonistas correspondientes, y una vez finalizada la estimulación, se lisaron con un tampón de lisis. En el caso de las células MEG01 y NG115-401L se utilizó el tampón de lisis NP-40 (TABLA 7), y en el caso de las plaquetas de ratón se utilizó el tampón RIPA, en ambos casos a una concentración 2x para obtener en la mezcla final con la suspensión celular una concentración 1x. Además, dichas soluciones fueron suplementadas con inhibidores de proteasas y ortovanadato sódico (2 mM). A continuación se mantuvieron en hielo durante un período mínimo de diez minutos para evitar proteólisis, desfosforilación y desnaturalización proteica (procesos que comienzan después del lisado, y que pueden ser minimizados manteniendo las muestras a 4 °C).

Reactivo	Concentración (mM)	(g/L)
Tris-HCl	40	6,3
NaCl	274	16,02
EDTA	4	1,16
Nonidet P-40	1%	200 mL
Glicerol	20%	20 mL

Tabla 7. Buffer de lisis NP-40 (2x) (pH = 8)

Reactivo	Concentración (mM)	(g/L)
Trizma Base	20	2,43
NaCl	316	18,5
EGTA	2	0,76
SDS	0,2%	2
Deoxicolato sódico	2%	20
Tritón X-100	2%	20 mL

Tabla 8. Buffer de lisis RIPA (2x) (pH = 7,2)

Una vez finalizada la incubación en hielo, las muestras se centrifugaron a 16000 $\times g$ durante al menos 15 minutos, para eliminar restos celulares que quedarán sedimentados. El sobrenadante obtenido se incubó durante toda la noche en agitación constante, con 1 ó 2 μg del anticuerpo específico frente a la proteína diana, y unas pequeñas bolas de agarosa recubiertas por proteína A (proteína de la superficie de *Staphylococcus aureus* con gran afinidad por el fragmento cristizable (Fc) o cadena pesada de las inmunoglobulinas). Terminada la incubación, las bolas son sedimentadas por centrifugación, y tras varios lavados con un tampón salino fosfato (PBS), los complejos antígeno-anticuerpo se resuspenden en Laemmli Buffer (LB), enriquecido con ditiotreitól (DTT) al 5%, para su análisis posterior por Western Blot.

7.2. BIOTINILACIÓN DE PROTEÍNAS DE LA SUPERFICIE CELULAR

Los ensayos de biotilación de proteínas de membrana permiten detectar y cuantificar una determinada proteína en la membrana plasmática, basándose en el marcaje en superficie de proteínas de membrana en células no permeabilizadas con sulfo-NHS-LC-biotina y en la alta afinidad y especificidad de la unión biotina-avidina, la interacción biológica más fuerte que se conoce entre un ligando y una proteína ($K_d = 1,3 \cdot 10^{-15}$ M a pH = 5) (Green 1963).

En el caso de las células NG115-401L, una vez aisladas con el procedimiento habitual, fueron alicuotadas y estimuladas con los diferentes tratamientos. Se finalizó la reacción al tiempo requerido con un tampón rico en fosfato a 4 °C. Las células se recogieron por centrifugación a 900 $\times g$ durante 13 minutos a 4 °C. Seguidamente se marcaron las proteínas de la superficie celular resuspendiéndolas en EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin (2,5 mg/3 mL de SB a 4 °C) e incubándolas durante una hora a 4 °C con agitación constante. La reacción de biotilación se finalizó con 100 μ L de Tris 1M y el agente biotinizante sobrante se retiró lavando las células dos veces con tampón de Sorensen (SB) a 4 °C. Las células marcadas se resuspendieron en PBS y se lisaron con NP40. Las proteínas marcadas se recogieron rotando el lisado durante toda la noche con bolas recubiertas de estreptavidina y tras aislarlas mediante centrifugación, se resuspendieron en LB para analizarlas posteriormente mediante Western Blot..

Reactivo	Concentración (mM)	(g/L)
Na ₂ HPO ₄	16	2,84
NaH ₂ PO ₄	114	17,78

Tabla 9. Tampón rico en fosfato (pH = 8.0)

Sin embargo, las plaquetas de ratón fueron biotiladas utilizando un protocolo que conseguía una mayor eficiencia en el aislamiento de las proteínas de membrana. En este caso, tras aislar las plaquetas con el procedimiento habitual, se lavaron con PBS y seguidamente se resuspendieron en 1 mL de tampón de biotilación suplementado con 100 μ g/mL de sulfo-NHS-LC-biotina, donde fueron incubadas a temperatura ambiente durante 30 minutos en agitación. Una vez finalizado el marcaje, la reacción fue finalizada con 100 μ L de NH₄Cl y 100 μ L de PBS suplementado con EDTA 50 μ M, y se lavaron de nuevo las células con PBS/EDTA. Las plaquetas biotiladas se lisaron con RIPA, y los lisados obtenidos fueron incubados durante toda la noche con las bolas recubiertas de estreptavidina. Finalmente se lavaron y se resuspendieron en LB para ser analizadas mediante Western Blot.

Reactivo	Concentración (mM)	(g/L)
NaHCO ₃	50 mM	4,2
NaCl	0.9%	9
H ₂ O miliQ		1 L

Tabla 10. Tampón de biotilación.

7.3. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR Y AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

El fraccionamiento subcelular es un conjunto de métodos que tienen como objeto obtener fracciones puras o enriquecidas en un determinado componente celular, ya sea éste un orgánulo (RE, mitocondrias, núcleos...), una fracción de membrana (membrana total, plasmática...), complejos multiproteicos (citoesqueleto de actina, microtúbulos, poros nucleares...), etc. Existen diversos métodos descritos para el fraccionamiento subcelular principalmente basados en la ruptura mecánica de la célula. Sin embargo, debido al pequeño tamaño de las plaquetas de ratón, en este estudio hemos utilizado un kit comercial de Sigma-Aldrich® que combina los métodos mecánicos con el uso de diferentes soluciones químicas de osmolaridad variable.

Siguiendo el protocolo establecido por el fabricante, para la lisis celular se sometió a las células a la acción de una solución hipotónica que provoca un aumento en la turgencia y tamaño celular, lo cual facilita la ruptura posterior con un homogeneizador Dounce, cuyo fundamento está basado en un tubo de vidrio asociado a un pistón ajustado que rompe las células por acción de corte. Este método es ampliamente utilizado en protocolos de enriquecimiento de proteínas mitocondriales, reticulares o nucleares. Una vez obtenida la suspensión proteica, ésta es sometida a sucesivas centrifugaciones tras las cuales se obtiene en primer lugar una fracción postnuclear (en la que ya se han eliminado los núcleos y restos celulares), posteriormente una fracción postmitocondrial (en la que se eliminan las mitocondrias), y se obtiene como resultado un pellet que constituye la fracción microsomal, donde se encuentran las proteínas de interés.

El pellet obtenido resuspendido en una solución isotónica proporcionada en el kit, es sometido a un proceso de purificación y separación mediante ultracentrifugación del RE liso, rugoso o ambos, de los microsomas. Para ello se utiliza un gradiente de densidad generado por uno de los componentes del kit (Optiprep) que contiene una alta concentración de iodixanol, un medio yodado de baja osmolaridad que aporta una alta densidad a la muestra, permitiendo generar un gradiente de densidades. La fracción microsomal es diluida con Optiprep 60% (p/v)

hasta obtener una suspensión al 20% (p/v), y es depositada en el tubo de ultracentrifugación sobre una capa de Optiprep al 30 %, y bajo otra de Optiprep al 15%. Tras una ultracentrifugación a 150000 $\times g$ durante 3 horas a una temperatura de 4 °C y tras retirar cuidadosamente el tubo del rotor, se toma el sobrenadante en diferentes fracciones de volumen similar. Las fracciones enriquecidas en RE corresponden a aquellas que han quedado en la zona más baja del tubo de ultracentrifugación, es decir, aquella que se corresponde con la parte de la muestra con mayor densidad.

7.4. CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

El contenido en proteína total se determina empleando el método de Bradford (Bradford 1976). Consiste en una técnica colorimétrica basada en la existencia de dos formas diferentes del Coomasie Brilliant Blue G-250 (una roja y otra azul), que en contacto con las proteínas pasa de color rojo a azul, pudiendo ser detectado este cambio mediante el empleo de un espectrofotómetro.

El reactivo de Bradford comercial (Bio-Rad, Madrid, España) está compuesto por una solución de ácido ortofosfórico diluido en etanol que debe ser diluido en agua en proporción 1:5.

En una microplaca se mezcló un volumen de 10 μL de la muestra (previamente diluida 1:10 en agua bidestilada) con 190 μL del reactivo de Bradford. Una vez agitadas para conseguir una mezcla homogénea, se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, transcurridos los cuales se realizó la lectura de la absorbancia de la muestra en un lector de microplacas Infinite M200 (Tecan, Männedorf, Suiza). Los datos de absorbancia obtenidos, se extrapolaron a una recta patrón trazada a partir de una curva estándar realizada con concentraciones conocidas de BSA en agua bidestilada. Los resultados se expresaron en mg/mL.

7.5. WESTERN BLOT

El Western blot es una técnica analítica usada para la detección de proteínas específicas en una muestra determinada. Este método, descrito por primera vez por Towbin y colaboradores (Towbin et al. 1979), permite la detección de una sola proteína dentro de una muestra biológica. La especificidad de la técnica se logra mediante la utilización de un anticuerpo que reconoce y se une a un epítipo único de la proteína de interés. Fue desarrollada utilizando la base tecnológica del Southern para la detección de ADN. El principio

del Western blot se fundamenta en el hecho de que una proteína sometida a un campo eléctrico se moverá en función de la carga eléctrica neta de la misma (Z), la fuerza del campo eléctrico al que se ve sometida (E) y la resistencia de fricción (F , que depende del tamaño y forma de la proteína). En base a esto, la velocidad de migración de las proteínas está relacionada con estas variables según la siguiente fórmula:

$$V = \frac{(E \times Z)}{F}$$

El punto isoeléctrico de una proteína es aquel en el que la carga neta de la misma es cero. Si esto sucede, el campo eléctrico aplicado no la afectaría y en consecuencia la proteína no se mueve. Por ello, es importante tener en cuenta el pH del tampón donde se encuentran las proteínas. Para evitar este efecto, se utilizó el método descrito por Laemmli (Laemmli 1970), en el que las muestras se desnaturalizan por calor en presencia de agentes desnaturalizantes, como el β -mercaptoetanol o el DTT, que destruyen los puentes disulfuro; o dodecilsulfato sódico (SDS), que desnaturaliza las proteínas, haciéndoles perder su conformación terciaria y pasando a la conformación primaria, lineal, y recubre a la proteína con cargas negativas, permitiendo que las proteínas se muevan sólo en función de su tamaño, es decir, la tasa de migración viene determinada por su peso molecular. Además, el LB por su carácter reductor, también facilita la separación de los anticuerpos de las bolas de agarosa después de realizar una inmunoprecipitación.

No obstante, para asegurar la completa desnaturalización de las proteínas, las muestras fueron calentadas a 70 °C durante 10 minutos en un termobloque. Finalmente, se centrifugaron durante un minuto a 10000 $\times g$.

7.5.1. ELECTROFORESIS

Una vez obtenidas las muestras, se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida conteniendo SDS (SDS-PAGE) en condiciones desnaturalizantes. Bajo estas condiciones desnaturalizantes y de reducción, las proteínas cargadas negativamente, al ser sometidas a un campo eléctrico, migrarán al electrodo positivo, haciéndolo de forma más rápida aquellas con peso molecular más pequeño.

Los geles fueron elaborados en el propio laboratorio utilizando diferentes concentraciones de acrilamida en función del peso molecular de la proteína que se deseaba estudiar. En base al porcentaje de acrilamida utilizado se obtendrá un tamaño de poro u otro,

obteniéndose poros más pequeños, a mayores porcentajes del polímero. En todos los casos, se utilizaron dos tipos de geles que pertenecen al sistema de Tampón discontinuo:

- Gel de carga: asegura la migración de todas las proteínas en el frente de migración, ya que favorece el empaquetamiento de todas las proteínas que han sido cargadas en el pocillo. Su concentración de acrilamida y bisacrilamida es pequeña (4%) y su pH es ligeramente más ácido que el del gel separador.

- Gel separador: este gel constituye el soporte donde las proteínas van a migrar y a separarse. Está formado por una mezcla de acrilamida y bisacrilamida, cuya concentración determinará el tamaño del poro, de modo que a mayor concentración de polímero, se obtendrá un tamaño de poro más pequeño, favoreciendo una mayor separación de las proteínas con bajo peso molecular. Por el contrario, los geles preparados con una menor concentración de polímero producirán poros de mayor tamaño, que al favorecer el paso de proteínas mayores, permitirán una separación más amplia de las mismas. En este estudio se utilizaron diferentes tipos de geles, cuyos porcentajes variaron entre el 8 y el 12 %.

REACTIVOS	10 mL (8%)	10 mL (10%)	10 mL (12%)	10 mL (4%)
Acrilamida/bisacrilamida (39:1) (mL)	2,7	3,04	4,2	1,32
Tris 1,5 M (pH = 8,8) (mL)	2,5	2,5	2,5	
Tris 0,5 M (pH = 6,8) (mL)				2,5
SDS (10%) (mL)	0,1	0,1	0,1	0,1
Persulfato de amonio (AMPS) (mg)	5	5	5	10
TEMED (μL)	10	10	10	10
H ₂ O miliQ (mL)	4,7	4	3,2	6,07

Tabla 11. Soluciones de preparación de geles de acrilamida.

Una vez cargadas las muestras de proteínas en los pocillos del gel, fueron sometidas a electroforesis mediante la aplicación de un campo eléctrico de 30 mA durante dos horas para su separación. Durante este proceso, el gel se encontraba embebido en un tampón de electroforesis que permite que la corriente eléctrica recorra de forma homogénea todo el gel.

Reactivos	Concentración (mM)	(g/L)
Trizma Base	124 mM	15
Glicina	1,26 M	77
SDS	0,5%	5

Tabla 12. Tampón de electroforesis.

7.5.2. ELECTROTRANSFERENCIA

Con el fin de que las proteínas fueran accesibles a la detección por anticuerpos, estas se transfirieron desde el gel a una membrana adsorbente de nitrocelulosa, la cual supone un soporte sólido más estable que una proteína y las inmoviliza, permitiendo así que la hibridación de un anticuerpo las pueda detectar. Para ello se utilizó un sistema de transferencia semiseca, basado en la aplicación de un campo eléctrico ($0,8 \text{ mA/cm}^2$), que favorece la movilidad de las proteínas hacia la membrana de nitrocelulosa, la cual tiene un tamaño de poro de $0,2 \mu\text{m}$ (GE Healthcare). El paso de la corriente se produjo a través del tampón de transferencia.

Reactivos	Concentración (mM)	(g/L)
Trizma Base	25 mM	3,03
Glicina	150 mM	8,5
Metanol	20%	200 mL
pH=8.3		

Tabla 13. Tampón de transferencia (pH = 8,3).

7.5.3. BLOQUEO

Seguido a la transferencia es necesario neutralizar los sitios de unión no específicos que han quedado libres en la membrana. En este estudio se realizó mediante la incubación de la misma con una solución saturada con BSA (10%) o leche desnatada en polvo (5%) durante una hora a temperatura ambiente y con agitación moderada.

Reactivos	Concentración	(g/L)
TBST		1 L
BSA	10 %	100
Acida sódica	0,02 %	0,2

Tabla 14. Tampón de bloqueo.

7.5.4. INCUBACIÓN CON ANTICUERPOS

Después del bloqueo, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios específicos, que en general están diseñados para reconocer una secuencia aminoacídica pequeña o epítipo de la proteína, que queda accesible tras la electroforesis desnaturante y reductora. En todos los casos, los anticuerpos fueron diluidos en tampón de bloqueo a la concentración óptima para cada uno de ellos. Los periodos de incubación variaron en función de la especificidad del anticuerpo utilizado, oscilando desde 1 hora a temperatura ambiente hasta toda la noche a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ con agitación suave constante.

Una vez terminada la incubación con el anticuerpo primario, y tras ser retirado, las membranas se lavaron para eliminar los restos de anticuerpo no unido con una solución salina de trizma con detergente (TBST), 6 veces durante 5 minutos cada vez.

Reactivos	Concentración (mM)	(g/L)
Trizma Base	20	2,42
NaCl	137	8
Tween 20	0,1%	1 mL
pH = 7,6		

Tabla 15. Tampón de lavado (pH = 7,6).

Finalizado el proceso de lavado, las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario, normalmente una inmunoglobulina G (IgG) específica del tipo de animal en el que se ha sintetizado el anticuerpo primario; es decir, si el anticuerpo primario utilizado se ha obtenido en conejo, la IgG que se debe utilizar debe ser específica de conejo, de modo que así reconocerá la fracción constante del anticuerpo primario y se unirá a ella. El tiempo de incubación de los anticuerpos secundarios fue de una hora a temperatura ambiente, a concentraciones variables entre 1:5000 y 1:20000 dependiendo de las condiciones experimentales.

Tras la incubación con el anticuerpo secundario, las membranas se lavaron para retirar el exceso de anticuerpo no unido, siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

7.5.5. REVELADO

La fase final del proceso, implica el revelado de las membranas. Este método está basado en la detección de la quimioluminiscencia producida por el anticuerpo secundario, que está conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Al hacer reaccionar el enzima con el sustrato correspondiente sustrato se produce luz, y en este estudio, esta fue detectada en ocasiones mediante la exposición de la membrana a una película de rayos X y en otras utilizando un escáner digital Li-Cor C-digit[®].

Las imágenes obtenidas tras el revelado fueron analizadas con el software informático Image J (NIH, Bethesda, EEUU), un programa que permite medir la intensidad de las bandas mediante densitometría.

8. Determinación de la agregación plaquetaria.

La funcionalidad plaquetaria fue analizada mediante estudios de agregometría por transmisión de luz, una técnica desarrollada en 1962 por Born (Born 1962).

Para la realización de estos experimentos, el aislamiento de las plaquetas se realizó por el procedimiento habitual, con la excepción de que en este caso no se añadió ácido acetilsalicílico, (ya que ésta sustancia puede interferir notablemente en la función plaquetaria) y fueron ajustadas a una concentración de $1 \cdot 10^8$ células/mL. Además, después de la resuspensión de las plaquetas, éstas fueron mantenidas en reposo durante un período de 15 minutos, debido a que las plaquetas después de la centrifugación pueden quedar hiperreactivas debido a una posible liberación de ADP durante el proceso de centrifugado (Cattaneo 2009). En un tubo de vidrio que contiene la suspensión celular en microagitación a 37 °C, se añadieron los agonistas bajo las condiciones experimentales establecidas. La agregación es medida con el principio turbidimétrico de Born que se basa en la diferencia en la transmisión de la luz en la suspensión celular comparándolo con una solución control que en el caso de este estudio, es el medio en el que se encontraban resuspendidas las células, el tampón Tyrode. Para ello se utilizó un agregómetro Chronolog (Havertown, PA, EEUU) asociado a un procesador computerizado que elabora un registro gráfico a partir de los datos de la transmitancia óptica detectada. El registro gráfico resulta de representar el grado de transmisión de la luz a través de la suspensión celular (en el eje de ordenadas) en función del tiempo (en el eje de abcisas). En un experimento estándar, después de la adición del tratamiento, se observó una onda negativa, equivalente a una disminución en la transmitancia debido al cambio de forma de las plaquetas activadas, y seguidamente un trazo positivo que dependiendo del agonista y condiciones empleadas puede variar en la pendiente y en la forma.

9. Microscopía confocal (o Técnica de inmunofluorescencia)

La técnica de inmunofluorescencia consiste en la detección de ciertas moléculas fluorescentes en la célula, lo cual permitirá conocer su distribución en ella. Normalmente se realiza mediante el uso de anticuerpos que se unen de forma específica a su antígeno. Sin embargo, en este estudio se utilizó una técnica alternativa, basada en aprovechar la síntesis de proteínas recombinantes que contienen dominios fluorescentes, en este caso la proteína verde fluorescente (GFP).

En este estudio se utilizó para determinar la localización subcelular de la proteína STIM1, cuya expresión fue inducida previamente mediante transfección con el plásmido pHluorin-STIM1. Dicho plásmido indujo la expresión de la proteína STIM1 asociada a una proteína GFP sensible a cambios en el pH, que fue utilizada como fluoróforo para ver la distribución de la proteína estudiada. Además, las células fueron marcadas con la sonda DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol), un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina, permitiendo por tanto teñir específicamente los núcleos celulares. A pesar de ser útil para microscopía de fluorescencia porque atraviesa las membranas celulares, se utilizó a concentraciones muy elevadas puesto que la penetración, y consecuente fluorescencia, en células vivas, es menor que en células fijadas.

Para ello, las células cultivadas y adheridas previamente a los cubreobjetos, fueron incubadas durante 1 minuto con DAPI a temperatura ambiente usando una concentración de 5 μM y observadas finalmente con un microscopio confocal (MRC 1024, Bio-Rad, Madrid, España)

10. Tratamiento estadístico

Los datos obtenidos en estos estudios se expresan como media \pm el error estándar de la media (ESM). Las curvas representativas de la movilidad de Ca^{2+} intracelular se presentan como cambios en la concentración de Ca^{2+} libre intracelular expresados en nM, o como ratio de fluorescencia (340/380), en función de la técnica utilizada.

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos se utiliza el análisis de la varianza o ANOVA de una vía, combinado con el test the Tukey, cuando los grupos experimentales a comparar son más de dos, o el test *t*-Student para comparar sólo dos grupos.

Los resultados obtenidos se consideraron significativos cuando el nivel de significancia (*p*) era menor de 0,05 ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis, para lograr los objetivos anteriormente planteados han sido publicados en las siguientes revistas internacionales:

1. **TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL ANKYRIN-1 (TRPA1) MODULATES STORE-OPERATED Ca²⁺ ENTRY BY REGULATION OF STIM1-ORAI1 ASSOCIATION.** Albarrán L, Lopez JJ, Dionisio N, Smani T, Salido GM, Rosado JA. *Biochim Biophys Acta-Mol Cell Res.* 2013;1833(12):3025-34.
2. **TRPC6 PARTICIPATES IN THE REGULATION OF CYTOSOLIC BASAL CALCIUM CONCENTRATION IN MURINE RESTING PLATELETS.** Albarran L, Berna-Erro A, Dionisio N, Redondo PC, Lopez E, Lopez JJ, Salido GM, Brull Sabate JM, Rosado JA. *Biochim Biophys Acta-Mol Cell Res.* 2014;1843(4):789-96.
3. **THE CANONICAL TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL 6 (TRPC6) CHANNEL IS SENSITIVE TO EXTRACELLULAR PH IN MOUSE PLATELETS.** Berna-Erro A, Albarran L, Dionisio N, Redondo PC, Alonso N, Gomez LJ, Salido GM, Rosado JA. *Blood Cells Mol Dis.* 2014;52(2-3):108-15.
4. **STIM1 REGULATES TRPC6 HETEROMULTIMERIZATION AND SUBCELLULAR LOCATION.** Albarrán L, Dionisio N, Lopez E, Salido GM, Redondo PC, Rosado JA. *Biochem J.* 2014;463(3):373-81.



Transient receptor potential ankyrin-1 (TRPA1) modulates store-operated Ca^{2+} entry by regulation of STIM1-Orai1 association



Letizia Albarrán^{a,1}, Jose J. Lopez^{a,1}, Natalia Dionisio^a, Tarik Smani^b, Gines M. Salido^a, Juan A. Rosado^{a,*}

^a Department of Physiology (Cell Physiology Research Group), University of Extremadura, 10003-Cáceres, Spain

^b Institute of Biomedicine of Seville, Seville, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 June 2013

Received in revised form 13 August 2013

Accepted 14 August 2013

Available online 28 August 2013

Keywords:

TRPA1

STIM1

Orai1

Ca^{2+} entry

MEG01 cell

TRP channel

ABSTRACT

TRPA1 is a non-selective Ca^{2+} permeable channel located in the plasma membrane that functions as a cellular sensor detecting mechanical, chemical and thermal stimuli, being a component of neuronal, epithelial, blood and smooth muscle tissues. TRPA1 has been shown to influence a broad range of physiological processes that involve Ca^{2+} -dependent signaling pathways. Here we report that TRPA1 is expressed in MEG01 but not in platelets at the protein level. MEG01 cells maturation induced by PMA results in attenuation of TRPA1 protein expression and enhances thapsigargin-evoked Ca^{2+} entry without altering the release of Ca^{2+} from intracellular stores. Inhibition of TRPA1 by HC-030031 results in enhancement of both thrombin- and thapsigargin-stimulated Ca^{2+} entry. Co-immunoprecipitation experiments revealed that TRPA1 associates with STIM1, as well as Orai1, TRPC1 and TRPC6. Downregulation of TRPA1 expression by MEG01 maturation, as well as pharmacological inhibition of TRPA1 by HC-030031, results in enhancement of the association between STIM1 and Orai1. Altogether, these findings provide evidence for a new and interesting function of TRPA1 in cellular function associated to the regulation of agonist-induced Ca^{2+} entry by the modulation of STIM1/Orai1 interaction.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Transient receptor potential (TRP) ankyrin 1 (TRPA1) is a non-selective Ca^{2+} permeable channel that belongs to the TRP superfamily [1]. Like other TRP channels, the architecture of TRPA1 includes six transmembrane domains (TMD) with the presumed pore loop between TMD5 and TMD6 [2]. TRPA1 is structurally differentiated by a large number of ankyrin repeats, which vary among species (up to 18 repeats in humans), located in the intracellular N-terminal region of the protein [3]. Ankyrin repeats are proposed as a key integration site for multiple physiological signals that activates the channel [4]. Furthermore, the C-terminal region of the channel comprises basic residues that confer both chemical and voltage sensitivity to TRPA1 channel [5].

Activation of TRPA1 by physical stimuli (i.e., cold temperature, ultraviolet light) or endogenous (i.e., Ca^{2+} , reactive oxygen species, nitric oxide) and exogenous (i.e., allyl isothiocyanates) ligands results in a massive influx of Ca^{2+} into the stimulated cells [6] which activates a wide range of physiological events in different cell types [7–12]. Ca^{2+} is considered the most important physiological activator of TRPA1 [6]. A recent model proposes that ankyrin repeat structure includes a

Ca^{2+} -binding EF-hand domain which changes the overall flexibility of the channel structure and modulates the open probability by acting as a soft spring [13]. Another novel study proposes that the acidic cytoplasmic C-terminal tail is also involved in the potentiation and inactivation of TRPA1 channel [6].

Store-operated Ca^{2+} entry (SOCE), the most important mechanism for Ca^{2+} influx in non-excitable mammalian cells, is controlled by the filling state of the intracellular Ca^{2+} stores [14]. Different molecules have been reported to be involved in SOCE. Stromal interaction molecule 1 (STIM1) is a Ca^{2+} -binding protein identified both in the plasma membrane and in the membrane of intracellular Ca^{2+} stores, the endoplasmic reticulum (ER) and acidic stores [15–17]. Depletion of these intracellular Ca^{2+} stores is detected by STIM1, which re-localizes at sites of close proximity to the plasma membrane and the ER membrane allowing its association with two types of Ca^{2+} influx SOC channels: the Orai family and TRP canonical (TRPC) family channels [18,19].

SOCE has been reported to be modulated by different cell parameters such as temperature [20] and redox status [21] and by intracellular mechanisms like STIM1 phosphorylation [22] and adaptor proteins like Homer family proteins [23]. Recent studies have demonstrated that proteins implicated in the regulation of the intracellular Ca^{2+} homeostasis like the two-pore Ca^{2+} channel 2 (TPC2) [24], the sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases (SERCA) pump family [25,26], and the TRPC3 [27,28] modulates SOCE in different type cells by the regulation of the association of STIM1 with Orai1.

* Corresponding author at: Department of Physiology, University of Extremadura, Av. Universidad s/n 10003-Cáceres, Spain. Tel: +34 927257100; fax: +34 927257110.

E-mail address: jarosado@unex.es (J.A. Rosado).

¹ These authors contributed equally to this work.

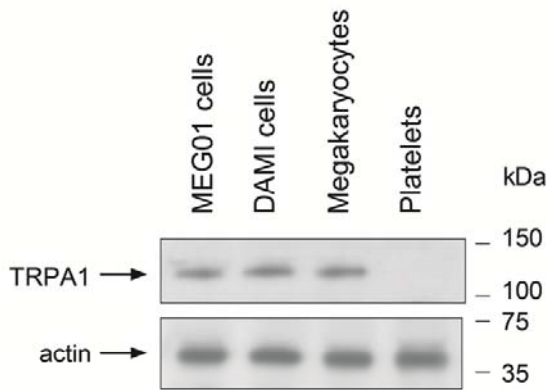


Fig. 1. TRPA1 expression in the human megakaryoblastic cell line MEG01 cells, DAMI cells, megakaryocytes and human platelets. MEG01, DAMI, megakaryocytes and platelet protein lysates were immunoblotted, as described in Materials and methods section, to detect the presence of TRPA1 channel. Membranes were probed with anti-actin antibody for protein loading control. The results are representative of 3 independent experiments.

In the present study we have investigated the possible role of TRPA1 channels in the regulation of SOCE in the megakaryoblastic lineage. Our results indicate that TRPA1 expression decreases during PMA-induced MEG-01 maturation and it is correlated with an increase of SOCE mediated by an enhanced interaction of STIM1 and Orai1, which suggests a functional role for TRPA1 in the modulation of SOCE in these cells.

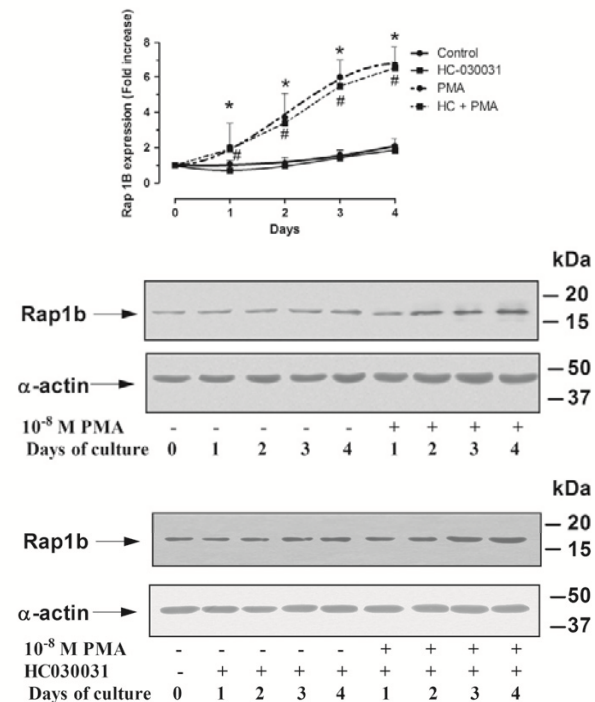


Fig. 2. Enhanced Rap1b expression during maturation of MEG-01 megakaryocytic cell lines induced by PMA treatment. MEG01 cells were cultured in the absence or presence of 10 nM PMA for up to 4 days and treated or not with 60 μM HC-030031. Protein lysates were immunoblotted to detect the presence of Rap1b. The bottom panels show representative images of Western blotting experiments. The mean value of the cells treated for day 0 was arbitrarily taken as 100%. The results are representative of 6 independent experiments. **p* < 0.05 compared with their control. #*p* < 0.05 compared with their control (cells treated with HC-030031).

2. Materials and methods

2.1. Materials

Fura-2 acetoxymethyl ester (fura-2/AM) and calcein were from Invitrogen (Madrid, Spain). Thrombin, thapsigargin (TG), apyrase (grade VII), dimethyl BAPTA/AM, aspirin, leupeptin, benzamide, phenyl methyl sulphonyl fluoride (PMSF), sodium dodecyl sulfate (SDS), rabbit anti-Orai1 antibody (C-terminal), 2-(1,3-dimethyl-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydro-7H-purin-7-yl)-N-(4-isopropylphenyl)acetamide (HC-030031), allyl isothiocyanate (AITC), nonidet P-40, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and bovine serum albumin (BSA) were from Sigma (Madrid, Spain). Mouse anti-STIM1 antibody was from BD Transduction Laboratories (Franklin Lakes, NJ, U.S.A.). Rabbit anti-hTRPC1 antibody, goat anti-hTRPC6 antibody and horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-goat IgG antibody were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, U.S.A.). Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG and goat anti-rabbit IgG antibodies were from Jackson Immunoresearch (Suffolk, U.K.). Hyperfilm ECL was from Amersham (Buckinghamshire, U.K.). Protein A-agarose was from Upstate Biotechnology Inc. (Madrid, Spain). Enhanced chemiluminescence detection reagents were from Pierce (Cheshire, U.K.). All other reagents were of analytical grade.

2.2. Platelet preparation

Platelets were prepared as previously described [29], as approved by Local Ethical Committees and in accordance with the Declaration of Helsinki. Briefly, blood was obtained from healthy drug-free volunteers and mixed with one-sixth volume of acid/citrate dextrose anticoagulant containing (in mM): 85 sodium citrate, 78 citric acid and 111 D-glucose. Platelet-rich plasma (PRP) was then prepared by centrifugation for 5 min at 700 ×g and aspirin (100 μM) and apyrase (40 μg/mL) were added. Cells were then collected by centrifugation at 350 ×g for 20 min and resuspended in HEPES-buffered saline (HBS), pH 7.45, containing (in mM): 145 NaCl, 10 HEPES, 10 D-glucose, 5 KCl, 1 MgSO₄ and supplemented with 0.1% (w/v) BSA and 40 μg/mL apyrase. For BAPTA loading, cells were incubated with 10 μM dimethyl BAPTA for 30 min and then resuspended in HBS.

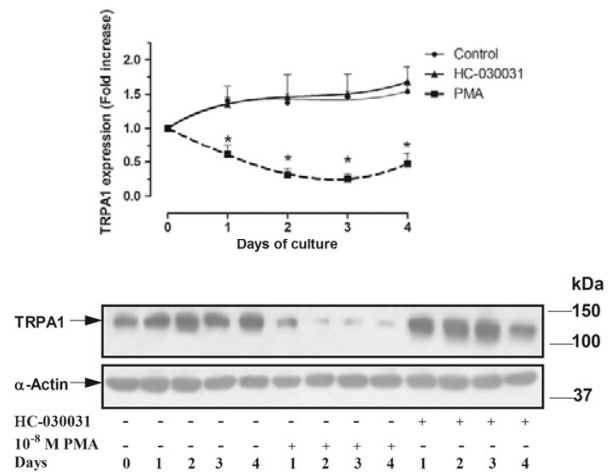


Fig. 3. Abolished TRPA1 expression during PMA-induced maturation of MEG-01 cells. MEG01 cells were cultured in the absence or presence of 10 nM PMA and/or 60 μM HC-030031 for 0 to 4 days. Protein lysates were immunoblotted to detect TRPA1 expression. The bottom panels show five images representative of five others. The mean value of the cells at day 0 was arbitrarily taken as 100%. **p* < 0.05 compared with control.

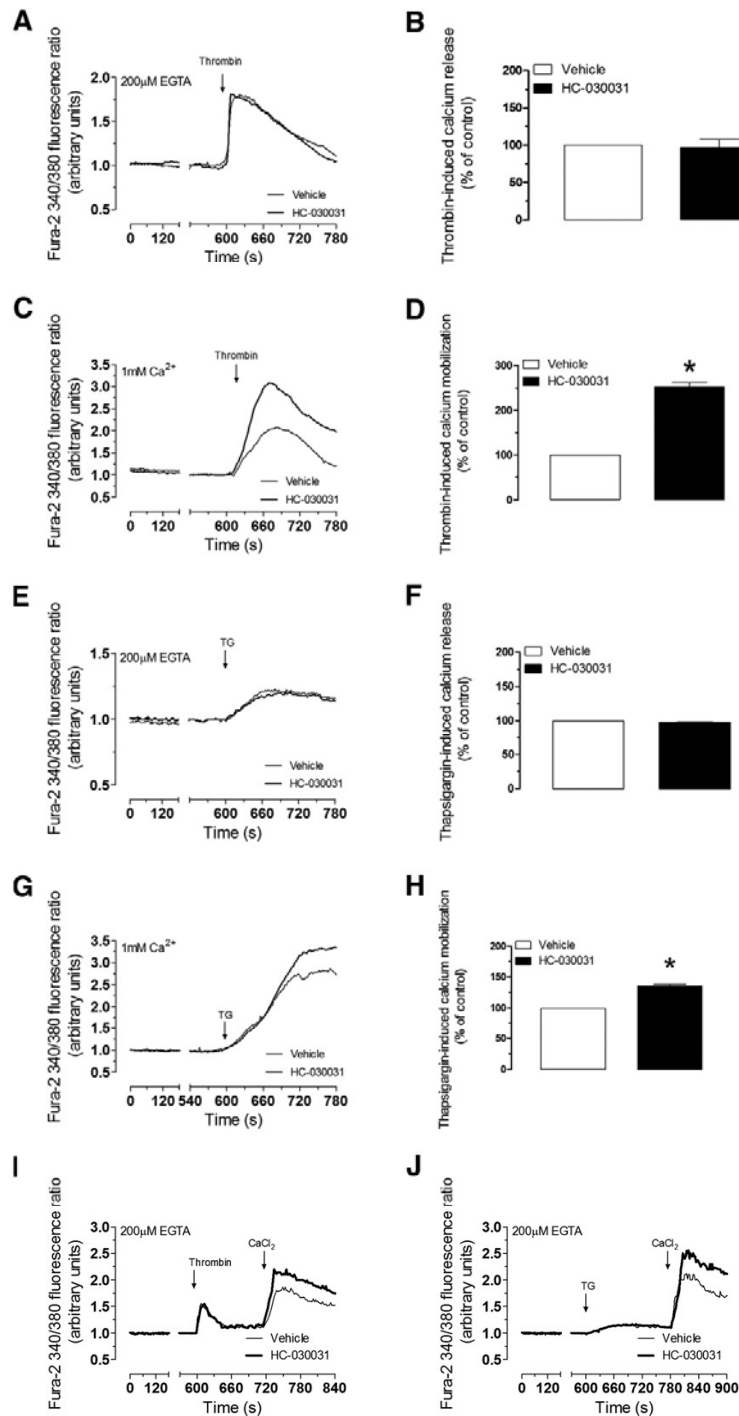


Fig. 4. Effect of HC-030031 on thrombin and thapsigargin-evoked Ca²⁺ entry in MEG01 cells and megakaryocytes. Fura 2-loaded MEG01 cells were incubated at 37 °C for 10 min in the presence of 60 μM HC-030031 or the vehicle (control) and then stimulated with 0.1 U/mL thrombin (A and C) or 1 μM thapsigargin (E and G) in a Ca²⁺ free medium (200 μM EGTA) (A and E) or in the presence of 1 mM extracellular Ca²⁺ (C and G). Traces shown are representative of 8 separate experiments. Histograms represent the amount of Ca²⁺ mobilization induced by agonists in the presence of HC-030031 as compared with their respective controls. Values are means ± S.E.M. *, *p* < 0.05 compared with control. I and J, fura 2-loaded megakaryocytes were incubated at 37 °C for 10 min in the presence of 60 μM HC-030031 or the vehicle (control) and then stimulated with 0.1 U/mL thrombin (I) or 1 μM thapsigargin (J) in a Ca²⁺ free medium (200 μM EGTA), subsequently, CaCl₂ (1 mM) was added to the extracellular medium to initiate Ca²⁺ entry. Traces shown are representative of 3 separate experiments.

2.3. Cell culture

The human megakaryoblastic cell lines MEG01 and DAMI were obtained from ATCC (Manassas, VA, USA) and cultured at 37 °C with a 5% CO₂ in RPMI media, supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM L-glutamine and 50 µg/mL gentamycin.

At the time of the experiments cells were suspended in basic salt solution (BSS) containing (in mM): 125 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 5 glucose, 25 HEPES, and pH 7.3. This is supplemented with 0.1% (w/v) BSA and apyrase (0.02 U/mL).

Megakaryocytic cell-line maturation was induced using PMA, a protein kinase C activator [30]. For this purpose, MEG01 cells were cultured in RPMI media containing 10⁻⁸ M PMA for up to 4 days of culture.

2.4. Isolation of human megakaryocytes

Human megakaryocytes were isolated as described previously [31]. Briefly, umbilical cord blood was collected under informed consent during normal full-term deliveries and used within 48 h. CD34⁺ stem cells were isolated using the miniMACS CD34 progenitor cell isolation system from Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany). Cells were cultured for either 7 or 14 days. Day 7 cells were labeled with anti-CD61 antibody (7F12) and day 14 cells were labeled with anti-CD42b antibody, for 20 min at 4 °C. Cells were then labeled for 20 min (4 °C) with goat-anti-mouse magnetic microbeads. The cell suspension was brought on a ferromagnetic column, type MS+ (Miltenyi Biotec), and after three washing steps with 700 µl buffer A (PBS containing 0.5% BSA and 2.5 mM EDTA) each, the retained cells were eluted with buffer A.

2.5. Immunoprecipitation and Western blotting

The immunoprecipitation and Western blotting were performed as described previously [32]. Briefly, 500 µl aliquots of MEG01 suspension

(1 × 10⁷ cell/mL) were lysed with an equal volume of NP-40 buffer, pH 8, containing 274 mM NaCl, 40 mM Tris, 4 mM EGTA, 20% glycerol, 2% nonidet P-40, 2 mM Na₃VO₄, 2 mM PMSF, 100 µg/mL leupeptin and 10 mM benzamide.

Aliquots of MEG01 lysates (1 mL) were immunoprecipitated by incubation with 2 µg of either anti-STIM1, anti-Orai1, anti-hTRPC1 or anti-hTRPC6 and 25 µl of protein A-agarose overnight at 4 °C on a rocking platform. The immunoprecipitates were resolved by 8% SDS-PAGE and separated proteins were electrophoretically transferred onto nitrocellulose membranes for subsequent probing. Blots were incubated for 1 h at room temperature with 10% (w/v) BSA in tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 (TBST) to block residual protein binding sites. Immunodetection of STIM1, Orai1, hTRPC1 and hTRPC6 was achieved using the anti-STIM1 antibody or the anti-Orai1 antibody diluted 1:250 in TBST for 2 h and the anti-hTRPC1 or anti-hTRPC6 diluted 1:200 in TBST for 2 h respectively at room temperature. The primary antibody was removed and blots were washed six times for 5 min each with TBST. To detect the primary antibody, blots were incubated for 45 min with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody diluted 1:10000 in TBST and then exposed to enhanced chemiluminescence reagents for 4 min. Blots were then exposed to photographic films. The density of bands on the film was measured using scanning densitometry and analyzed using ImageJ software for gel analysis from NIH. Data were normalized to the amount of actin protein or the amount of protein recovered by the antibody used for the immunoprecipitation.

For each antibody-based immunoprecipitation we performed an antibody-free, protein A-agarose only control in order to ensure that the proteins immunoprecipitated are not pulled down by protein A-agarose itself. In addition, for each antibody used in Western blotting a primary antibody-free control was carried out to confirm that the detection is specific and not due to non-specific binding by the secondary antibody (data not shown).

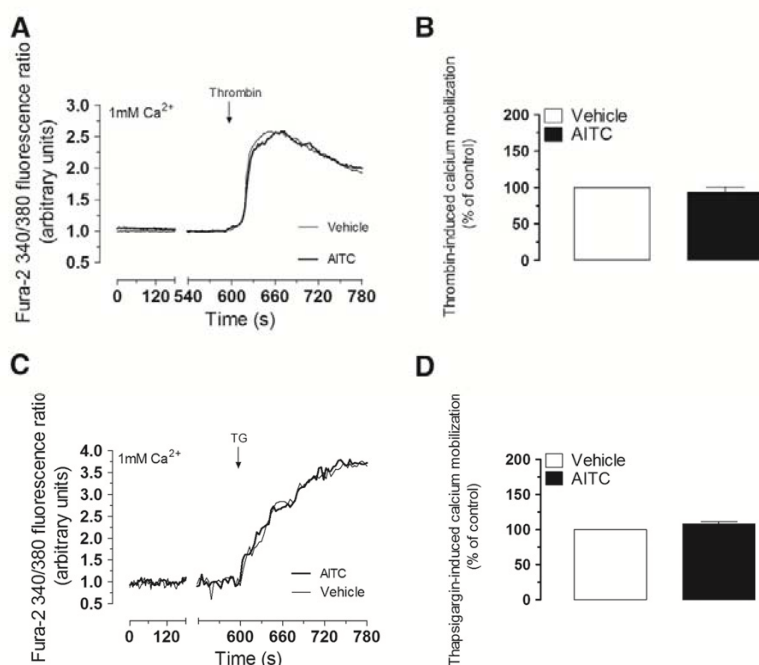


Fig. 5. Effect of allyl isothiocyanate (AITC) on thapsigargin and thrombin-evoked Ca²⁺ entry in MEG01 cells. Fura 2-loaded MEG01 cells were incubated at 37 °C for 10 min in the presence of 5 µM AITC or the vehicle (control) and then stimulated with 0.1 U/mL thrombin (A) or 1 µM thapsigargin (C) in the presence of 1 mM extracellular Ca²⁺. Traces shown are representative of 8 separate experiments. B and D, Histograms indicating the amount of Ca²⁺ mobilization induced by 0.1 U/mL thrombin (B) and 1 µM thapsigargin (D). Values are means ± S.E.M.

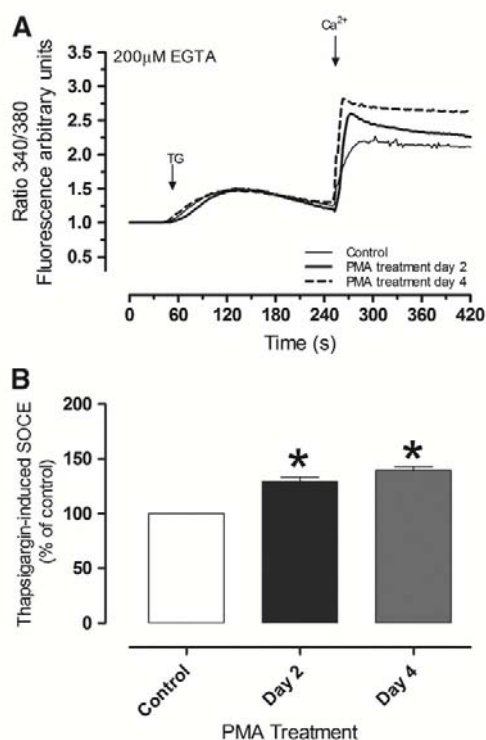


Fig. 6. Effect of PMA-induced maturation on thapsigargin-evoked Ca^{2+} entry in MEG01 cells. MEG01 cells were cultured in the absence (control) or presence of 10 nM PMA during 2 and 4 days. Afterwards, fura 2-loaded MEG01 cells were stimulated with 1 μM thapsigargin in a Ca^{2+} free medium, and 3 min later 600 μM Ca^{2+} was added to initiate Ca^{2+} entry. (A) The traces shown are representative of 5 separate experiments. B, Histograms indicating the amount of thapsigargin-induced Ca^{2+} entry after 2 and 4 days of treatment with PMA as compared to control. Values are means \pm S.E.M. *, $p < 0.05$ compared with control.

2.6. Measurement of cytosolic free- Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)

Cells were loaded with fura-2 by incubation with 2 μM fura 2/AM for 45 min at 37 °C. Coverslips with cultured cells were mounted on a perfusion chamber and placed on the stage of an epifluorescence inverted microscope (Nikon Diaphot T200, Melville, NY, USA) with image acquisition and analysis system for videomicroscopy (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan). Cells were continuously superfused with BSS. Cells were alternatively excited with light from a xenon lamp passed through a high-speed monochromator (Polychrome IV, Photonics, Hamamatsu, Japan) at 340/380 nm. Fluorescence emission at 505 nm was detected using a cooled digital CCD camera (Hisca CCD C-6790, Hamamatsu, Japan) and recorded using Aquacosmos 2.5 software (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan). Ca^{2+} entry was estimated using the integral of the rise in fura-2 fluorescence 340/380 nm ratio for 2 min after addition of CaCl_2 . Ca^{2+} release was estimated using the integral of the rise in fura-2 fluorescence 340/380 nm ratio for 2 min after the addition of thrombin or TG, in presence or absence of 60 μM HC-030031 or 5 μM AITC.

To calculate the initial rate of Ca^{2+} elevation after the addition of Ca^{2+} to the medium, the traces were fitted to the equation $y = A + Kx$ where K is the slope.

2.7. Statistical analysis

Analysis of statistical significance was performed using Student's t -test for comparison between two groups. $p < 0.05$ was considered to be significant for a difference.

3. Results

3.1. TRPA1 is expressed in human MEG01 and DAM1 cells and megakaryocytes but not in platelets

Even though TRPA1 mRNA expression has been reported in human platelets [33], we have further explored the expression of TRPA1 at the protein level in human platelets by using Western blotting. As shown in Fig. 1, Western blotting of whole cell platelet lysates using a specific anti-TRPA1 antibody failed to detect TRPA1 in human platelets. By contrast, under the same experimental conditions, the anti-TRPA1 antibody was able to detect a single band, at 140 kDa (the predicted TRPA1 size), in the human megakaryoblastic cell lines MEG01 and DAM1 and human megakaryocytes (Fig. 1A).

3.2. Effect of MEG01 maturation in TRPA1 expression

Since we have observed that TRPA1 protein is not expressed in human platelets but it was found in the megakaryoblastic cell line MEG01 we explored whether the expression of this channel is modified during the process of maturation. Maturation was induced using PMA, an activator of protein kinase C [30]. Rap1b protein, a ubiquitous Ras-related GTPase that increased with megakaryocytic maturation, was used as a maturation marker [34–37]. Treatment of MEG01 cells with 10 nM PMA resulted in a significant and time-dependent increase in Rap1b expression as compared to control cells treated with vehicle, where the expression of Rap1b was not modified during the 4 days of the experiment (Fig. 2, top panel and graph; $p < 0.05$; $n = 6$). In order to investigate the possible role of TRPA1 in maturation, cells were treated with the TRPA1 specific inhibitor HC-030031 [38–40]. MEG01 cells were treated with 60 μM HC-030031 and the expression of Rap1b was analyzed every 24 h during 4 days. As shown in Fig. 2, treatment with HC-030031 neither modified the expression of Rap1b *per se* nor altered PMA-induced Rap1b expression increase; thus demonstrating that TRPA1 activity has a negligible effect, if any, in MEG01 cell maturation. Reprobing of the same membranes with anti-actin antibody was performed for protein loading control and revealed a similar amount of protein loaded in all lanes (Fig. 2, bottom panels).

As reported in Fig. 3, treatment of MEG01 cells with 10 nM PMA significantly reduced TRPA1 expression in a time-dependent manner, with a detectable attenuation of TRPA1 protein expression after 24 h of treatment with PMA ($p < 0.05$; $n = 6$). Reprobing of the same samples with anti-actin antibody revealed a comparable amount of protein loaded in all lanes (Fig. 3, bottom panel). By contrast, MEG01 cells treatment with the TRPA1 inhibitor did not alter TRPA1 protein expression at least during the first 4 days of treatment as compared to control (vehicle added); thus confirming that this inhibitor does not modify the expression of TRPA1. These findings indicate that, while TRPA1 function is not relevant for MEG01 maturation induced by PMA, maturation itself significantly attenuates TRPA1 protein expression, thus explaining the expression of TRPA1 in megakaryoblastic cells but not in mature human platelets.

3.3. Role of TRPA1 in Ca^{2+} mobilization

Since TRPA1 is expressed in MEG01 cells we have investigated its involvement in Ca^{2+} mobilization induced by physiological agonists. As shown in Fig. 4A and B, treatment of MEG01 cells with thrombin in a Ca^{2+} -free medium resulted in a transient increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ due to Ca^{2+} release from intracellular Ca^{2+} stores [41]. Pretreatment of the cells for 10 min with 60 μM HC-030031, a TRPA1 inhibitor [38], did not significantly alter either resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$ or thrombin-induced Ca^{2+} release (the integral of the rise in fura-2 fluorescence 340/380 nm ratio for 2 min after the addition of thrombin in the absence or presence of HC-030031 were 3087 ± 504 and 2994 ± 412 , respectively; $n = 8$). In the presence of 1 mM extracellular Ca^{2+} , thrombin induced a greater elevation in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ than that obtained in a Ca^{2+} -free medium as a

result of Ca^{2+} entry (Fig. 4C). Interestingly, treatment of MEG01 cells with HC-030031 significantly enhanced thrombin-evoked Ca^{2+} mobilization in the presence of 1 mM extracellular Ca^{2+} , thus, suggesting that inhibition of TRPA1 function enhances Ca^{2+} entry evoked by thrombin (Fig. 4C and D, $p < 0.05$; $n = 8$).

Thrombin has been reported to induce both capacitative (store-operated) and non-capacitative Ca^{2+} entry [42]. Hence, we have investigated the role of TRPA1 in store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) in MEG01 cells. In a Ca^{2+} -free medium, TG, a specific inhibitor of the sarco/endoplasmic-reticulum Ca^{2+} -ATPase [43], evoked a sustained elevation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in MEG01 cells owing to the release of Ca^{2+} from intracellular pools, which was insensitive to treatment of MEG01 cells

with the TRPA1 inhibitor HC-030031 (the integral of the rise in fura-2 fluorescence 340/380 nm ratio for 2 min after the addition of TG in the absence or presence of HC-030031 was 1207 ± 201 and 1170 ± 112 , respectively; Fig. 4E and F). In the presence of 1 mM extracellular Ca^{2+} TG-evoked a prolonged and greater increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ due to both Ca^{2+} release from internal stores and the subsequent activation of SOCE. As for thrombin, treatment with HC-030031 significantly enhanced TG-evoked Ca^{2+} mobilization in the presence of extracellular Ca^{2+} , which is entirely dependent on the effect of TRPA1 on the activation of SOCE (Fig. 4G and H, $p < 0.05$; $n = 8$). Similar results were observed in human megakaryocytes. As shown in Fig. 4I and J, treatment of megakaryocytes with thrombin or TG in a Ca^{2+} -free medium

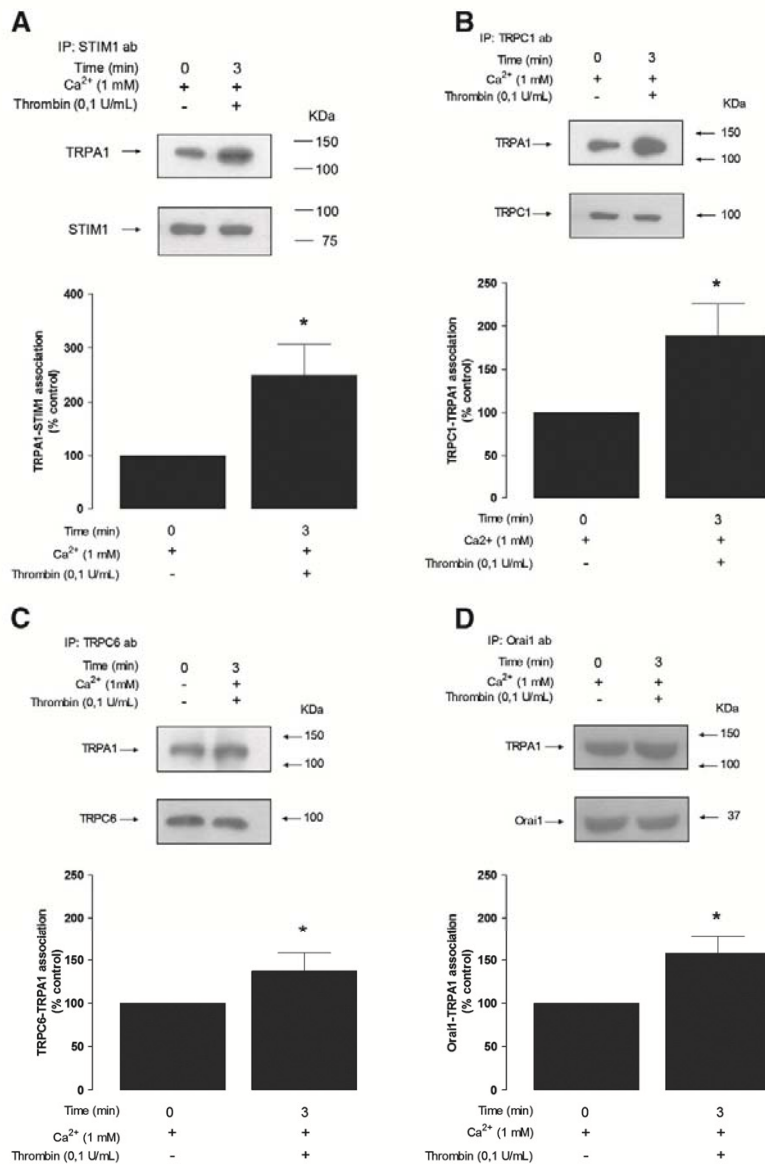


Fig. 7. Thrombin stimulates the association of TRPA1 with STIM1 and the Ca^{2+} -permeable channels Orai1, TRPC1 and TRPC6. Dimethyl BAPTA-loaded MEG01 cells were suspended in Ca^{2+} -free BSS. Cells were stimulated with 0.1 U/mL thrombin for 3 min or left untreated (control) and lysed. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-STIM1 antibody (A), anti-TRPC1 antibody (B), anti-TRPC6 antibody (C) or anti-Orai1 antibody (D), followed by Western blotting using an anti-TRPA1 antibody. Membranes were re-probed with the immunoprecipitating antibody for protein loading control. Histograms represent the interaction of TRPA1 with the different proteins in resting and thrombin-stimulated cells. Data shown are representative of 4–5 independent experiments. Values are means \pm S.E.M. *, $p < 0.05$ compared with control.

resulted in elevation of $[Ca^{2+}]_i$ due to Ca^{2+} release from the intracellular stores. Subsequent addition of Ca^{2+} resulted in a further elevation in $[Ca^{2+}]_i$ indicative of Ca^{2+} entry. Treatment for 10 min with 60 μM HC-030031 significantly enhanced thrombin and TG-induced Ca^{2+} entry by 22 and 27%, respectively, without having any effect on Ca^{2+} release from the intracellular stores. These findings demonstrate that TRPA1 is a regulator of SOCE in MEG01 cells and megakaryocytes.

We have further explored whether TRPA1 activation results in any change in agonist-induced Ca^{2+} mobilization. As depicted in Fig. 5, treatment of MEG01 cells with 5 μM AfTC did not modify $[Ca^{2+}]_i$.

Pharmacological activation of TRPA1 using AfTC did not alter either thrombin- or TG-evoked Ca^{2+} mobilization ($n = 8$).

We have further investigated the role of TRPA1 in SOCE in MEG01 cells by using an approach based on the downregulation of TRPA1 expression during MEG01 maturation. As depicted in Fig. 3, the expression of TRPA1 is time-dependently attenuated during maturation; therefore, we have tested TG-evoked Ca^{2+} entry in control MEG01 cells and cells treated with PMA for 2 and 4 days. As shown in Fig. 6, top panel, treatment with PMA did not alter TG-evoked Ca^{2+} release from the intracellular stores but significantly enhanced TG-evoked SOCE ($p < 0.05$; $n = 5$).

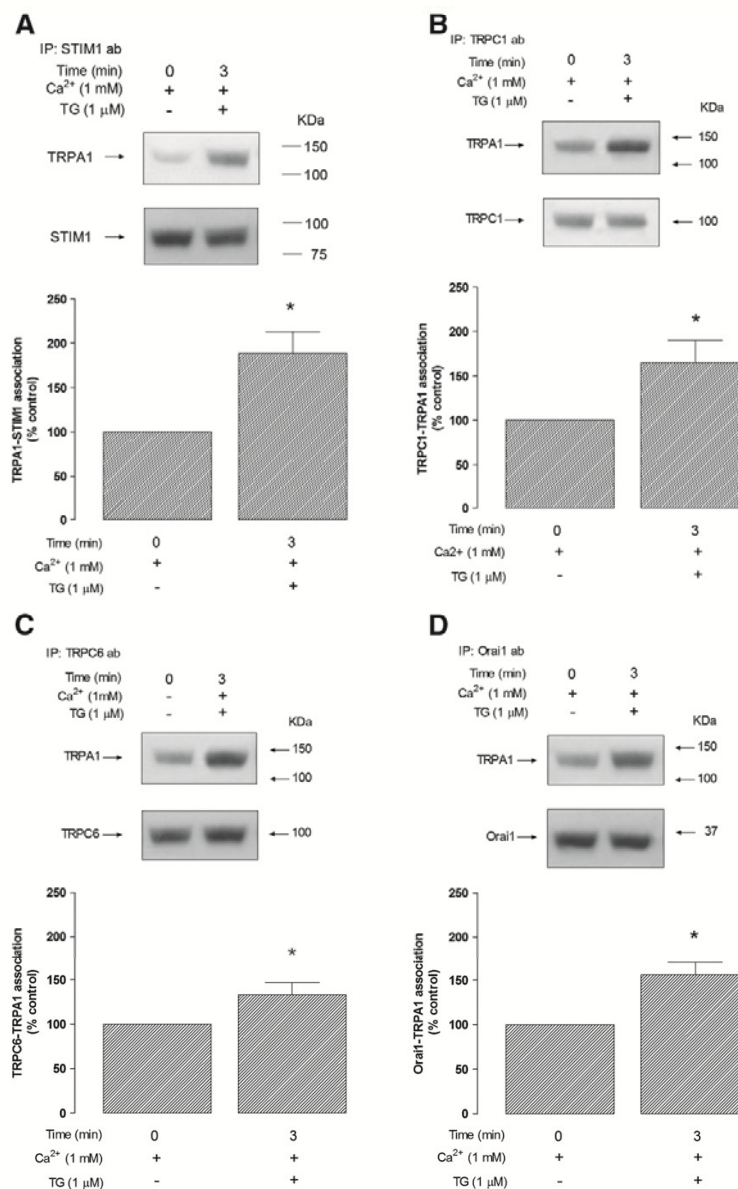


Fig. 8. Thapsigargin evokes the association of TRPA1 with STIM1 and the Ca^{2+} -permeable channels Orai1, TRPC1 and TRPC6. Dimethyl BAPTA-loaded MEG01 cells were suspended in Ca^{2+} -free BSS. Cells were stimulated with 1 μM thapsigargin for 3 min or left untreated (control) and lysed. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-STIM1 antibody (A), anti-TRPC1 antibody (BA), anti-TRPC6 antibody (C) or anti-Orai1 antibody (DE), followed by Western blotting using an anti-TRPA1 antibody. Membranes were reprobed with the immunoprecipitating antibody for protein loading control. Histograms represent the interaction of TRPA1 with the different proteins in resting and thapsigargin-stimulated cells. Data shown are representative of 4 independent experiments. Values are means \pm S.E.M., * $p < 0.05$ compared with control.

Although we cannot rule out other possible mechanisms involved in the enhancement of Ca^{2+} entry, these findings indicate that maturation results in an increase in SOCE in these cells, probably due to the attenuation of TRPA1 protein expression, consistent with the results found using the TRPA1 inhibitor HC-030031 (Fig. 4).

As expected, treatment of human platelets with AITC or HC-030031 did not result in any change in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ or alter agonist-evoked Ca^{2+} mobilization (data not shown), which is consistent with the lack of TRPA1 protein expression in these cells (Fig. 1).

3.4. TRPA1 associates with SOCE elements in MEG01 cells

In human platelets, we have reported that SOCE requires the association of STIM1 and the Ca^{2+} permeable channels Orai1, TRPC1 and TRPC6 [15,44–46]. Hence we have investigated the association of TRPA1 with these proteins by looking for co-immunoprecipitation from MEG01 lysates. Cells loaded with dimethyl BAPTA were used in order to eliminate Ca^{2+} -dependent responses. Immunoprecipitation and subsequent SDS-PAGE and Western blotting were conducted using control cells and cells stimulated with the physiological agonist thrombin. After immunoprecipitation of whole cell lysates with the anti-STIM1 antibody, Western blotting revealed the presence of TRPA1 in samples from cells stimulated by thrombin and control. Interestingly, treatment with thrombin significantly enhanced the association of TRPA1 with STIM1 (Fig. 7A, top panel; $p < 0.05$; $n = 5$). Similar results were observed when cells were stimulated with TG (Fig. 8; $p < 0.05$; $n = 4$). Western blotting with anti-STIM1 antibody revealed a similar content of this protein in all lanes (Figs. 7A and 8A, bottom panel).

Furthermore, we found association of TRPA1 with TRPC1, TRPC6 and Orai1 both in resting and thrombin-stimulated MEG01 cells (Fig. 7B–D, top panel). Thrombin-evoked a significant increase in the association of TRPA1 with these channels as compared to controls ($p < 0.05$; $n = 5$), and similar results were found when cells were stimulated with TG

(Fig. 8; $p < 0.05$; $n = 5$), thus, suggesting that TRPA1 takes part in the macromolecular complex regulating SOCE in these cells.

3.5. TRPA1 regulates the association between STIM1 and Orai1 in MEG01 cells

Finally, we have investigated the mechanism underlying the regulation of SOCE by TRPA1 in MEG01 cells. The association between STIM1 and Orai1 has been reported to be crucial for the activation of SOCE [46–48]. Hence we have investigated whether TRPA1 might regulate the association between these proteins in dimethyl BAPTA-loaded cells. We have tested this possibility by using two different approaches. First of all, we tested the effect of maturation in the association between STIM1 and Orai1 induced by agonist, taking into account that maturation downregulates TRPA1 expression. Alternatively, we tested the effect of the TRPA1 inhibitor, HC-030031, in the association between STIM1 and Orai1 induced by agonists. Concerning the first approach, we have tested the association between STIM1 and Orai1 in control MEG01 cells and cells treated with PMA for 2 and 4 days. As shown in Fig. 9A, top panel, treatment with PMA for 2 or 4 days significantly enhanced the association between STIM1 and Orai1 in these cells induced by thrombin ($p < 0.05$; $n = 4$). Consistent with a role for TRPA1 in the STIM1/Orai1 association we found that HC-030031 significantly increased thrombin-induced association between STIM1 and Orai1, without having any effect on the association between these proteins in resting cells ($p < 0.05$; $n = 4$) (Fig. 9B, top panel). These findings strongly indicate that TRPA1 modulates SOCE in MEG01 cells by attenuation of the association between STIM1 and Orai1.

4. Discussion

TRP channels have been reported to play a relevant role in cell function, mostly due to the conduction of cation currents through membranes.

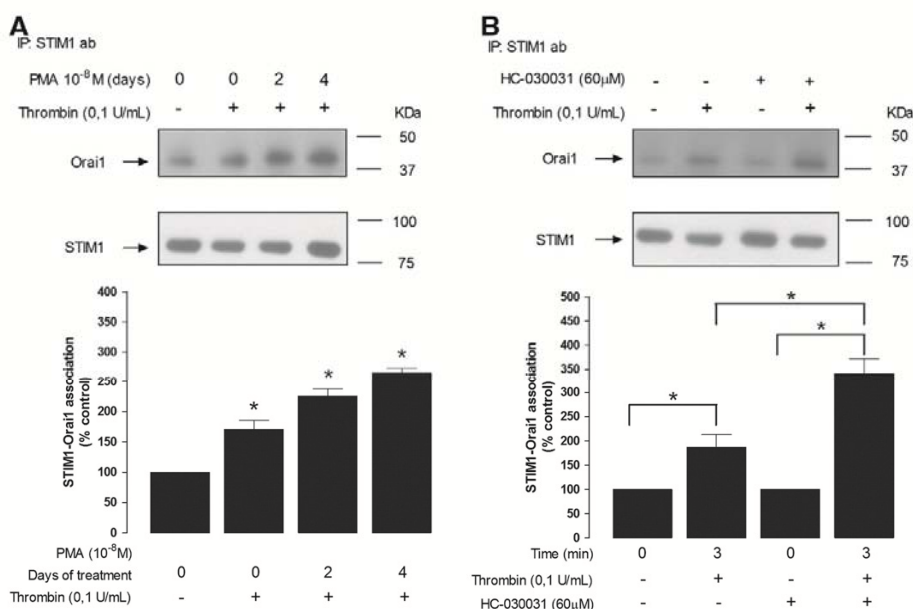


Fig. 9. TRPA1 negatively regulates the association of STIM1 with Orai1 in MEG01 cells. **A**, MEG01 cells were cultured in the absence (control) or presence of 10 nM PMA during 2 and 4 days. Dimethyl BAPTA-loaded cells were stimulated with 0.1 U/mL thrombin for 3 min or left untreated and lysed. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-STIM1 antibody, followed by Western blotting using an anti-Orai1 antibody. **B**, Dimethyl BAPTA-loaded MEG01 cells were treated with 60 μ M HC-030031 or the vehicle (as control) and then stimulated with 0.1 U/mL thrombin for 3 min or left untreated and lysed. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-STIM1 antibody, followed by Western blotting using an anti-Orai1 antibody. Histograms represent the interaction of STIM1 with Orai1. Data shown are representative of 4 independent experiments. Values are means \pm S.E.M. *, $p < 0.05$ compared with control.

Especially relevant is the role of TRP channels in Ca^{2+} influx from the extracellular medium [49]. In addition, a new role for TRP channels in the regulation of Ca^{2+} movements through other channels is emerging. To illustrate this statement, TRPC1 has been recently reported as a negative regulator of TRPV6-mediated Ca^{2+} influx through the attenuation of TRPV6 expression in the plasma membrane [50]. In the present study we report for the first time the role of TRPA1 as a negative regulator of SOCE in MEG01 cells and megakaryocytes. This finding has been demonstrated using two different approaches: channel silencing expression as a result of PMA-induced maturation of MEG01 cells, as well as inactivation of TRPA1 function using a pharmacological tool. Although we cannot rule out that MEG01 cell maturation results in enhancement of SOCE also by mechanisms different from TRPA1 expression downregulation, inactivation of TRPA1 by using HC-030031 produced basically the same effects, which strongly suggests that SOCE enhancement during maturation is, at least partially, dependent on TRPA1. Treatment of MEG01 cells with HC-030031 did not significantly alter Ca^{2+} release stimulated by thrombin or passive Ca^{2+} efflux induced by TG, which indicates that this inhibitor does not alter the ability of cells to accumulate Ca^{2+} into the intracellular stores or the ability of thrombin to induce Ca^{2+} release from the stores. Furthermore, these findings suggest that TRPA1 is not involved in agonist-induced Ca^{2+} release or Ca^{2+} leakage from the intracellular Ca^{2+} compartments.

TRPA1 negatively regulates Ca^{2+} -independent association of STIM1 with Orai1, which might be the mechanism underlying the modulation of SOCE in MEG01 cells. The regulation of signaling complexes by TRPA1 resembles that previously reported to TRPC3, which recruits Orai1, STIM1, RACK1 and the type I IP_3 receptor into a TRPC3-dependent signalplex that modulates agonist-induced Ca^{2+} release and entry in HEK-293 cells [27,28]. We have found that TRPA1 is constitutively associated to STIM1 and Orai1, although these interactions are enhanced by stimulation with agonists. Furthermore, our results indicate that TRPA1 is constitutively active, since cell treatment with AITC, a TRPA1 activator, did not result in further inhibition of agonist-induced Ca^{2+} entry and SOCE.

Interestingly, the role of TRPA1 as a SOCE modulator disappears with maturation so that mature human platelets do not express TRPA1 at the protein level, thus resulting in a significantly greater SOCE in platelets upon depletion of the intracellular Ca^{2+} stores by TG, as demonstrated in Fig. 10, which depicts the determination of SOCE in MEG01 and platelets performed under comparable conditions. The present study presents a new and interesting function of TRPA1 channels in cellular function not associated with the previously reported thermal and noxious sensitivity [51]. This new feature described here should be taken into account in the design of therapeutic drugs aimed at the modification of calcium entry.

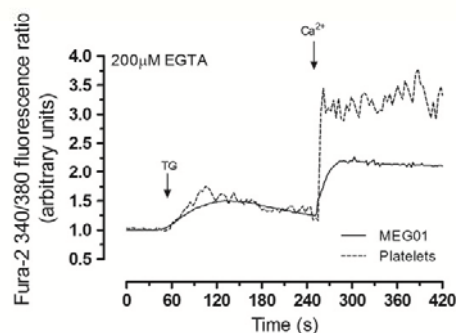


Fig. 10. Comparative analysis of TG-evoked store-operated Ca^{2+} entry in MEG01 cells and platelets. MEG01 cells and human platelets were suspended in BSS and HBS, respectively. Fura 2-loaded cells were stimulated with $1 \mu\text{M}$ TG in a Ca^{2+} -free medium ($200 \mu\text{M}$ EGTA added) and 3 min later CaCl_2 (final concentration $600 \mu\text{M}$) was added to initiate Ca^{2+} entry. Traces shown are representative of 5 separate experiments.

Acknowledgements

This work was supported by MICINN (grants BFU2010-21043-C02-01 and BFU2010-21043-C02-02) and Junta de Extremadura–FEDER (GR10010). L.A. and N.D. are supported by Spanish Ministry of Science and Innovation (BES-2011-043356) and Junta de Extremadura (PRE09020), respectively.

References

- [1] I.J. Wu, T.B. Sweet, D.E. Clapham, International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *Pharmacol. Rev.* 62 (2010) 381–404.
- [2] T.I. Cvetkov, K.W. Huynh, M.R. Cohen, V.Y. Moiseenkova-Bell, Molecular architecture and subunit organization of TRPA1 ion channel revealed by electron microscopy. *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 38168–38176.
- [3] D.M. Bautista, M. Pellegrino, M. Tsunozaki, TRPA1: a gatekeeper for inflammation. *Annu. Rev. Physiol.* 75 (2013) 181–200.
- [4] J.F. Cordero-Morales, E.O. Gracheva, D. Julius, Cytoplasmic ankyrin repeats of transient receptor potential A1 (TRPA1) dictate sensitivity to thermal and chemical stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) E1184–E1191.
- [5] A. Samad, I. Sura, J. Benedikt, R. Eitrich, B. Minofar, J. Teisinger, V. Vlachova, The C-terminal basic residues contribute to the chemical- and voltage-dependent activation of TRPA1. *Biochem. J.* 433 (2011) 197–204.
- [6] I. Sura, V. Zima, L. Marsakova, A. Hynkova, I. Barvik, V. Vlachova, C-terminal acidic cluster is involved in Ca^{2+} -induced regulation of human transient receptor potential ankyrin 1 channel. *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 18067–18077.
- [7] S. Earley, A.I. Gonzales, R. Cnrich, Endothelium-dependent cerebral artery dilation mediated by TRPA1 and Ca^{2+} -activated K^{+} channels. *Circ. Res.* 104 (2009) 987–994.
- [8] R. Atayan, D. Shander, N.V. Botchkareva, Non-neuronal expression of transient receptor potential type A1 (TRPA1) in human skin. *J. Invest. Dermatol.* 129 (2009) 2312–2315.
- [9] K. Nozawa, E. Kawabata-Shoda, H. Doihara, R. Kojima, H. Okada, S. Mochizuki, Y. Sano, K. Inamura, H. Matsushima, T. Koizumi, T. Yokoyama, H. Ito, TRPA1 regulates gastrointestinal motility through serotonin release from enterochromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 3408–3413.
- [10] D.S. Cao, L. Zhong, T.H. Hsieh, M. Abooj, M. Bishnoi, L. Hughes, L.S. Premkumar, Expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) and its role in insulin release from rat pancreatic beta cells. *PLoS One* 7 (2012) e38005.
- [11] T. Kono, A. Kaneko, Y. Omiya, K. Ohbuchi, N. Ohno, M. Yamamoto, Epithelial transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1)-dependent adrenomedullin up-regulates blood flow in rat small intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 304 (2013) 428–436.
- [12] N.W. Bellono, L.G. Kammel, A.L. Zimmerman, E. Oancea, UV light phototransduction activates transient receptor potential A1 ion channels in human melanocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 2383–2388.
- [13] V. Zayats, A. Samad, B. Minofar, K.E. Roelofs, T. Stockner, R. Eitrich, Regulation of the transient receptor potential channel TRPA1 by its N-terminal ankyrin repeat domain. *J. Mol. Model.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1007/s00894-012-1505-1>.
- [14] J.W. Putney, Capacitative calcium entry: from concept to molecules. *Immunol. Rev.* 231 (2009) 10–22.
- [15] J.J. Lopez, G.M. Salido, J.A. Pariente, J.A. Rosado, Interaction of STIM1 with endogenously expressed human canonical TRP1 upon depletion of intracellular Ca^{2+} stores. *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 28254–28264.
- [16] J. Rook, P.J. DiGregorio, A.V. Yeromin, K. Ohlsen, M. Lioudyno, S. Zhang, O. Safrina, J.A. Kozak, S.L. Wagner, M.D. Cahalan, G. Velicelebi, K.A. Stauderman, STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca^{2+} channel function. *J. Cell Biol.* 169 (2005) 435–445.
- [17] H. Zbidi, I. Jardin, G.E. Woodard, J.J. Lopez, A. Berna-Erro, G.M. Salido, J.A. Rosado, STIM1 and STIM2 are located in the acidic Ca^{2+} stores and associates with Orai1 upon depletion of the acidic stores in human platelets. *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 12257–12270.
- [18] J. Soboloff, M.A. Spassova, X.D. Tang, T. Hewavitharana, W. Xu, D.L. Gill, Orai1 and STIM1 reconstitute store-operated calcium channel function. *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 20661–20665.
- [19] P.F. Worley, W. Zeng, G.N. Huang, J.P. Yuan, J.Y. Kim, M.G. Lee, S. Muallem, TRPC channels as STIM1-regulated store-operated channels. *Cell Calcium* 42 (2007) 205–211.
- [20] B. Xiao, B. Coste, J. Mathur, A. Patapoutian, Temperature-dependent STIM1 activation induces Ca^{2+} influx and modulates gene expression. *Nat. Chem. Biol.* 7 (2011) 351–358.
- [21] I. Bogeski, C. Kummerow, D. Al-Ansary, E.C. Schwarz, R. Koehler, D. Kozai, N. Takahashi, C. Peinelt, D. Griesemer, M. Bozem, Y. Mori, M. Hoch, B.A. Niemeyer, Differential redox regulation of Orai1 ion channels: a mechanism to tune cellular calcium signaling. *Sci. Signal.* 3 (2010) ra24.
- [22] E. Lopez, I. Jardin, A. Berna-Erro, N. Bermejo, G.M. Salido, S.O. Sage, J.A. Rosado, P.C. Redondo, STIM1 tyrosine-phosphorylation is required for STIM1–Orai1 association in human platelets. *Cell. Signal.* 24 (2012) 1315–1322.
- [23] I. Jardin, L. Albarrán, N. Bermejo, G.M. Salido, J.A. Rosado, Homers regulate calcium entry and aggregation in human platelets: a role for Homers in the association between STIM1 and Orai1. *Biochem. J.* 445 (2012) 29–38.
- [24] J.J. Lopez, N. Dionisio, A. Berna-Erro, C. Galan, G.M. Salido, J.A. Rosado, Two-pore channel 2 (TPC2) modulates store-operated Ca^{2+} entry. *Biochim. Biophys. Acta* 1823 (2012) 1976–1983.

- [25] J.J. Lopez, I. Jardin, R. Bobe, J.A. Pariente, J. Enouf, G.M. Salido, J.A. Rosado, STIM1 regulates acidic Ca^{2+} store refilling by interaction with SERCA3 in human platelets, *Biochem. Pharmacol.* 75 (2008) 2157–2164.
- [26] R. Bobe, L. Hadri, J.J. Lopez, Y. Sassi, F. Atassi, I. Karakikes, L. Liang, I. Limon, A.M. Lompre, S.N. Hatem, R.J. Hajjar, L. Lipskaia, SERCA2a controls the mode of agonist-induced intracellular Ca^{2+} signal, transcription factor NFAT and proliferation in human vascular smooth muscle cells, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 50 (2011) 621–633.
- [27] B.C. Bandyopadhyay, H.L. Ong, T.P. Lockwich, X. Liu, B.C. Paria, B.B. Singh, I.S. Ambudkar, TRPC3 controls agonist-stimulated intracellular Ca^{2+} release by mediating the interaction between inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and RACK1, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 32821–32830.
- [28] G.E. Woodard, J.J. Lopez, I. Jardin, G.M. Salido, J.A. Rosado, TRPC3 regulates agonist-stimulated Ca^{2+} mobilization by mediating the interaction between type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, RACK1, and Orai1, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 8045–8053.
- [29] J.J. Lopez, G.M. Salido, E. Gomez-Arteta, J.A. Rosado, J.A. Pariente, Thrombin induces apoptotic events through the generation of reactive oxygen species in human platelets, *J. Thromb. Haemost.* 5 (2007) 1283–1291.
- [30] R. Bredoux, E. Corvazier, S. Dally, C. Chaabane, R. Bobe, A. Raies, A. Moreau, J. Enouf, Human platelet Ca^{2+} -ATPases: new markers of cell differentiation as illustrated in idiopathic scoliosis, *Platelets* 17 (2006) 421–433.
- [31] E. den Dekker, G. Gorter, J.W.M. Heemskerk, J.W. Akkerman, Development of platelet inhibition by cAMP during megakaryocytopoiesis, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 29321–29329.
- [32] A. Berna-Erro, C. Galan, N. Dionisio, L.J. Gomez, G.M. Salido, J.A. Rosado, Capacitative and non-capacitative signaling complexes in human platelets, *Biochim. Biophys. Acta* 1823 (2012) 1242–1251.
- [33] P. Bugert, H. Kluter, Profiling of gene transcripts in human platelets: an update of the platelet transcriptome, *Platelets* 17 (2006) 503–504.
- [34] K. Nagata, Y. Okano, Y. Nozawa, Differential expression of low Mr GTP-binding proteins in human megakaryoblastic leukemia cell line, MEG-01, and their possible involvement in the differentiation process, *Thromb. Haemost.* 77 (1997) 368–375.
- [35] A. Balduini, A. Pecci, P. Lova, N. Arezzi, C. Marseghia, F. Bellora, C. Perotti, C. Balduini, C.L. Balduini, M. Torti, Expression, activation, and subcellular localization of the Rap1 GTPase in cord blood-derived human megakaryocytes, *Exp. Cell Res.* 300 (2004) 84–93.
- [36] T. Ficko, Platelet glycoprotein IIIa gene expression in normal and malignant megakaryopoiesis, *Ann. Hematol.* 87 (2008) 131–137.
- [37] H. Raslova, A. Kauffmann, D. Sekkai, H. Ripoché, F. Larbret, T. Robert, D.T. Le Roux, G. Kroemer, N. Debili, P. Dessen, V. Lazar, W. Vainchenker, Interrelation between polyploidization and megakaryocyte differentiation: a gene profiling approach, *Blood* 109 (2007) 3225–3234.
- [38] C. Harteneck, C. Klöse, D. Krautwurst, Synthetic modulators of TRP channel activity, *Adv. Exp. Med. Biol.* 704 (2011) 87–106.
- [39] R. Capasso, G. Aviello, B. Romano, F. Borrelli, L. De Petrocellis, V. Di Marzo, A.A. Izzo, Modulation of mouse gastrointestinal motility by allyl isothiocyanate, a constituent of cruciferous vegetables (Brassicaceae): evidence for TRPA1-independent effects, *Br. J. Pharmacol.* 165 (2012) 1966–1977.
- [40] P.C. Kerstein, D. del Camino, M.M. Moran, C.I. Stucky, Pharmacological blockade of TRPA1 inhibits mechanical firing in nociceptors, *Mol. Pain* 5 (2009) 19.
- [41] N. Dionisio, L. Albarán, J.J. Lopez, A. Berna-Erro, G.M. Salido, R. Bobe, J.A. Rosado, Acidic NAADP-releasable Ca^{2+} compartments in the megakaryoblastic cell line MEG01, *Biochim. Biophys. Acta* 1813 (2011) 1483–1494.
- [42] J.A. Rosado, S.O. Sage, Protein kinase C activates non-capacitative calcium entry in human platelets, *J. Physiol.* 529 (Pt 1) (2000) 159–169.
- [43] O. Thastrup, B. Föder, O. Scharff, The calcium mobilizing tumor promoting agent, thapsigargin elevates the platelet cytoplasmic free calcium concentration to a higher steady state level. A possible mechanism of action for the tumor promotion, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142 (1987) 654–660.
- [44] H. Zbidi, I. Jardin, G.E. Woodard, J.J. Lopez, A. Berna-Erro, G.M. Salido, J.A. Rosado, STIM1 and STIM2 are located in the acidic Ca^{2+} stores and associates with Orai1 upon depletion of the acidic stores in human platelets, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 12257–12270.
- [45] I. Jardin, L.J. Gomez, G.M. Salido, J.A. Rosado, Dynamic interaction of hTRPC6 with the Orai1/STIM1 complex or hTRPC3 mediates its role in capacitative or non-capacitative Ca^{2+} entry pathways, *Biochem. J.* 420 (2009) 267–276.
- [46] I. Jardin, J.J. Lopez, G.M. Salido, J.A. Rosado, Orai1 mediates the interaction between STIM1 and hTRPC1 and regulates the mode of activation of hTRPC1-forming Ca^{2+} channels, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 25296–25304.
- [47] I.F. Abdullaev, J.M. Bisailon, M. Potier, J.C. Gonzalez, R.K. Motiani, M. Trebak, Stim1 and Orai1 mediate CRAC currents and store-operated calcium entry important for endothelial cell proliferation, *Circ. Res.* 103 (2008) 1289–1299.
- [48] B. Darbellay, S. Amaudeau, S. König, H. Jousset, C. Bader, N. Demareux, I. Bernheim, STIM1- and Orai1-dependent store-operated calcium entry regulates human myoblast differentiation, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 5370–5380.
- [49] R.C. Hardie, Regulation of TRP channels via lipid second messengers, *Annu. Rev. Physiol.* 65 (2003) 735–759.
- [50] R. Schindl, R. Fritsch, I. Jardin, I. Frischauf, H. Kahr, M. Muik, M.C. Riedl, K. Groschner, C. Romanin, Canonical transient receptor potential (TRPC) 1 acts as a negative regulator for vanilloid TRPV6-mediated Ca^{2+} influx, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 35612–35620.
- [51] M. Bandell, G.M. Story, S.W. Hwang, V. Viswanath, S.R. Eid, M.J. Petrus, T.J. Earley, A. Patapoutian, Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin, *Neuron* 41 (2004) 849–857.



TRPC6 participates in the regulation of cytosolic basal calcium concentration in murine resting platelets



Letizia Albarran^{a,1}, Alejandro Berna-Erro^{a,*}, Natalia Dionisio^a, Pedro C. Redondo^a, Esther Lopez^a, Jose J. Lopez^a, Gines M. Salido^a, Jose M. Brull Sabate^b, Juan A. Rosado^a

^a Phycell Group, Department of Physiology, University of Extremadura, Cáceres, 10003, Extremadura, Spain

^b Blood Bank of Extremadura, Servicio Extremeño de Salud, 06800, Mérida, Extremadura, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 August 2013

Received in revised form 12 January 2014

Accepted 13 January 2014

Available online 23 January 2014

Keywords:

TRPC

Calcium

Platelets

Hemostasis

Thrombosis

ABSTRACT

Cytosolic free Ca^{2+} plays a crucial role in blood platelet function and is essential for thrombosis and hemostasis. Therefore, cytosolic-free Ca^{2+} concentration is tightly regulated in this cell. TRPC6 is expressed in platelets, and an important role for this Ca^{2+} channel in Ca^{2+} homeostasis has been reported in other cell types. The aim of this work is to study the function of TRPC6 in platelet Ca^{2+} homeostasis. The absence of TRPC6 resulted in an 18.73% decreased basal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in resting platelets as compared to control cells. Further analysis confirmed a similar Ca^{2+} accumulation in wild-type and TRPC6-deficient mice; however, passive Ca^{2+} leak rates from agonist-sensitive intracellular stores were significantly decreased in TRPC6-deficient platelets. Biotinylation studies indicated the presence of an intracellular TRPC6 population, and subcellular fractionation indicated their presence on endoplasmic reticulum membranes. Moreover, the presence of intracellular calcium release in platelets stimulated with 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol further suggested a functional TRPC6 population located on the intracellular membranes surrounding calcium stores. However, coimmunoprecipitation assay confirmed the absence of STIM1–TRPC6 interactions in resting conditions. This findings together with the absence of extracellular Mn^{2+} entry in resting wild-type platelets indicate that the plasma membrane TRPC6 fraction does not play a significant role in the maintenance of basal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in mouse platelets. Our results suggest an active participation of the intracellular TRPC6 fraction as a regulator of basal $[\text{Ca}^{2+}]_i$, controlling the passive Ca^{2+} leak rate from agonist-sensitive intracellular Ca^{2+} stores in resting platelets.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The intracellular free-calcium ion (Ca^{2+}) is the master secondary messenger in cells, which is involved in many basic cellular functions [1]. Thus, the cytosolic free- Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) is tightly regulated by many intracellular mechanisms of Ca^{2+} homeostasis. Blood platelets are small anucleated cell fragments derived from bone marrow megakaryocytes that, once activated by physiological agonists, play a key function in mechanisms of thrombosis and hemostasis [2]. The increase of basal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ observed in stimulated platelets triggers cellular responses that are critical for their activation and function [2]. This $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation is achieved by two main mechanisms: discharge of agonist-sensitive intracellular Ca^{2+} stores, extracellular Ca^{2+} influx through the plasma membrane, or both. Ca^{2+} mobilization is regulated

by Ca^{2+} channels located in membranes separating extracellular and subcellular compartments, so that depletion of agonist-sensitive intracellular stores is mainly regulated by inositol triphosphate (IP_3) receptors in activated platelets, whereas extracellular Ca^{2+} entry is mainly regulated by members of the transient receptor potential (TRP) and the Orai Ca^{2+} channel family [3,4]. Orai channels and certain members of the canonical TRP (TRPC) Ca^{2+} channel subfamily are activated by a previous depletion of agonist-sensitive intracellular stores through a mechanism referred to as store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) [4]. Stromal interaction molecule 1 and 2 (STIM1 and 2) are the Ca^{2+} sensors located in the membrane of the endoplasmic reticulum (ER) and other organelles, which participate in this mechanism by detection of decreases in their Ca^{2+} content and migration to the plasma membrane to interact and to activate TRPC and Orai Ca^{2+} channels [5]. Moreover, several TRPC members can be also stimulated and activated by diacylglycerol [6–8], a molecule synthesized by phospholipase C, which is widely activated during platelet function [4]. *In vivo* studies using murine transgenic models demonstrated a relevant function of TRPC6 in diverse cells, for instance cells of the immune [9,10], nervous [11,12], vascular [13–19] or digestive systems [20] and kidney [21]. Previous studies demonstrated that mouse platelets and megakaryocytes, their cellular precursors, only express RNA transcripts for TRPC(1,6) and

Abbreviations: Non-IP, non-immunoprecipitated fraction; IP, immunoprecipitated fraction; input, unbiotinylated fraction; VSMCs, mesenteric artery vascular smooth muscle cells

* Corresponding author at: Department of Physiology, University of Extremadura, Avd. Universidad s/n, Cáceres, 10003, Spain. Tel.: +34 927 257139x51376; fax: +34 927257110.

E-mail address: alejandrobe@unex.es (A. Berna-Erro).

¹ Authors contributed equally to this work.

TRPM(1,2,7) members [22–24], while human platelets express TRPA1, TRPC(1,3,4,5,6), TRPM(2,7) and TRPV(1,2,4) [6,25–33].

The resting $[Ca^{2+}]_c$ normally maintained in the range of 10–100 nM, is the result of passive Ca^{2+} movements towards the cytosol mostly compensated by the activity of plasma membrane and endosomal Ca^{2+} -ATPases, and sometimes the mitochondria. The maintenance of a low $[Ca^{2+}]_c$ is an essential physiological mechanism to avoid the activation of Ca^{2+} -dependent events. In human platelets, resting $[Ca^{2+}]_c$ has been reported to be altered in certain pathologies, such as diabetes mellitus [34], leading to hyperaggregability and hyperactivity. Hence, we have explored the role of TRPC6 in the maintenance of resting $[Ca^{2+}]_c$ in blood platelets using a murine transgenic model lacking the TRPC6 channel.

2. Material and methods

2.1. Reagents

1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG), apyrase (grade VII), acetyl-salicylic acid, anti-actin polyclonal antibody, bovine serum albumin (BSA), calcium chloride, citric acid, ethyleneglycol-bis(β -aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), ethylenedinitrilotetraacetic acid (EDTA), glucose, HEPES, manganese(II) chloride tetrahydrate, sodium citrate, thapsigargin (TG), Trizma® hydrochloride and Trizma® base were purchased from Sigma–Aldrich (Germany). 1,2-Bis [2-aminophenoxy] ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrakis [acetoxymethyl ester] (BAPTA) was purchased from Molecular Probes®, Life Technologies Ltd (Paisley, UK). Isoflurane (ISOFLO®) was purchased from Esteve Veterinaria (Barcelona, Spain). Complete EDTA-free protease inhibitor tablets were purchased from Roche Pharma AG (Germany). Rabbit anti-mTRPC6 polyclonal antibody was purchased from Alomone Labs (Jerusalem, Israel). Mouse anti STIM1 antibody was from BD Transduction Laboratories (Franklin Lakes, NJ, USA). Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG and anti-mouse antibodies were purchased from Jackson Immuno-Research (PA, USA). Hyperfilm ECL was from Amersham (Buckinghamshire, UK). Protein A-conjugated agarose beads were purchased from Millipore (CA, USA). Enhanced chemiluminescence detection reagents and rabbit anti-mouse IgG were from Pierce (Cheshire, UK). Western blot nitrocellulose membranes were purchased from Bio-Rad Laboratories (CA, USA). Agarose and ethidium bromide were purchased from Roth (Germany). EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin and streptavidin-conjugated agarose beads were purchased from Thermo Fisher Scientific Inc (IL, USA). All other analytical grade reagents were purchased from Sigma–Aldrich (Germany).

2.2. TRPC6-deficient mouse generation

TRPC6-deficient mice were purchased from Deltagen, Inc. (San Mateo, CA, USA) through the European Mouse Mutant Archive (EMMA) network, and they were generated as follows (Fig. 1): A region of the murine *Trpc6* gene containing the exon four (E4) was subcloned. The targeting vector was engineered by substitution of 13 nucleotides located into E4 with a selection cassette containing an internal ribosome entry site, β -galactosidase (*lacZ*) and the neomycin (Neo) resistant gene (Fig. 1A). The targeting vector was electroporated into murine embryonic stem (ES) cells. Positive ES cell colonies expressing the Neo resistant gene were picked, their DNA was isolated and subsequently screened by Southern blot using an external probe specific for the *Trpc6* gene, seeking for those clones that integrated the *Trpc6*-null allele into the *Trpc6* wild-type locus by homologous recombination (targeted allele) (Fig. 1B). Electroporated ES cell clone #1152 resulted heterozygous for the *Trpc6*-null allele, and it was microinjected into wild-type 3.5 days old blastocysts to generate chimeric mice. Chimeric mice were backcrossed with C56Bl6 mice to obtain the first generation (F1) of heterozygous (HT) mice for the *Trpc6*-null allele. Individuals of the F1 generation were finally intercrossed to obtain homozygous mice

for the *Trpc6*-null allele (KO) (Fig. 1C). The disruption of the TRPC6 mRNA transcript translation and the expression of the TRPC6 channel were later confirmed by western blot using an anti-TRPC6 antibody (Alomone, Israel) (Fig. 1D). All experiments were conducted on mice between 8 and 12 weeks of age. Experiments involving animals were conducted in accordance with the regulations of the local authorities and were approved by the institutional review boards of all participating institutions.

2.3. Mouse DNA isolation and PCR genotyping

Mouse genomic DNA was isolated following Jackson Laboratory's indications. Five square millimetres of ear tissue was digested in 400 μ l DNA lysis buffer (10 mM Tris–HCl, 50 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8.0, 0.5% SDS, 0.5 mg/mL proteinase K, pH 8.0) overnight. SDS was then precipitated with 200 μ l saturated NaCl and centrifuged for 20–30 min at 16,000 \times g. 500 μ l supernatant was recovered, mixed with 1000 μ l of absolute ethanol and genomic DNA was precipitated by centrifugation for 10 min at 16,000 \times g. Genomic DNA pellet was washed once with 1 mL 70% ethanol. The residual ethanol was evaporated avoiding excessive DNA drying, and the DNA was resuspended overnight in 50 μ l TE (10 mM Tris–HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) at 4 $^{\circ}$ C.

The flanking primers were used to identify the wild-type and knockout allele: mTRPC6_genot_2F: 5'-atagccacattaagcttagatgaac-3', mNeo_F: 5'-gggcccagctcattctcccactcat-3', mTRPC6_genot_R: 5'-agctagatctttgctgctgtagacag-3'. Two separated PCR reactions (Takara, Japan) were performed with different primer pairs to amplify the wild-type (mTRPC6_genot_2F and mTRPC6_genot_R, 588 bp) and the knockout allele (mNeo_F and mTRPC6_genot_R, 408 bp). The PCR program used is: 95 $^{\circ}$ C, 5 min; 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 60 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 30 s, 35 cycles; 72 $^{\circ}$ C, 10 min. PCR products were separated in 1% agarose gel by electrophoresis and stained with ethidium bromide. 1 cm³ of agarose gel containing the PCR product was extracted using the PCR NucleoSpin® Extract II kit (Macherey-Nagel, Germany) and sequenced (STAB-SALUex, University of Extremadura, Spain) to confirm the correct amplification of the desired genomic DNA region.

2.4. Blood platelet isolation

Mice were bled under isoflurane anesthesia from the retroorbital plexus according to the recommendations of the local Ethical Committee. Blood was collected into an Eppendorf tube containing 300 μ l acid citrate dextrose buffer (85 mM sodium citrate, 78 mM citric acid, 111 mM glucose, pH 7.3). Blood was centrifuged in a Galaxy 7D centrifuge (VWR International, PA, USA) at 300 \times g for 5 min. The supernatant was centrifuged again at 100 \times g for 5 min to obtain platelet-rich plasma (prp). Prp was centrifuged at 600 \times g for 5 min in the presence of the cyclooxygenase inhibitor acetylsalicylic acid (0.1 μ g/mL) and the pellet was resuspended in Ca^{2+} -free Tyrode's buffer (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, NaHCO₃ 12 mM, NaH₂PO₄ 0.43 mM, Glucose 0.1%, HEPES 5 mM, BSA 0.35%, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 7.13) containing apyrase (40 μ g/mL).

2.5. Immunoprecipitation and western blotting

Briefly, 500 μ l aliquots of washed platelet suspension (2×10^9 cell/mL) were lysed with an equal volume of $2 \times$ RIPA buffer (316 mM NaCl, 20 mM Tris, 2 mM EGTA, 0.2% SDS, 2% sodium deoxycholate, 2% triton X-100, 2 mM Na₃VO₄ and complete EDTA-free protease inhibitor tablets, pH 7.2). Cell debris was removed by max. speed centrifugation for 10 min at 4 $^{\circ}$ C. For immunoprecipitation assay, 1 mL platelet lysates were immunoprecipitated by incubation with 2 μ g of anti-STIM1 antibody and 25 μ l of protein A-conjugated agarose beads overnight at 4 $^{\circ}$ C on a rocking platform. Total protein and immunoprecipitated lysates were separated in 8% SDS-PAGE gels and electrophoretically transferred onto

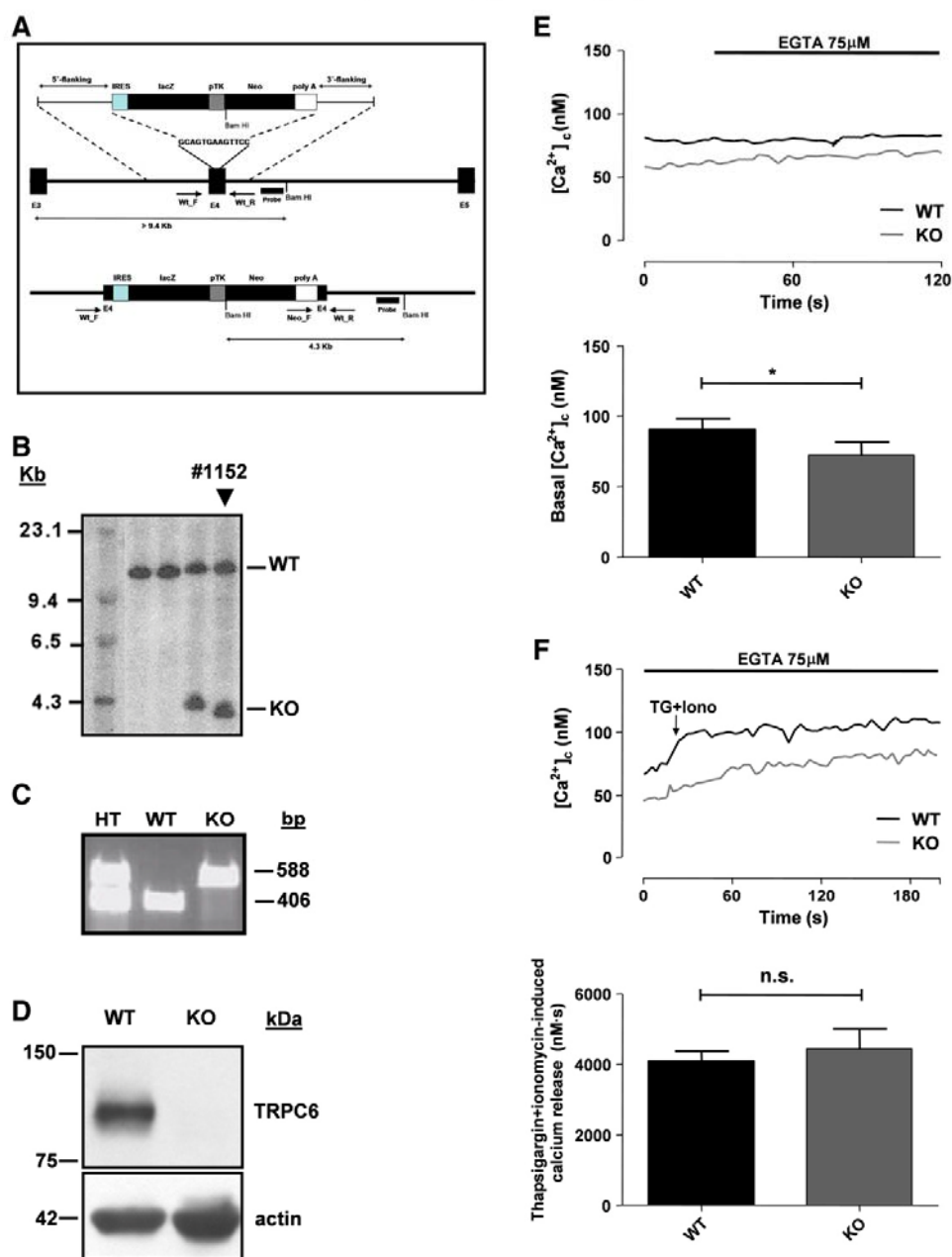


Fig. 1. Characterization of TRPC6-deficient mice and analysis of $[Ca^{2+}]_i$ changes and intracellular Ca^{2+} mobilization in isolated WT and KO platelets. (A) Targeted disruption strategy of the murine *Trpc6* gene. (B) Southern blot analysis of positive ES cells carrying the Neo resistance gene (figure kindly provided by Deltagen®). The selection cassette of the targeted allele inserts a new BamHI restriction site, which generates a smaller DNA fragment (KO, <4.3 Kb) compared to the wild-type allele (WT, >9.4 Kb), and can be detected by an internal radioactively-labelled probe. The ES cell clone #1152 resulted heterozygous for the *Trpc6*-null allele, and it was injected into wild-type blastocyst to generate chimeric mice. (C) Agarose picture of PCR products. The PCR genotyping strategy confirmed the presence of mice homozygous for the *Trpc6* targeted allele (KO) among mice heterozygous for the targeted allele (HT) and homozygous for the wild-type allele (WT). (D) Western blot analysis of TRPC6 protein expression in platelets isolated from WT and KO mice as compared to β -actin (actin) ($n = 3$). (E) Upper: Representative graph of basal $[Ca^{2+}]_i$ records from isolated resting WT (black) and KO (grey) platelets in the presence of 75 μ M EGTA. Lower: histograms represent basal $[Ca^{2+}]_i$ values expressed as mean $[Ca^{2+}]_i \pm SEM$ ($n \geq 26$); * $P < 0.05$, Student's *t*-test. (F) Upper: Representative traces of $[Ca^{2+}]_i$ from isolated WT (black) and KO (grey) platelets before and after intracellular Ca^{2+} mobilization stimulated with a mixture of 1 μ M TG and 100 nM ionomycin in the presence of 75 μ M EGTA. Lower: histograms represent TG + ionomycin-induced Ca^{2+} release over basal, estimated as described in **Material and methods**, and expressed as the mean integral $\pm SEM$ ($n = 6$); (n.s.) Student's *t*-test, not significant.

nitrocellulose membranes for subsequent probing. Blots were blocked with 5% (w/v) BSA in tris-buffered saline (0.05 M Trizma Base, 0.9% NaCl, pH 8.4) with 0.1% Tween 20 (TBST) overnight. Immunodetection of TRPC6 was achieved using the specific anti-TRPC6 antibody diluted 1:1000 for 2 h at room temperature (RT).

Blots were washed three times for 5 min in TBST, subsequently incubated with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody diluted 1:10000 in TBST for 45 min at RT and then exposed to enhanced chemiluminescence reagents for 4 min. Blots were then exposed to X-ray films.

2.6. Biotinylation assay

Washed platelets (10^8) were resuspended in biotinylation buffer (50 mM NaHCO_3 and 0.9% NaCl) and surface labelled with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sulfo-NHS-LC biotin at RT. Labelling was stopped 30 min after reaction with 1% NH_4Cl and phosphate-buffered saline (PBS, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 1.5 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 8 mM, pH 7.14) supplemented with 50 μM EDTA and washed two times in PBS/EDTA. Biotinylated platelets were subsequently lysed in RIPA buffer as described in western blotting procedures, and protein lysates were incubated with streptavidin-conjugated agarose beads overnight at 4 °C on a rocking platform. Biotinylated proteins bound to streptavidin-conjugated agarose beads were isolated by centrifugation and washed three times in RIPA buffer. Total protein and immunoprecipitated lysates were loaded and separated in 8% SDS-PAGE and probed as described in western blotting procedures.

2.7. Subcellular fractionation and ER isolation

Platelets were isolated from 10 wild-type mice blood and washed as described above. Washed platelets were pulled, and ER membranes were isolated with an ER isolation kit (Sigma, Germany). All the procedure was performed at 4 °C. Briefly, pulled platelets were suspended in a hypotonic buffer for 20 min, centrifuged at 600 $\times g$ and suspended in an isotonic buffer. Cell membranes were broken by ultrasound sonication, and unbroken cells were removed by 10 min centrifugation at 1000 $\times g$. Mitochondrial fractions were removed from the supernatant by 15 min centrifugation at 12,000 $\times g$. The microsomal fraction containing ER membranes was precipitated and separated from the supernatant by 1 h at 100,000 $\times g$ ultracentrifugation. Pelleted microsomal fraction was washed, resuspended again in isotonic buffer, and ER membranes were further purified from this fraction by Optiprep density gradient separation at 150,000 $\times g$ for 3 h (from top to bottom, 1.6 mL 15%, 0.6 mL 20% mixed microsomal fraction and 0.8 mL 30% Optiprep). The different fractions were separated by SDS-PAGE and probed with antibodies against TRPC6. Plasma membrane contamination in enriched ER fractions was assessed using an anti-PMCA antibody (clone 5F10; Pierce, Rockford, IL).

2.8. Measurement of $[\text{Ca}^{2+}]_c$

Washed platelets were loaded with fura-2 by incubation with 2 μM fura-2/AM for 45 min at 37 °C in the absence of extracellular Ca^{2+} . Cells were subsequently washed and resuspended in Tyrode's buffer. Fura-2 was excited at alternate wavelengths of 340 and 380 nm, and the emission fluorescence was recorded at 505 nm from 600 μl aliquots of magnetically stirred cellular suspension at 37 °C using an RF-5301PC spectrophotometer (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Changes in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ were assessed by the fura-2 340/380 fluorescence ratio according to Grynkiewicz et al. [35]. TG and iono-induced Ca^{2+} release was estimated using the integral of the rise in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ over basal for 3 min after their addition taking a sample every 1 s and was expressed as nM s [36].

To compare the rate of Ca^{2+} efflux from the agonist-sensitive stores after treatment of platelets with TG in the absence of extracellular Ca^{2+} , traces were fitted to the equation: $y = Ax + B$, where A is the slope of the curve [37].

2.9. Statistical analysis

Analysis of statistical significance was performed using one-way analysis of variance. For comparison between two groups, Student's *t*-test was used. $p < 0.05$ was considered to be significant for a difference.

3. Results

3.1. TRPC6-deficient mice develop and are apparently normal

We used a murine transgenic model to study the function of TRPC6 in blood platelets. Mice homozygous for the *Trpc6*-null mutation (KO) were fertile, developed normally and were apparently healthy (data not shown) as previously reported for other TRPC6-deficient mice [19]. Western blot assay confirmed the presence of TRPC6 protein in platelets obtained from wild-type mice (WT) as previously reported elsewhere [6] and the absence of TRPC6 in platelets isolated from KO mice (Fig. 1D).

3.2. TRPC6 participates as a regulator of basal $[\text{Ca}^{2+}]_c$ in resting platelets

Despite TRPC6 has not been found essential for platelet aggregation, this channel plays a relevant role in Ca^{2+} homeostasis in mouse and human platelets stimulated with agonists [27,38]. In the present study, we have focused on the role of TRPC6 in resting $[\text{Ca}^{2+}]_c$. As depicted in Fig. 1, KO platelets displayed an 18.73% decreased basal $[\text{Ca}^{2+}]_c$ as compared to WT controls in the presence of the extracellular Ca^{2+} chelator EGTA (WT: 84.65 ± 5.10 nM; KO: 68.79 ± 3.77 nM; $p < 0.05$; $n \geq 26$) (Fig. 1E), suggesting a participation of TRPC6 in the control of platelet basal $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Since a small intracellular fraction of TRPC6 population has been previously shown in other cell models [39,40], we investigated whether this population exists also in platelets and if they might be implicated in intracellular Ca^{2+} mobilization. We performed biotinylation studies in platelets due to the difficulty to perform immunocytochemistry in such a small cell (Fig. 2A). In resting conditions, the presence of an unbiotinylated TRPC6 fraction in WT platelets (void) suggested the presence of an intracellular TRPC6 fraction ($n = 3$), which might participate in intracellular Ca^{2+} mobilization. Moreover, OAG-stimulated (100 μM) WT platelets showed a significant Ca^{2+} release (2295.07 ± 279.33 nM s; $p < 0.05$; $n = 5$) from agonist-sensitive intracellular stores as compared to vehicle addition in the presence of EGTA (Fig. 2B), suggestive of a functional machinery involved in store depletion. Western blot of isolated WT platelets after subcellular membrane fractionation revealed TRPC6 expression in the ER-enriched fraction (Fig. 2C), strongly suggesting an ER-resident TRPC6 subpopulation ($n = 2$). The absence of the plasma membrane-resident PMCA in this ER fraction indicates the absence of plasma membrane-resident TRPC6 contamination. Thus, our experimental results suggest the presence of a functional TRPC6 subpopulation located on the membranes of agonist-sensitive intracellular Ca^{2+} stores, such as the ER.

In order to establish whether the absence of TRPC6 has an impact on agonist-sensitive intracellular Ca^{2+} stores, the amount of Ca^{2+} stored in these intracellular reservoirs was indirectly assessed. For that, intracellular membranes were permeated with a mixture of the sarco/ER Ca^{2+} -ATPase (SERCA) inhibitor TG and the permeant ionophore ionomycin, and the amount of Ca^{2+} passively released to the cytoplasm from the stores was assessed with fura-2, as the amount of intracellularly released and stored Ca^{2+} is directly proportional (Fig. 1F). In the presence of 1 μM TG, 100 nM ionomycin and 75 μM of the extracellular Ca^{2+} chelator EGTA, the amount of intracellular Ca^{2+} released to the cytoplasm was similar in both KO and WT control platelets (WT: 4093.89 ± 277.72 nM s; KO: 4435.61 ± 559.71 nM s; $p = 0.4$; $n = 6$), suggesting that the ability of platelets to accumulate Ca^{2+} into the agonist-sensitive intracellular stores was not significantly affected in the absence of TRPC6, which confirms that the different basal $[\text{Ca}^{2+}]_c$ in WT and KO platelets was not due to a distinct amount of Ca^{2+} accumulated into the agonist-sensitive intracellular stores.

We have further explored the role of TRPC6 expression in the rate of passive Ca^{2+} leak from the agonist-sensitive intracellular stores. To investigate this issue, cells were treated with TG in a Ca^{2+} -free medium (75 μM EGTA added) to prevent Ca^{2+} reuptake into agonist-sensitive

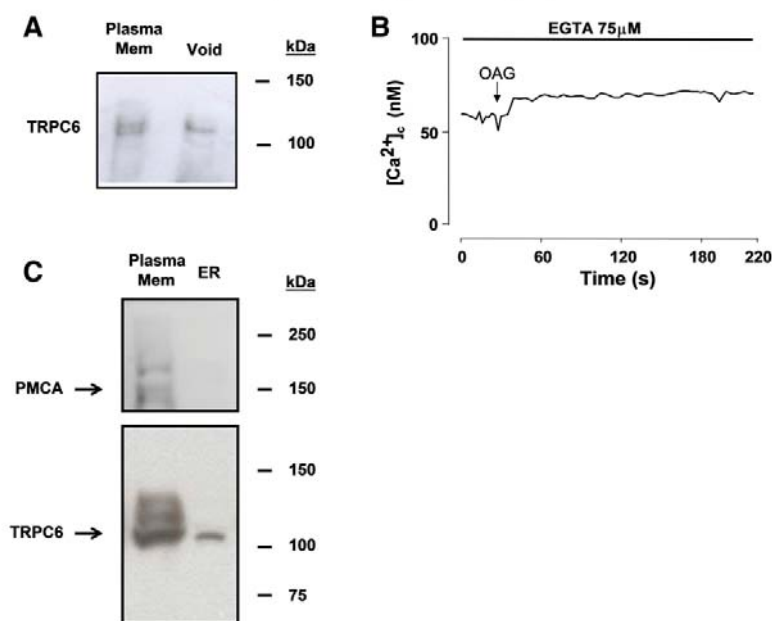


Fig. 2. Expression of TRPC6 in plasma and intracellular membranes. (A) Western blot of total cellular protein lysates extracted from biotinylated WT platelets. TRPC6 expression was detected with an anti-TRPC6 antibody. Left lane represents the biotinylated protein fraction located in the plasma membrane (Plasma Mem). Right lane contains a 10% total volume of the remaining unbiotinylated protein fraction (Void) ($n = 3$). (B) Representative graph of $[Ca^{2+}]_c$ records from isolated WT platelets in the presence of 100 μM OAG and 75 μM EGTA ($n = 5$). (C) Western blot analysis of TRPC6 expression in WT platelet plasma membrane (Plasma Mem) and endoplasmic reticulum (ER) enriched fractions isolated by Optiprep® density gradient. PMCA-positive lanes represent fractions enriched with plasma membranes ($n = 2$).

Ca^{2+} stores by SERCA, and the rate of passive Ca^{2+} leak was estimated as described in methods. Interestingly, in platelets from WT mice, the rate of Ca^{2+} efflux was significantly greater than in those from KO mice (the slope of the curve was $1.88 \pm 0.33 \text{ nM s}^{-1}$ in WT and $1.03 \pm 0.13 \text{ nM s}^{-1}$ in KO mice; $p < 0.05$; $n = 5$). These findings indicate that TRPC6 is a leak channel of the agonist-sensitive Ca^{2+} compartments that plays a relevant role in the maintenance of the basal $[Ca^{2+}]_c$.

3.3. Extracellular Ca^{2+} does not play a relevant role in the maintenance of resting $[Ca^{2+}]_c$

We have tested whether the differences observed in basal $[Ca^{2+}]_c$ between WT and KO platelets in the absence of extracellular Ca^{2+} also occur in the presence of extracellular Ca^{2+} . As shown in Fig. 3A, resting KO platelets showed significantly decreased basal $[Ca^{2+}]_c$ in the presence of 500 μM Ca^{2+} as compared to WT controls (WT: $94.94 \pm 7.62 \text{ nM}$; KO: $65.93 \pm 8.26 \text{ nM}$; $p < 0.05$; $n = 5$). However, the resting $[Ca^{2+}]_c$ was not significantly different in the absence (open bars) or presence of 500 μM extracellular Ca^{2+} , both in WT and KO platelets, which strongly suggest that Ca^{2+} entry has a minor role, if any, in the maintenance of basal $[Ca^{2+}]_c$ in mouse platelets. To confirm this possibility, 50 μM Mn^{2+} was added to the platelet suspension at rest in the presence of 500 μM Ca^{2+} . Mn^{2+} entry has been widely used as a surrogate for Ca^{2+} influx given its quenching effect on fura-2 [41]. As depicted in Fig. 3B, no change in the resting $[Ca^{2+}]_c$ (and fura-2 fluorescence) was detected upon addition of Mn^{2+} either in WT or KO platelets, which strongly suggests that Ca^{2+} influx is undetectable in resting platelets and confirms that Ca^{2+} entry is not relevant for the maintenance of basal $[Ca^{2+}]_c$ in mouse platelets. Furthermore, these findings indicate that the intracellular rather than the plasma membrane-resident pool of TRPC6 is responsible for the attenuation in resting $[Ca^{2+}]_c$ in KO platelets.

3.4. STIM1 does not control TRPC6 activity in resting conditions

The molecular player of SOCE, STIM1, has been proposed as a regulator of TRPC6 activity when complexed with Orai1 in stimulated platelets and other cells [31,42,43]. Thus, we investigated the possibility that STIM1 regulates TRPC6 activity also in resting conditions (Fig. 3C). Western blotting studies using an anti-TRPC6 antibody revealed that TRPC6 does not appear complexed with immunoprecipitated STIM1 in resting platelets (IP), but remains in the non-immunoprecipitated fraction ("Non-IP") ($n = 3$). Thus, the absence of STIM1–TRPC6 interaction in resting platelets suggests that TRPC6 function in resting conditions.

4. Discussion

TRPC6 function has been recently studied in blood platelets using a murine transgenic model lacking TRPC6 function generated by Birnbaumer's group [38,44,45]. However, contradictory results were reported, and its function in platelets is still unclear [46]. In fact, most studies of TRPC function have found many controversies, suggesting a complex regulation of these channels and a heterogeneous function in many cell types. This situation indicates that TRP function should be studied more in detail. We have used a different murine transgenic model lacking TRPC6 to study its function platelet Ca^{2+} homeostasis.

Three different groups have studied TRPC6 function in platelets using knockout transgenic murine models, and one of them showed experimental data concerning basal $[Ca^{2+}]_c$ at resting conditions [38,44,45]. Ramanathan *et al.* showed a non statistically significant decrease of basal Ca^{2+} in platelets isolated from a different TRPC6-deficient mouse strain at resting conditions [38]. Our results show a significant 18.73% decreased $[Ca^{2+}]_c$ in platelets lacking TRPC6 at resting conditions (Fig. 1E). These differences could be explained by different reasons: 1) The

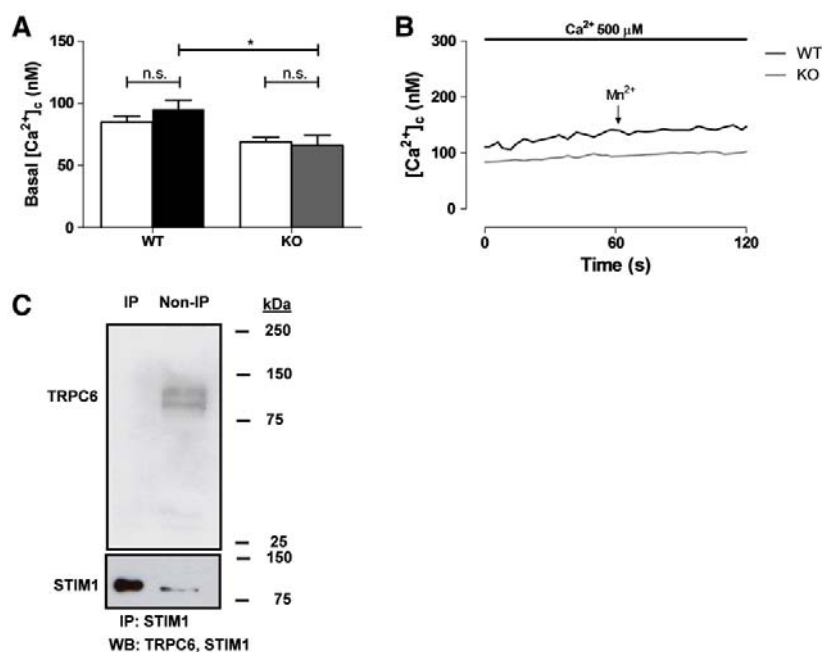


Fig. 3. Ca^{2+} entry by TRPC6 is not involved in the control of basal $[Ca^{2+}]_i$. (A) Histograms representing basal $[Ca^{2+}]_i$ values from isolated resting WT (black) and KO (grey) platelets in the presence of 500 μM extracellular Ca^{2+} , as compared to values obtained in the presence of 75 μM EGTA already shown in Fig. 1E (open bars), expressed as mean $[Ca^{2+}]_i \pm SEM$ ($n = 5$); * $P < 0.05$, not significant (n.s.), Student's t -test. (B) Representative traces of basal $[Ca^{2+}]_i$ records from isolated resting WT (black) and KO (grey) platelets in the presence of 500 μM extracellular Ca^{2+} before and after addition of 50 μM manganese (Mn^{2+}) ($n = 4$). (C) Western blot of total cellular protein lysates extracted from WT platelets. Left lane represents the protein fraction coimmunoprecipitated with an anti-STIM1 antibody (IP). Right lane contains the 5% total volume of the remaining non-coimmunoprecipitated protein fraction (Non-IP). TRPC6 expression was detected with an anti-TRPC6 antibody ($n = 3$).

intrinsic variance generated by the different genetic background existing between both murine strains used in both reports. This research group used a murine model bearing a silenced TRPC6 allele generated by insertion of a selection cassette that replaced the exon 7, while our murine model equally silences TRPC6 but by insertion of the selection cassette into the exon 4; 2) The different protocols used by both groups before Ca^{2+} measurements. Blood platelet isolation requires total absence of extracellular Ca^{2+} in order to prevent spontaneous platelet activation. Thus, platelets are routinely isolated in the absence of extracellular Ca^{2+} . However, this condition might have an impact in platelet Ca^{2+} homeostasis since there is evidence that the extracellular Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_o$) might condition TRPC6 activity [47,48]. Moreover, extracellular Ca^{2+} -sensing receptor (CaR, also known as CASR) has been found expressed in platelets [49]. CaR is a surface receptor sensitive to $[Ca^{2+}]_o$, and it has been found linked to TRPC6 activity in rat neonatal ventricular myocytes [50]. In order to prevent altered platelet function due to the absence of extracellular Ca^{2+} during the isolation procedure, we previously incubated platelets in the presence of 50 μM extracellular Ca^{2+} for 5 min at 37 °C before any experiment, which is enough to prevent spontaneous platelet activation, to avoid any alteration in TRPC6 activity and to allow the compensation of possible intracellular Ca^{2+} loss during the isolation process. We additionally prevented further stimulation of Ca^{2+} entry promoted by spontaneous release of second wave agonists, such as thromboxane and ADP, by addition of inhibitors such as the cyclooxygenase inhibitor acetylsalicylic acid and apyrase, respectively. These protocol differences used as compared to Ramanathan *et al.*, together with a suitable increase of number of experiments ($n \geq 26$) used due to the small differences found in basal $[Ca^{2+}]_i$ among KO and WT platelets, might explain these slight differences observed in our study.

Our results indicate the presence of TRPC6 both in the plasma membrane and internal organelles. The fact that similar resting $[Ca^{2+}]_i$ were found in the absence and presence of extracellular Ca^{2+} indicates that the plasma membrane pool of TRPC6 is not involved in the attenuated

basal $[Ca^{2+}]_i$ observed in KO platelets, being this attributed to the TRPC6 expressed in internal stores. This statement is also based on the reduced Ca^{2+} leakage rate from the agonist-sensitive stores observed in KO mice as compared to WT mice. Since the different Ca^{2+} leak rate was estimated upon inhibition of SERCA, our results indicate that TRPC6 is located in agonist-sensitive intracellular stores. The presence of TRPC6 in ER-enriched membrane fractions after subcellular fractionation, which is negative for the plasma membrane marker PMCA, indicated that this intracellular population is most likely located in the ER.

Thus, our results indicate that TRPC6 might have a basal activity in resting platelets and suggest that TRPC6 might have a function in basal $[Ca^{2+}]_i$ regulation. Previous evidence found by other groups supports this idea. For instance, a certain TRPC6 basal activity has been reported by whole cell patch clamp in HEK 293 resting cells [51]. The research work also demonstrated that the N -linked glycosylation of TRPC6, which is a mechanism implicated in correct protein folding, is mostly responsible of this tightly basal TRPC6 activity regulation, since removal of glycosylation sites by point mutations greatly increases its basal activity. Another study performed in native rabbit mesenteric artery vascular smooth muscle cells (VSMCs) showed that TRPC6 function depends on $[Ca^{2+}]_i$ [52]. Patch clamp records showed that angiotensin II-induced TRPC6 activity increased five-fold in the presence of the intracellular Ca^{2+} chelator BAPTA compared to untreated cells, while increased $[Ca^{2+}]_i$ inhibited angiotensin II-induced TRPC6 channel activity in inside-out patches, demonstrating that TRPC6 activity is sensitive to $[Ca^{2+}]_i$ as it should be expected for a mechanism involved in basal $[Ca^{2+}]_i$ regulation. Calmodulin (CaM) has been shown to interact and negatively regulate TRPC6 [53–55]. This interaction depends on $[Ca^{2+}]_i$, since high concentrations promote CaM–TRPC6 interactions [56].

In summary, our results provide for the first time evidence for a role of TRPC6 in the maintenance of resting $[Ca^{2+}]_i$ as a leak channel most likely located in agonist-sensitive intracellular Ca^{2+} compartments.

Conflict of interest

Authors declare no conflicts of interest, financial or otherwise.

Acknowledgments

We Thank Dr. Robert Driscoll for proofreading of the manuscript. MICINN (BFU2010-21043-C02-01), Junta de Extremadura-FEDER (grant GR10010), and Fundesalud (PRIS11035) supported this study. A. L. was supported by MEC fellowship BES-2011-043356. B-E. A. was supported by the University of Extremadura (D-01). D. N. held a fellowship from Junta de Extremadura (PRE09020). L. E. held a fellowship from MEC-Carlos III Health Institute (FI10/00573). The B6;129P2-Trpc6^{-tm1Dgen}/H mice were obtained from the European Mouse Mutant Archive (www.emmanet.org). Financial support obtained from the Wellcome trust was used to archive the strain. Mouse contract services were provided by the Mary Lyon Centre at MRC Harwell (<http://www.har.mrc.ac.uk>).

References

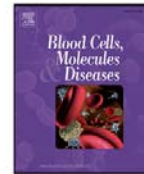
- [1] M.J. Berridge, M.D. Bootman, H.L. Roderick, Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4 (2003) 517–529.
- [2] D. Stegner, B. Nieswandt, Platelet receptor signaling in thrombus formation. *J. Mol. Med. (Berl)* 89 (2011) 109–121.
- [3] J.A. Rosado, Acidic Ca²⁺ stores in platelets. *Cell Calcium* 50 (2011) 168–174.
- [4] N. Dionisio, P.C. Redondo, I. Jardin, J.A. Rosado, Transient receptor potential channels in human platelets: expression and functional role. *Curr. Mol. Med.* 12 (2012) 1319–1328.
- [5] E. Lopez, G.M. Salido, J.A. Rosado, A. Berna-Ero, Unraveling STIM2 function. *J. Physiol. Biochem.* 68 (2012) 619–633.
- [6] S.R. Hassock, M.X. Zhu, C. Trost, V. Flockerzi, K.S. Authi, Expression and role of TRPC proteins in human platelets: evidence that TRPC6 forms the store-independent calcium entry channel. *Blood* 100 (2002) 2801–2811.
- [7] T. Hofmann, A.G. Obukhov, M. Schaefer, C. Harteneck, T. Gudermann, G. Schultz, Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 397 (1999) 259–263.
- [8] B. Lintschinger, M. Balzer-Geldsetzer, T. Baskaran, W.F. Graier, C. Romanin, M.X. Zhu, K. Groschner, Coassembly of Trp1 and Trp3 proteins generates diacylglycerol- and Ca²⁺-sensitive cation channels. *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 27799–27805.
- [9] N. Damann, G. Owsianik, S. Li, C. Poll, B. Nilius, The calcium-conducting ion channel transient receptor potential canonical 6 is involved in macrophage inflammatory protein-2-induced migration of mouse neutrophils. *Acta Physiol. (Oxf.)* 195 (2009) 3–11.
- [10] S. Sel, B.R. Rost, A.O. Yildirim, B. Sel, H. Kalwa, H. Fehrenbach, H. Renz, T. Gudermann, A. Dietrich, Loss of classical transient receptor potential 6 channel reduces allergic airway response. *Clin. Exp. Allergy* 38 (2008) 1548–1558.
- [11] J. Zhou, W. Du, K. Zhou, Y. Tai, H. Yao, Y. Jia, Y. Ding, Y. Wang, Critical role of TRPC6 channels in the formation of excitatory synapses. *Nat. Neurosci.* 11 (2008) 741–743.
- [12] D. Beis, R.K. Schwarting, A. Dietrich, Evidence for a supportive role of classical transient receptor potential 6 (TRPC6) in the exploration behavior of mice. *Physiol. Behav.* 102 (2011) 245–250.
- [13] M. Tauseef, N. Knezevic, K.R. Chava, M. Smith, S. Sukriti, N. Gianaris, A.G. Obukhov, S.M. Vogel, D.E. Schraufnagel, A. Dietrich, L. Birnbaumer, A.B. Malik, D. Mehta, TLR4 activation of TRPC6-dependent calcium signaling mediates endotoxin-induced lung vascular permeability and inflammation. *J. Exp. Med.* 209 (2012) 1953–1968.
- [14] Y. Ding, A. Winters, M. Ding, S. Graham, I. Akopova, S. Muallem, Y. Wang, J.H. Hong, Z. Gryczynski, S.H. Yang, L. Birnbaumer, R. Ma, Reactive oxygen species-mediated TRPC6 protein activation in vascular myocytes, a mechanism for vasoconstrictor-regulated vascular tone. *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 31799–31809.
- [15] B. Fuchs, M. Rupp, H.A. Ghofrani, R.T. Schermuly, W. Seeger, F. Grimminger, T. Gudermann, A. Dietrich, N. Weissmann, Diacylglycerol regulates acute hypoxic pulmonary vasoconstriction via TRPC6. *Respir. Res.* 12 (2011) 20.
- [16] A.E. Loot, I. Fleming, Cytochrome P450-derived epoxyeicosatrienoic acids and pulmonary hypertension: central role of transient receptor potential C6 channels. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 57 (2011) 140–147.
- [17] M. Klaiber, M. Kruse, K. Volker, J. Schroter, R. Feil, M. Freichel, A. Gerling, S. Feil, A. Dietrich, J.E. Londono, H.A. Baba, J. Abramowitz, L. Birnbaumer, J.M. Penninger, O. Pongs, M. Kuhn, Novel insights into the mechanisms mediating the local antihypertrophic effects of cardiac atrial natriuretic peptide: role of cGMP-dependent protein kinase and RGS2. *Basic Res. Cardiol.* 105 (2010) 583–595.
- [18] N. Weissmann, A. Dietrich, B. Fuchs, H. Kalwa, M. Ay, R. Dumitrescu, A. Olschewski, U. Storch, M. Mederos y Schnitzler, H.A. Ghofrani, R.T. Schermuly, O. Pinkenburg, W. Seeger, F. Grimminger, T. Gudermann, Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 19093–19098.
- [19] A. Dietrich, Y.S.M. Mederos, M. Gollasch, V. Gross, U. Storch, G. Dubrovskaya, M. Obst, E. Yildirim, B. Salanova, H. Kalwa, K. Essin, O. Pinkenburg, F.C. Luft, T. Gudermann, L. Birnbaumer, Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6^{-/-} mice. *Mol. Cell Biol.* 25 (2005) 6980–6989.
- [20] V.V. Tsvilovskyy, A.V. Zholos, T. Aberle, S.E. Philipp, A. Dietrich, M.X. Zhu, L. Birnbaumer, M. Freichel, V. Flockerzi, Deletion of TRPC4 and TRPC6 in mice impairs smooth muscle contraction and intestinal motility in vivo. *Gastroenterology* 137 (2009) 1415–1424.
- [21] J. Eckel, P.J. Lavin, E.A. Finch, N. Mukerji, J. Burch, R. Gbadegesin, G. Wu, B. Bowling, A. Byrd, G. Hall, M. Sparks, Z.S. Zhang, A. Homstad, L. Barisoni, L. Birbaumer, P. Rosenberg, M.P. Winn, TRPC6 enhances angiotensin II-induced albuminuria. *J. Am. Soc. Nephrol.* 22 (2011) 526–535.
- [22] G. Tolhurst, R.N. Carter, S. Amisten, J.P. Holdich, D. Erlinge, M.P. Mahaut-Smith, Expression profiling and electrophysiological studies suggest a major role for Orai1 in the store-operated Ca²⁺ influx pathway of platelets and megakaryocytes. *Platelets* 19 (2008) 308–313.
- [23] D. Varga-Szabo, K.S. Authi, A. Braun, M. Bender, A. Ambily, S.R. Hassock, T. Gudermann, A. Dietrich, B. Nieswandt, Store-operated Ca²⁺ entry in platelets occurs independently of transient receptor potential (TRP) C1. *Pflügers Arch.* 457 (2008) 377–387.
- [24] R.N. Carter, G. Tolhurst, G. Walmsley, M. Vizuete-Forster, N. Miller, M.P. Mahaut-Smith, Molecular and electrophysiological characterization of transient receptor potential ion channels in the primary murine megakaryocyte. *J. Physiol.* 576 (2006) 151–162.
- [25] S.O. Sage, S.L. Brownlow, J.A. Rosado, TRP channels and calcium entry in human platelets. *Blood* 100 (2002) 4245–4246 (author reply 4246–4247).
- [26] E. den Dekker, D.G. Molin, G. Breikers, R. van Oerle, J.W. Akkerman, G.J. van Eys, J.W. Heemskerk, Expression of transient receptor potential mRNA isoforms and Ca²⁺ influx in differentiating human stem cells and platelets. *Biochim. Biophys. Acta* 1539 (2001) 243–255.
- [27] I. Jardin, P.C. Redondo, G.M. Salido, J.A. Rosado, Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate enhances store-operated calcium entry through hTRPC6 channel in human platelets. *Biochim. Biophys. Acta* 1783 (2008) 84–97.
- [28] S.L. Brownlow, S.O. Sage, Transient receptor potential protein subunit assembly and membrane distribution in human platelets. *Thromb. Haemost.* 94 (2005) 839–845.
- [29] I. Wakabayashi, M. Marumo, A. Graziani, M. Poteser, K. Groschner, TRPC4 expression determines sensitivity of the platelet-type capacitative Ca²⁺ entry channel to intracellular alkalosis. *Platelets* 17 (2006) 454–461.
- [30] J.A. Rosado, S.O. Sage, Coupling between inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and human transient receptor potential channel 1 when intracellular Ca²⁺ stores are depleted. *Biochem. J.* 350 (Pt 3) (2000) 631–635.
- [31] I. Jardin, J.J. Gomez, G.M. Salido, J.A. Rosado, Dynamic interaction of hTRPC6 with the Orai1-STIM1 complex or hTRPC3 mediates its role in capacitative or non-capacitative Ca²⁺ entry pathways. *Biochem. J.* 420 (2009) 267–276.
- [32] P. Bugert, H. Kluter, Profiling of gene transcripts in human platelets: an update of the platelet transcriptome. *Platelets* 17 (2006) 503–504.
- [33] A.G. Harper, S.L. Brownlow, S.O. Sage, A role for TRPV1 in agonist-evoked activation of human platelets. *J. Thromb. Haemost.* 7 (2009) 330–338.
- [34] F.R. Saavedra, P.C. Redondo, J.M. Hernandez-Cruz, G.M. Salido, J.A. Pariente, J.A. Rosado, Store-operated Ca²⁺ entry and tyrosine kinase pp60(src) hyperactivity are modulated by hyperglycemia in platelets from patients with non insulin dependent diabetes mellitus. *Arch. Biochem. Biophys.* 432 (2004) 261–268.
- [35] G. Grynkiewicz, M. Poenie, R.Y. Tsien, A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 3440–3450.
- [36] I. Jardin, N. Ben Amor, A. Bartegi, J.A. Pariente, G.M. Salido, J.A. Rosado, Differential involvement of thrombin receptors in Ca²⁺ release from two different intracellular stores in human platelets. *Biochem. J.* 401 (2007) 167–174.
- [37] J.J. Lopez, C. Camello Almaraz, J.A. Pariente, G.M. Salido, J.A. Rosado, Ca²⁺ accumulation into acidic organelles mediated by Ca²⁺ and vacuolar H⁺-ATPases in human platelets. *Biochem. J.* 390 (2005) 243–252.
- [38] G. Ramanathan, S. Gupta, I. Thielmann, I. Pleines, D. Varga-Szabo, F. May, C. Mannhalter, A. Dietrich, B. Nieswandt, A. Braun, Defective diacylglycerol-induced Ca²⁺ entry but normal agonist-induced activation responses in TRPC6 deficient mouse platelets. *J. Thromb. Haemost.* 10 (2012) 419–429.
- [39] S. Cayouette, M.P. Lussier, E.L. Mathieu, S.M. Bousquet, G. Boulay, Exocytotic insertion of TRPC6 channel into the plasma membrane upon Gq protein-coupled receptor activation. *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 7241–7246.
- [40] S. Cayouette, S.M. Bousquet, N. Francoeur, E. Dupre, M. Monet, H. Gagnon, Y.B. Guedri, C. Lavoie, G. Boulay, Involvement of Rab9 and Rab11 in the intracellular trafficking of TRPC6. *Biochim. Biophys. Acta* 1803 (2010) 805–812.
- [41] I. Jardin, J.J. Lopez, G.M. Salido, J.A. Rosado, Functional relevance of the de novo coupling between hTRPC1 and type II IP3 receptor in store-operated Ca²⁺ entry in human platelets. *Cell. Signal.* 20 (2008) 737–747.
- [42] Y. Liao, C. Exleben, E. Yildirim, J. Abramowitz, D.L. Armstrong, L. Birnbaumer, Orai proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 4682–4687.
- [43] S. Brechard, C. Melchior, S. Plancon, V. Schenten, E.J. Tschirhart, Store-operated Ca²⁺ channels formed by TRPC1, TRPC6 and Orai1 and non-store-operated channels formed by TRPC3 are involved in the regulation of NADPH oxidase in HL-60 granulocytes. *Cell Calcium* 44 (2008) 492–506.
- [44] E.V. Paez Espinosa, J.P. Murad, H.J. Ting, F.T. Khasawneh, Mouse transient receptor potential channel 6: role in hemostasis and thrombogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417 (2012) 853–856.
- [45] M.T. Harper, J.E. Londono, K. Quick, J.C. Londono, V. Flockerzi, S.E. Philipp, L. Birnbaumer, M. Freichel, A.W. Poole, Transient receptor potential channels function as a coincidence signal detector mediating phosphatidylserine exposure. *Sci. Signal.* 6 (2013) ra50.
- [46] K.S. Authi, TRP channels in platelet function. *Handb. Exp. Pharmacol.* (2007) 425–443.

- [47] S. Jung, R. Strotmann, G. Schultz, T.D. Plant, TRPC6 is a candidate channel involved in receptor-stimulated cation currents in A7r5 smooth muscle cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282 (2002) C347–C359.
- [48] J. Shi, E. Mori, Y. Mori, M. Mori, J. Li, Y. Ito, R. Inoue, Multiple regulation by calcium of murine homologues of transient receptor potential proteins TRPC6 and TRPC7 expressed in HEK293 cells, *J. Physiol.* 561 (2004) 415–432.
- [49] M.G. House, L. Kohlmeier, N. Chatopadhyay, O. Kifor, T. Yamaguchi, M.S. Leboff, J. Glowacki, E.M. Brown, Expression of an extracellular calcium-sensing receptor in human and mouse bone marrow cells, *J. Bone Miner. Res.* 12 (1997) 1959–1970.
- [50] Y.H. Sun, Y.Q. Li, S.L. Feng, B.X. Li, Z.W. Pan, C.Q. Xu, T.T. Li, B.F. Yang, Calcium-sensing receptor activation contributed to apoptosis stimulates TRPC6 channel in rat neonatal ventricular myocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 394 (2010) 955–961.
- [51] A. Dietrich, M. Mederos y Schnitzler, J. Emmel, H. Kalwa, T. Hofmann, T. Gudermann, N-linked protein glycosylation is a major determinant for basal TRPC3 and TRPC6 channel activity, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 47842–47852.
- [52] J. Shi, M. Ju, S.N. Saleh, A.P. Albert, W.A. Large, TRPC6 channels stimulated by angiotensin II are inhibited by TRPC1/C5 channel activity through a Ca²⁺- and PKC dependent mechanism in native vascular myocytes, *J. Physiol.* 588 (2010) 3671–3682.
- [53] G. Boulay, Ca²⁺-calmodulin regulates receptor-operated Ca²⁺ entry activity of TRPC6 in HEK-293 cells, *Cell Calcium* 32 (2002) 201–207.
- [54] E. Friedlova, L. Grycova, B. Holakovska, J. Silhan, H. Janouskova, M. Sulc, V. Obsilova, T. Obsil, J. Teisinger, The interactions of the C-terminal region of the TRPC6 channel with calmodulin, *Neurochem. Int.* 56 (2010) 363–366.
- [55] Y. Kwon, T. Hofmann, C. Montell, Integration of phosphoinositide- and calmodulin-mediated regulation of TRPC6, *Mol. Cell* 25 (2007) 491–503.
- [56] N. Dionisio, L. Albarran, A. Berna-Erro, J.M. Hernandez-Cruz, G.M. Salido, J.A. Rosado, Functional role of the calmodulin- and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-binding (CIRB) site of TRPC6 in human platelet activation, *Cell. Signal.* 23 (2011) 1850–1856.



Contents lists available at ScienceDirect

Blood Cells, Molecules and Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bcmd

The canonical transient receptor potential 6 (TRPC6) channel is sensitive to extracellular pH in mouse platelets



Alejandro Berna-Erro, Letizia Albarran, Natalia Dionisio, Pedro C. Redondo, Nieves Alonso, Luis J. Gomez, Gines M. Salido, Juan A. Rosado*

Department of Physiology (Cell Physiology Research Group), University of Extremadura, 10003 Cáceres, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Submitted 25 July 2013

Available online 25 September 2013

(Communicated by B. Collier, M.D.,
20 August 2013)

Keywords:

TRPC6
Mouse platelets
Calcium
Aggregation
pH
OAG

ABSTRACT

The canonical transient receptor potential-6 (TRPC6) is a receptor-activated non-selective Ca^{2+} channel regulated by a variety of modulators such as diacylglycerol, Ca^{2+} /calmodulin or phosphorylation. The present study is aimed to investigate whether different situations, such as acidic pH, exposure to reactive oxygen species (ROS) or hypoxic-like conditions modulate TRPC6 channel function. Here we show normal aggregation and Ca^{2+} mobilization stimulated by thrombin in TRPC6 KO platelets; however, OAG (1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol)-evoked Ca^{2+} entry was attenuated in the absence of TRPC6. Exposure of mouse platelets to acidic pH resulted in abolishment of thrombin-evoked aggregation and attenuated platelet aggregation induced by thapsigargin (TG) or OAG. Both OAG-induced Ca^{2+} entry and platelet aggregation were greatly attenuated in cells expressing TRPC6 channels. Exposure of platelets to H_2O_2 or deferoxamine did not clearly alter thrombin, TG or OAG-induced platelet aggregation. Our results indicate that TRPC6 is sensitive to acidic pH but not to exposure to ROS or hypoxic-like conditions, which might be involved in the pathogenesis of the altered platelet responsiveness to DAG-generating agonists in disorders associated to acidic pH.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

The canonical transient receptor potential-6 (TRPC6) is a receptor-activated Ca^{2+} -permeable non-selective cation channel that belongs to the TRPC subfamily. TRPC6 has been found to be expressed in a variety of cells and tissues including brain, smooth muscle, platelets, leukocytes and kidney [1–3]. Given the specific expression of TRPC6, this channel has been presented as a candidate to play relevant physiological roles. Studies performed in TRPC6 KO mice have revealed that this channel is involved in the regulation of vascular smooth muscle contraction [4]. In the kidney, TRPC6 has been found to be associated with the slit diaphragm of podocytes and a gain-of-function TRPC6 mutation is linked to familial focal segmental glomerulosclerosis [5].

TRPC6 channels are directly activated by the second messenger diacylglycerol (DAG) although they have also been found to be regulated by intracellular Ca^{2+} store depletion [2,6]. Furthermore, TRPC6 function has been reported to be modulated by tyrosine or serine phosphorylation as well as by Ca^{2+} /calmodulin which enhances the channel activity [7]. Consistent with the property of TRPC6 as a DAG-activated non-capacitative Ca^{2+} entry, this channel has been found to be associated with TRPC3 in plasma membrane regions independently of lipid rafts, where the proteins involved in the capacitative Ca^{2+} entry signalplex

are located [8,9]. However, upon intracellular Ca^{2+} store depletion, TRPC6 dissociates with TRPC3 and interacts with STIM1, Orai1 and TRPC1, thus suggesting that TRPC6 acts as a point of convergence between capacitative and non-capacitative Ca^{2+} entry pathways in human platelets [10–12]. The C-terminal calmodulin- and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-binding site has been found to play an important role in the regulation of TRPC6-mediated Ca^{2+} entry and platelet aggregation induced by thrombin, thus suggesting that this channel plays a functional role in these cells [13].

In mouse platelets, TRPC6 mediates DAG-induced Ca^{2+} influx and exerts a relevant role in the maintenance of Ca^{2+} homeostasis (Albarran et al., unpublished results). The role of TRPC6 in mouse platelet aggregation and hemostasis remains controversial with studies suggesting a lack of relevant role [14] and others reporting a prolonged bleeding time and increased time for occlusion of injured carotid artery in TRPC6 KO mice as compared to their wild-type littermates [15]. Previous studies have suggested that while Orai1 activity is inhibited by oxidative conditions, TRPC6 is activated by reactive oxygen species (ROS) [16,17]. In matured lymphocytes, Orai1 is replaced by ROS-insensitive Orai3 to presumably avoid an attenuation of lymphocyte activity in oxidative inflamed tissues. It has been also suggested that Orai1 is sensitive to pH and its activity is reduced at low pH conditions [18]. Orai1 and TRPC6 have been considered the main channels involved in capacitative and non-capacitative Ca^{2+} influx, respectively [14,19]. Thus, it is reasonable to study whether TRPC6 represents an alternative pathway for Ca^{2+} entry in case of attenuated Orai1 activity

* Corresponding author at: Department of Physiology, University of Extremadura, Av. Universidad s/n, Cáceres 10003, Spain. Fax: +34 927 257110.
E-mail address: jarosado@unex.es (J.A. Rosado).

that might happen during oxidative or acidic pH conditions [20] and gastroduodenal mucosal hemorrhage [23], or diseases such as metabolic syndrome [21], massive bleeding [22] and diabetes [24]. In the present

study we have investigated the effect of pH and reactive oxygen species on TRPC6 channel function in mouse platelets and its possible relevance in platelet function.

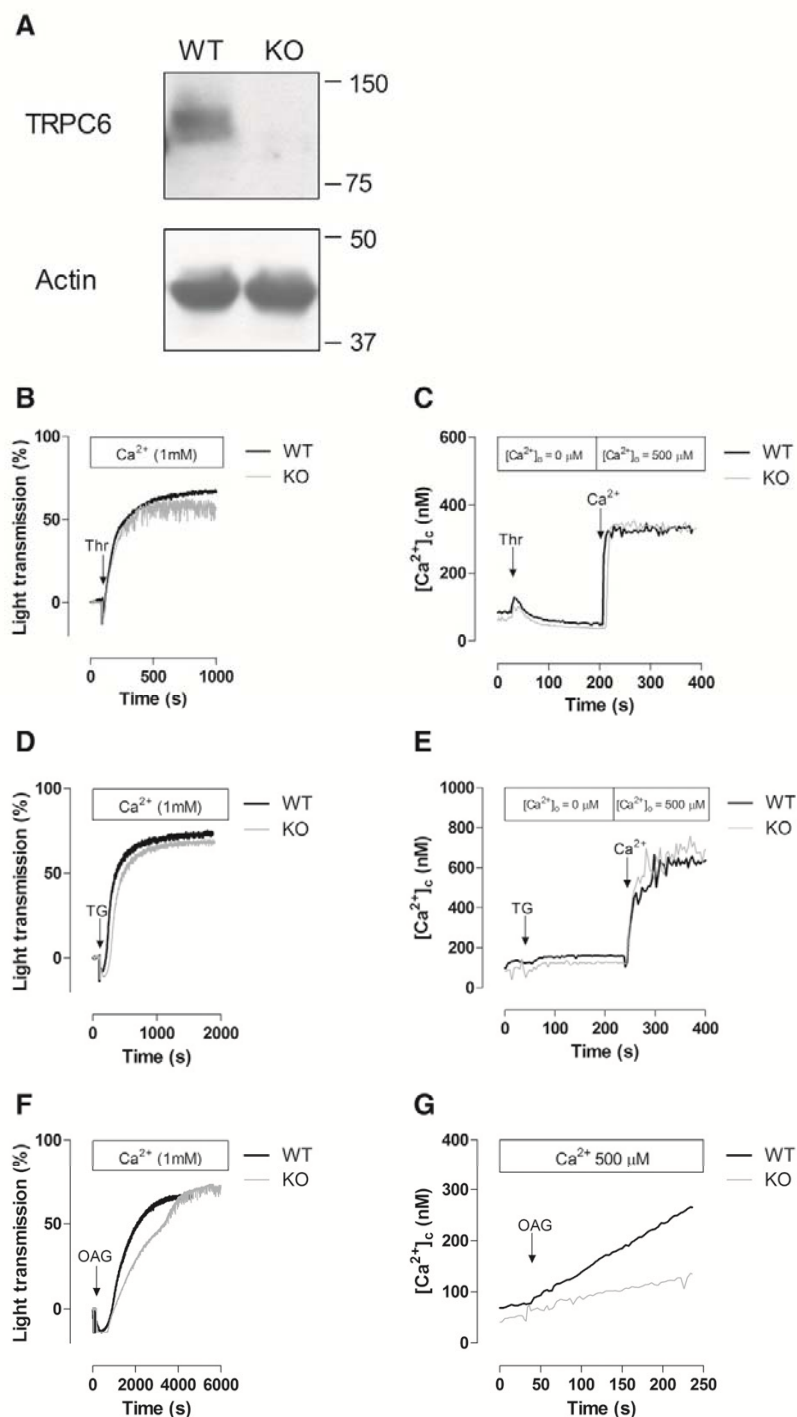


Fig. 1. Analysis of aggregation and $[Ca^{2+}]_c$ changes in WT and TRPC6 KO platelets at pH 7.13. (A) Western blot analysis of TRPC6 protein expression in platelets isolated from WT and KO mice as compared to β -actin (actin). Representative aggregometry of isolated WT (black) and TRPC6 KO (gray) platelets stimulated with 0.1 U/mL thrombin (Thr) (B), 1 μ M TG (D) or 100 μ M OAG (F) in the presence of 1 mM extracellular Ca^{2+} . Analysis of $[Ca^{2+}]_c$ changes and intracellular Ca^{2+} mobilization in isolated WT and KO platelets loaded with fura-2. Representative $[Ca^{2+}]_c$ traces from isolated WT (black) and KO (gray) platelets stimulated with 0.1 U/mL Thr (C) or 1 μ M TG (E) or with 100 μ M OAG in the presence of 500 μ M extracellular Ca^{2+} (G).

Materials and methods

Materials

OAG, apyrase (grade VII), acetylsalicylic acid, anti-actin polyclonal antibody, bovine serum albumin (BSA), calcium chloride, citric acid, ethyleneglycol-bis(β-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), glucose, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), sodium citrate, thapsigargin (TG), thrombin, Trizma® hydrochloride and Trizma® base were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid). Isoflurane (ISOFLO®) was purchased from Esteve Veterinaria (Barcelona, Spain). Complete EDTA-free protease inhibitor tablets were purchased from Roche Pharma AG (Germany). Rabbit anti-mTRPC6 polyclonal antibody was purchased from Alomone Labs (Jerusalem, Israel). Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG antibody was purchased from Jackson ImmunoResearch (PA, U.S.A.). Hyperfilm ECL was from Amersham (Buckinghamshire, U.K.). Enhanced chemiluminescence detection reagents and rabbit anti-mouse IgG were from Pierce (Cheshire, U.K.). Western blot nitrocellulose membranes were purchased from Bio-Rad Laboratories (CA, U.S.A.). All other analytical grade reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid).

Animals

TRPC6-deficient (TRPC6 KO) and wild type (WT) mice were purchased from Deltagen, Inc. (San Mateo, CA) through the European Mouse Mutant Archive (EMMA) network (B6;129P2-Trpc6^{tm1Dgen}/H; http://www.emmanet.org/deltagen/DELTA_GEN_T881/). Briefly, murine TRPC6 allele expression was disrupted by substitution of 13 nucleotides located into the exon four (E4) with a selection cassette containing an internal ribosome entry site, β-galactosidase and the neomycin resistant gene. Chimeric mice were backcrossed with C56Bl6 mice to obtain the first generation of heterozygous mice, which were subsequently intercrossed to obtain homozygous mice for the Trpc6-null allele. All experiments were conducted on mice between 8 and 12 weeks of age. Experiments involving animals were conducted in accordance with the regulations of the local authorities and were approved by the Local Ethical Committee.

Platelet preparation

Mice were bled from the retroorbital plexus under isoflurane anesthesia according to the recommendations of the Local Ethical Committee.

Blood was collected into an Eppendorf tube containing 300 μL acid citrate dextrose buffer (ACD, 85 mM sodium citrate, 78 mM citric acid, 111 mM glucose, pH 7.3). Blood was centrifuged in a Galaxy 7D centrifuge (VWR International, PA, U.S.A.) at 300 ×g for 5 min. The supernatant was centrifuged again at 100 ×g for 5 min to obtain platelet rich plasma (prp). Prp was centrifuged at 600 ×g for 5 min in the presence of acetylsalicylic acid (0.1 μg/mL) and the pellet was resuspended in Ca²⁺-free Tyrode's buffer (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, NaHCO₃ 12 mM, NaH₂PO₄ 0.43 mM, glucose 0.1%, HEPES 5 mM, BSA 0.35%, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 7.13) containing apyrase (40 μg/mL).

Western blotting

Western blotting was performed as described previously [10]. Briefly, total protein lysates were separated in 8% SDS-PAGE gels and electrophoretically transferred onto nitrocellulose membranes for subsequent probing. Blots were blocked with 5% (w/v) BSA in tris-buffered saline (0.05 M Trizma Base, 0.9% NaCl, pH 8.4) with 0.1% Tween 20 (TBST) overnight. Immunodetection of TRPC6 was achieved using the specific anti-TRPC6 antibody diluted 1:1000 for 2 h at room temperature. Blots were washed three times for 5 min in TBST, subsequently incubated with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody diluted 1:10,000 in TBST for 45 min at room temperature, and then exposed to enhanced chemiluminescence reagents for 4 min. Blots were then exposed to X-ray films.

Platelet aggregation

Platelets were isolated from blood and washed as described above. Washed platelets were resuspended in Tyrode's buffer and adjusted to a concentration of 1 × 10⁸ cells/mL. Aggregation of washed platelets was assessed at 37 °C under stirring conditions at 1200 rpm using a Chronolog aggregometer (Havertown, Pa, U.S.A.) [25]. The amplitude or percentage of aggregation is estimated as the percentage of light transmitted across the platelet suspension as platelet clearance and thrombi formation increases in the presence of agonists. Thus, Tyrode's buffer was set as 100% aggregation, while washed resting platelet suspension was set as 0% aggregation.

Measurement of [Ca²⁺]_i

Washed platelets were loaded with fura-2 by incubation with 2 μM fura-2/AM for 45 min at 37 °C in the absence of extracellular Ca²⁺. Cells were subsequently washed and resuspended in Tyrode's buffer

Table 1
Effect of acidic pH on agonist-induced aggregation in platelets from wild type and TRPC6 KO mice.

	% Aggregation	Rate	Lag time (s)	Shape change time (s)	n
pH 7.13					
WT					
Thr 0.1 U/mL	75.60 ± 4.13	69.80 ± 11.36	5.60 ± 3.36	37.83 ± 6.58	5
OAG 100 μM	87.00 ± 5.09	23.33 ± 5.63	89.00 ± 21.90	916.17 ± 89.09	6
TG 1 μM	81.00 ± 4.11	69.75 ± 18.37	19.00 ± 5.05	96.50 ± 13.14	4
TRPC6 KO					
Thr 0.1 U/mL	73.00 ± 6.20	77.14 ± 6.99	2.86 ± 0.40	40.89 ± 4.38	7
OAG 100 μM	80.50 ± 4.90	20.27 ± 4.25	104.55 ± 12.26	807.50 ± 31.11	11
TG 1 μM	82.11 ± 2.20	75.78 ± 9.06	18.89 ± 2.63	149.33 ± 18.81	9
pH 5.5					
WT					
Thr 0.1 U/mL	4.00 ± 1.55 ^s	1.21 ± 0.45 ^s	42.54 ± 21.19	256.36 ± 113.15	6
OAG 100 μM	25.22 ± 1.92 ^s	13.56 ± 4.01	44.78 ± 8.43 ^s	349.78 ± 76.40 ^s	9
TG 1 μM	26.80 ± 8.95 ^s	22.80 ± 8.32 ^s	48.88 ± 20.71	370.89 ± 167.92	10
TRPC6 KO					
Thr 0.1 U/mL	4.75 ± 1.58 ^s	3.08 ± 1.63 ^s	66.36 ± 24.73	373.817 ± 124.68 ^s	11
OAG 100 μM	55.42 ± 6.80 ^{s*}	14.67 ± 3.18	66.42 ± 15.59	701.33 ± 256.81	12
TG 1 μM	38.78 ± 7.62 ^s	32.17 ± 7.17 ^s	48.00 ± 9.33	195.11 ± 44.26	18

Values are represented as mean ± SEM.
^s P < 0.05 as compared to untreated WT or TRPC6 KO groups.
^{*} P < 0.05 as compared to their respective WT.

containing apyrase (40 µg/mL). Fura-2 was excited at alternate wavelengths of 340 and 380 nm, and the emission fluorescence was recorded at 505 nm from 600 µL aliquots of magnetically stirred cellular suspension at 37 °C using a RF-5301PC spectrophotometer (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Changes in $[Ca^{2+}]_c$ were assessed by the fura-2 340/380 fluorescence ratio according to Grynkiewicz et al. [26]. Thrombin, TG and OAG-induced Ca^{2+} mobilization was estimated using the integral of the rise in $[Ca^{2+}]_c$ for 3 min after their addition taking a sample every 1 s and was expressed as $nM \cdot s$ [27,28].

Statistical analysis

Data are shown as mean ± SEM. Analysis of statistical significance was performed using Student *t*-test. $P < 0.05$ was considered to be significant for a difference.

Results

Response to agonists of platelets from wild type and TRPC6 KO mice at pH 7.13

Stimulation of mouse platelets in the presence of 1 mM extracellular Ca^{2+} at a pH of 7.13 with the physiological agonist thrombin (0.1 U/mL) induces rapid aggregation indicated by a large increase in light transmission (Fig. 1B). In order to investigate the role of TRPC6 in thrombin-induced platelet aggregation, we performed the experiments in TRPC6 KO mouse platelets. Western blot analysis revealed TRPC6 expression in WT mice, but absence in TRPC6 KO platelets (Fig. 1A). As shown in Fig. 1B and Table 1, platelet stimulation with 0.1 U/mL thrombin induced a similar aggregation in TRPC6 KO mice than in WT subjects. Since TRPC6 is a Ca^{2+} -permeable channel, we further explored the effect of TRPC6 in

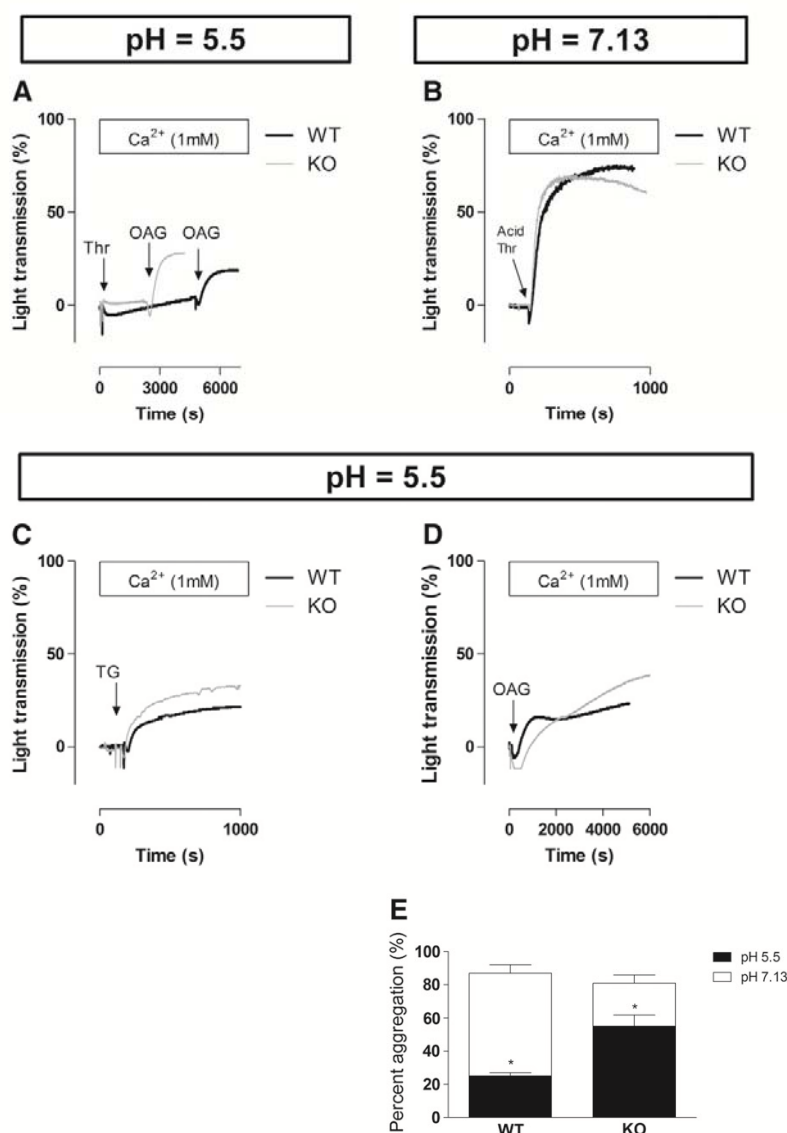


Fig. 2. Effect of acidic pH on agonist-induced aggregation in platelets from WT and TRPC6 KO mice. Platelets from WT (black) and TRPC6 KO (gray) mice were stimulated at pH 5.5 with 0.1 U/mL thrombin (Thr) followed by addition of 100 µM OAG (A), 1 µM TG (C) or 100 µM OAG (D) in the presence of 1 mM extracellular Ca^{2+} , or treated at pH 7.13 with Thr that had been previously suspended in buffer at pH 5.5 (B). Platelet aggregation was determined as described in Materials and methods. Overlapped histograms represent aggregation amplitudes in the presence of OAG expressed as mean ± SEM (E); * $P < 0.05$, Student *t*-test.

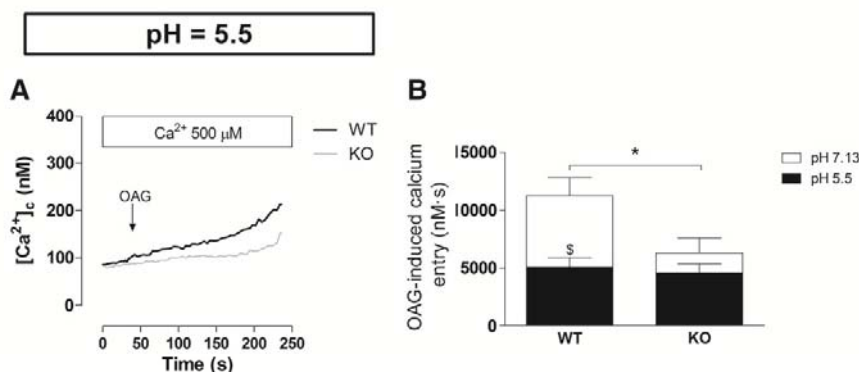


Fig. 3. Effect of acidic pH on OAG-induced Ca^{2+} mobilization in platelets from WT and TRPC6 KO mice. Platelets from WT (black) and TRPC6 KO (gray) mice were stimulated at pH 5.5 with 100 μM OAG in the presence of 500 μM Ca^{2+} (A). Overlapped histograms represent Ca^{2+} mobilization, estimated as described in Materials and methods, at pH 7.13 (white) and pH 5.5 (black), expressed as mean $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (nM·s) \pm SEM (B); * $P < 0.05$ compared to WT, $^{\#}P < 0.05$ compared to untreated cells, Student *t*-test.

thrombin-stimulated Ca^{2+} mobilization. In the absence of external Ca^{2+} (75 μM EGTA added), thrombin induced a transient increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ due to Ca^{2+} release from the intracellular stores. Subsequent readdition of Ca^{2+} to the medium resulted in a rapid increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ indicative of Ca^{2+} influx. As depicted in Fig. 1C, thrombin-evoked Ca^{2+} release and Ca^{2+} entry were similar in platelets from WT and TRPC6 KO mice ($n = 7$; $P > 0.05$).

Thrombin has been reported to activate both capacitative and non-capacitative Ca^{2+} entry [29], and TRPC6 has been found to participate in both Ca^{2+} influx mechanisms in human platelets [11,12]. In order to explore whether TRPC6 is involved in platelet aggregation in response to capacitative and non-capacitative Ca^{2+} entry, we used the classic capacitative Ca^{2+} entry activator, TG, and non-capacitative Ca^{2+} influx activator, OAG [30]. As shown in Fig. 1D and Table 1, platelet treatment with TG (1 μM) resulted in rapid aggregation that was unaltered in platelets from TRPC6 KO mice. Similarly, both Ca^{2+} release and capacitative Ca^{2+} entry induced by TG were found to be comparable in platelets from WT and TRPC6 KO mice ($n = 5$; $P > 0.05$) (Fig. 1E). Interestingly, OAG-mediated Ca^{2+} entry in the presence of 500 μM extracellular Ca^{2+} was found to be significantly greater in platelets from WT mice than in those from TRPC6 KO subjects (Fig. 1G; $n = 6$; $P < 0.05$), thus suggesting that TRPC6 is important for OAG-evoked Ca^{2+} mobilization, although the different Ca^{2+} mobilization was not reflected in an attenuation in OAG-stimulated platelet aggregation (Fig. 1F and Table 1).

Response to agonists of platelets from wild type and TRPC6 KO mice at pH 5.5

We have further explored whether platelet responses are sensitive to acidic pH in mice. At pH 5.5 platelet aggregation stimulated by thrombin was abolished in platelets from WT and TRPC6 KO mice (Fig. 2A and Table 1); subsequent addition of OAG stimulated platelet aggregation, thus indicating that platelets were functional. In order to investigate whether this effect was due to the inactivation of thrombin at pH 5.5 we repeated the experiments using thrombin that had previously been resuspended at pH 5.5 and then added to platelets suspended in Tyrode's buffer at pH 7.13. As depicted in Fig. 2B, stimulation with thrombin previously suspended in acidic medium did not significantly alter platelet aggregation as compared to the treatment with thrombin suspended at pH 7.13 in WT and TRPC6 KO mice (Fig. 1A). TG was also able to induce platelet aggregation (Fig. 2C) although the responses in WT and TRPC6 KO were significantly attenuated as compared with those obtained at pH 7.13 (Fig. 2C and Table 1; $P < 0.05$). These findings suggest that low pH affects either the

thrombin receptors themselves or the immediate signaling mechanisms, since OAG was able to activate aggregation.

Platelet aggregation with OAG was significantly attenuated at pH 5.5 (Fig. 2D and Table 1; $P < 0.05$); however, interestingly, the amplitude of aggregation was found to be significantly greater in platelets from TRPC6 KO mice than in WT (Fig. 2D and E, and Table 1; $P < 0.05$). At pH 5.5, OAG induced a sustained increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ that was found to be significantly attenuated, as compared to the response at pH 7.13, in the case of platelets from WT mice (Fig. 3; $n = 5$; $P < 0.05$) but not in TRPC6 KO mice, where OAG-evoked response was insensitive to the pH change; thus suggesting that TRPC6 might be sensitive to low pH.

Effect of hydrogen peroxide and deferoxamine on agonist induced platelet aggregation in wild type and TRPC6 KO mice

We have previously reported a role for ROS in human platelet function [31–33] and, as previously mentioned, it has been suggested that TRPC6 is activated by ROS [16,17]. Hence, we have explored whether H_2O_2 alters agonist-stimulated platelet aggregation in WT and TRPC6 KO mice in order to ascertain the sensitivity of TRPC6 to ROS. H_2O_2 (10 or 100 μM) was added 1 min before cell stimulation and platelet aggregation was estimated as described in Materials and methods. As shown in Fig. 4A–F and Table 2, treatment of platelets from WT mice with 10 or 100 μM H_2O_2 did not significantly alter either the amplitude, lag-time or the rate of aggregation stimulated with thrombin, TG or OAG, but shortened the shape change time induced by OAG. Similar results were observed in platelets from TRPC6 KO mice, which reported basically the same responses to agonists than those from WT mice. These findings suggest that platelet aggregation is not sensitive to ROS and confirm that TRPC6 is not essential for platelet aggregation in mice.

Since we have reported above that TRPC6 function is affected by acidic pH, which might play a relevant role in OAG-induced platelet aggregation, we have further explored the role of TRPC6 in other pathological situations such as hypoxia. Hypoxic-like conditions could be reproduced by the reduction of bioavailable iron via chelation by deferoxamine, an agent that increases the activity of hypoxia-inducible factors [34,35]. Cells were treated with 100 μM deferoxamine and 10 min later stimulated with thrombin, TG or OAG. As depicted in Fig. 4G–I and Table 2, deferoxamine significantly attenuated TG-induced platelet aggregation but did not significantly alter platelet aggregation induced by thrombin or OAG both in WT and TRPC6 mice.

Discussion

Electrophysiological and pharmacological studies in megakaryocytes stimulated by the physiological agonist ADP have revealed a

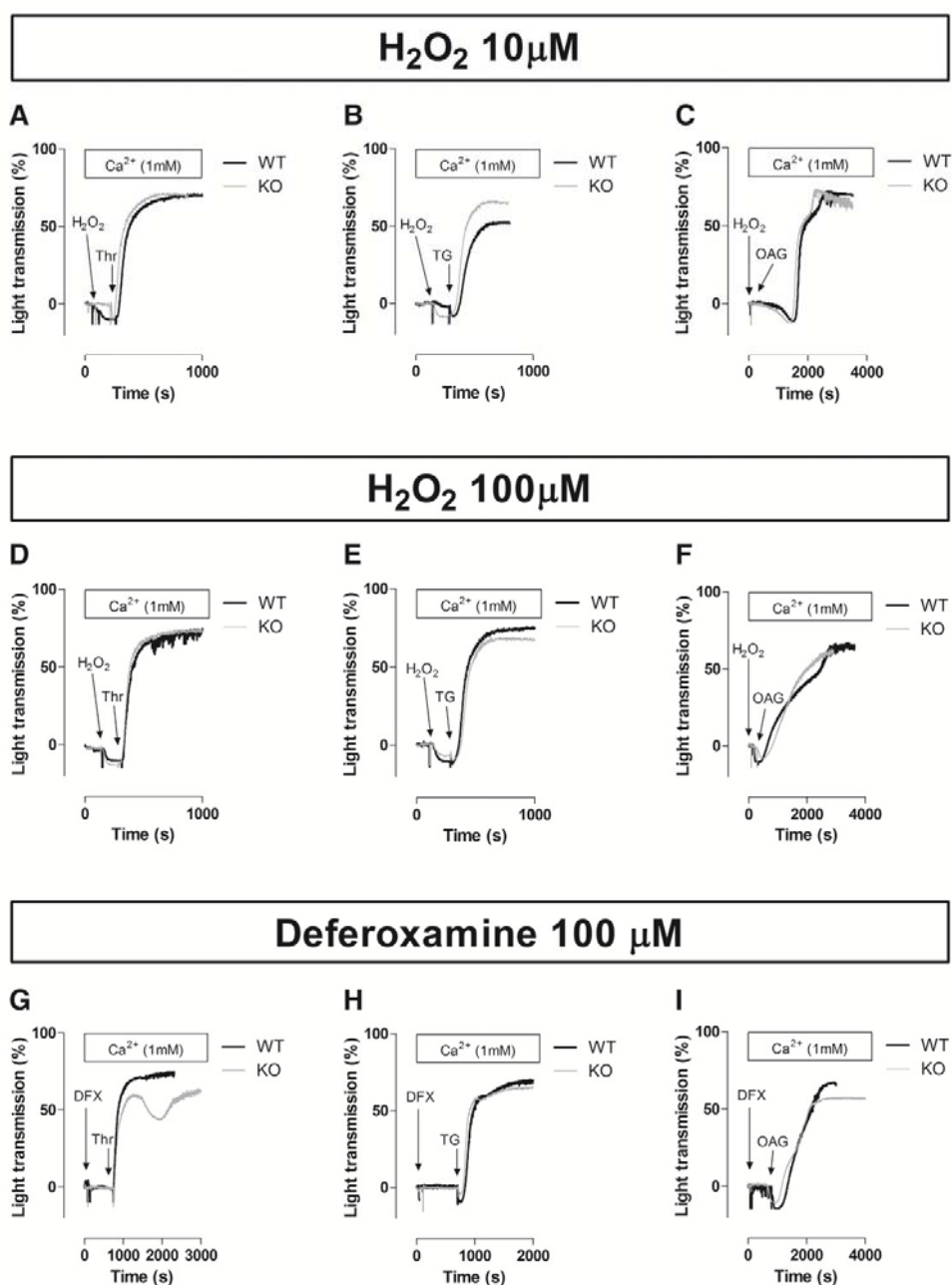


Fig. 4. Effect of hydrogen peroxide and deferoxamine on agonist induced platelet aggregation in wild type and TRPC6 KO mice. Platelets from WT (black) and TRPC6 KO (gray) mice were suspended in buffer at pH 7.13 and treated for 1 min with either 10 μM H_2O_2 , 100 μM H_2O_2 or for 10 min with 100 μM deferoxamine, as indicated. Platelets were then stimulated with 0.1 U/mL thrombin (Thr) (A, D, G), 1 μM TG (B, E, H) or 100 μM OAG (C, F, I) in the presence of 1 mM Ca^{2+} . Aggregation was determined as described in Materials and methods.

major role for TRPC6 in G-protein-coupled receptor-dependent Ca^{2+} influx in these cells [36]. In human platelets, TRPC6 has been reported to be highly expressed as compared to other TRPC channels [37]. Furthermore, TRPC6 has been found to be regulated by phosphorylation mediated by cAMP-dependent protein kinase, which inhibits Ca^{2+} entry induced by the physiological agonist thrombin, while having no effect on cation entry induced by the DAG analog OAG. In addition, TRPC6 has been reported to be regulated by phosphoinositides such as

phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate or phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, which enhance Ca^{2+} influx in human platelets and other cell types through the activation of TRPC6 [2,38].

In the present study we have explored the role of TRPC6 in mouse platelets subjected to different experimental conditions, such as acidic pH, ROS exposure or hypoxic-like situation. Our results indicate that at normal conditions, the expression of TRPC6 is not required for Ca^{2+} mobilization and aggregation induced either by thrombin or TG. However,

Table 2
Effect of H₂O₂ and deferoxamine on agonist-induced aggregation in platelets from wild type and TRPC6 KO mice.

	% Aggregation	Rate	Lag time (s)	Shape change time (s)	n
WT					
Thr	75.60 ± 4.13	69.80 ± 11.36	5.60 ± 3.36	37.83 ± 6.58	6
Thr + H ₂ O ₂ 10 μM	77.33 ± 7.55	91.00 ± 9.46	4.50 ± 0.89	57.33 ± 23.67	6
Thr + H ₂ O ₂ 100 μM	82.00 ± 8.32	97.75 ± 14.19	3.00 ± 1.00	42.00 ± 8.26	4
Thr + Def. 100 μM	83.80 ± 6.09	89.20 ± 9.02	2.40 ± 0.40	21.60 ± 3.91	5
OAG	87.00 ± 5.09	23.33 ± 5.63	89.00 ± 21.90	916.17 ± 89.09	6
OAG + H ₂ O ₂ 10 μM	82.14 ± 6.72	17.14 ± 2.63	96.00 ± 21.18	590.86 ± 92.43 [§]	7
OAG + H ₂ O ₂ 100 μM	77.11 ± 5.43	18.22 ± 2.79	77.78 ± 14.66	483.40 ± 65.34 [§]	11
OAG + Def. 100 μM	83.00 ± 5.55	21.80 ± 3.12	96.40 ± 17.04	612.00 ± 61.17 [§]	5
TG	81.00 ± 4.11	69.75 ± 18.37	19.00 ± 5.05	96.50 ± 13.14	4
TG + H ₂ O ₂ 10 μM	67.43 ± 4.77	84.43 ± 6.41	13.14 ± 1.91	70.00 ± 5.96	7
TG + H ₂ O ₂ 100 μM	85.89 ± 1.74	104.33 ± 4.99	9.75 ± 1.54	57.67 ± 3.83 [§]	12
TG + Def. 100 μM	78.00 ± 5.18	71.80 ± 5.05	13.00 ± 1.48	99.80 ± 10.43	5
TRPC6 KO					
Thr	73.00 ± 6.20	77.14 ± 6.99	2.86 ± 0.40	40.89 ± 4.38	8
Thr + H ₂ O ₂ 10 μM	75.00 ± 6.35	92.38 ± 9.39	4.00 ± 0.53	36.75 ± 5.40	8
Thr + H ₂ O ₂ 100 μM	91.25 ± 8.00	120.00 ± 13.66 [§]	3.25 ± 0.75	57.50 ± 3.21 [§]	4
Thr + Def. 100 μM	69.40 ± 6.14	76.40 ± 4.91	3.40 ± 1.40	17.20 ± 2.03 [§]	5
OAG	80.50 ± 4.90	20.27 ± 4.25	104.55 ± 12.26	807.50 ± 31.11	11
OAG + H ₂ O ₂ 10 μM	78.63 ± 5.78	15.75 ± 2.41	115.00 ± 33.30	647.75 ± 76.77	8
OAG + H ₂ O ₂ 100 μM	78.56 ± 5.13	22.22 ± 4.85	2.89 ± 11.43 [§]	521.89 ± 55.39 [§]	11
OAG + Def. 100 μM	74.83 ± 7.46	34.83 ± 12.10	83.25 ± 26.84	545.20 ± 75.97 [§]	6
TG	82.11 ± 2.20	75.78 ± 9.06	18.89 ± 2.63	149.33 ± 18.81	9
TG + H ₂ O ₂ 10 μM	73.62 ± 3.25	98.46 ± 6.67	12.46 ± 1.38 [§]	70.38 ± 2.11 [§]	13
TG + H ₂ O ₂ 100 μM	78.89 ± 1.83 [*]	105.33 ± 6.00	7.78 ± 1.53	47.22 ± 10.76 [§]	10
TG + Def. 100 μM	69.17 ± 3.97 [§]	81.17 ± 5.01	11.67 ± 1.28	75.83 ± 9.03 [§]	6

Values are represented as mean ± SEM.

[§] *P* < 0.05 as compared to untreated WT or KO groups.

* *P* < 0.05 as compared to their respective WT.

TRPC6 plays a relevant role in OAG-stimulated non-capacitative Ca²⁺ entry, although this role is not reflected in a reduction in platelet aggregation. While exposure to ROS or hypoxic-like conditions did not clearly alter platelet aggregation induced by the physiological agonist thrombin neither report any sensitivity of TRPC6 to these conditions, and at low pH platelet aggregation stimulated by thrombin was abolished. Under these conditions, the response to Ca²⁺ store depletion by TG or OAG, events generated downstream of thrombin receptor activation, resulted in attenuation but not abolishment. Since thrombin *per se* was not found to be inactivated at acidic pH our results indicate that thrombin receptors in mouse platelets or the signaling molecules upstream of DAG or inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) generation are sensitive to extracellular pH. Interestingly, despite that at acidic pH OAG-evoked platelet aggregation was reduced in WT and TRPC6 KO mice, the effect was significantly greater in platelets expressing TRPC6 (WT), thus suggesting that TRPC6 is inactivated at acidic pH. This finding was confirmed by the analysis of OAG-induced Ca²⁺ entry at pH 5.5 in platelets from WT and TRPC6 KO mice, which revealed that in the absence of TRPC6 the remaining Ca²⁺ entry induced by OAG was insensitive to acidic pH; thus suggesting that Ca²⁺ entry by OAG exhibits two components: a pH sensitive element, consisting of/containing TRPC6 subunits and a second, yet unidentified, pH insensitive component. Summarizing, our results indicate that TRPC6 function is attenuated by acidic pH while it is insensitive to ROS exposure or hypoxic-like conditions in mouse platelets, which should be taken into account in the study of the underlying mechanisms of disorders associated to respiratory or metabolic acidosis.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

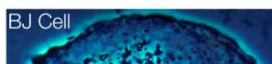
This work was supported by MICINN (BFU2010-21043-C02-01) and Junta de Extremadura-FEDER (GRU10010). A. B-E. was supported by the University of Extremadura (D-01). L.A. was supported by

MEC fellowship BES-2011-043356. N.D. held a fellowship from Junta de Extremadura (PRE09020). The B6;129P2-Trpc6^{tm1Dgen}/H mice were obtained from the European Mouse Mutant Archive (www.emmanet.org). Financial support obtained from the Wellcome Trust was used to archive the strain. Mouse contract services were provided by the Mary Lyon Centre at MRC Harwell (<http://www.har.mrc.ac.uk>).

References

- [1] A. Dietrich, T. Gudermann, Trpc6, *Handb. Exp. Pharmacol.* (2007) 125–141.
- [2] I. Jardin, P.C. Redondo, G.M. Salido, J.A. Rosado, Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate enhances store-operated calcium entry through hTRPC6 channel in human platelets, *Biochim. Biophys. Acta* 1783 (2008) 84–97.
- [3] S. Chen, Q. Fan, X. Gao, X. Wang, R. Huang, A.M. Laties, X. Zhang, Increased expression of the TRPC6 gene in patients with primary open-angle glaucoma, *Clin. Exp. Ophthalmol.* (2013), <http://dx.doi.org/10.1111/ceo.12111>.
- [4] A. Dietrich, Y.S.M. Medeiros, M. Gollasch, V. Gross, U. Storch, G. Dubrovskaya, M. Obst, E. Yildirim, B. Salanova, H. Kalwa, K. Essin, O. Pinkenburg, F.C. Luft, T. Gudermann, L. Birnbaumer, Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6^{-/-} mice, *Mol. Cell. Biol.* 25 (2005) 6980–6989.
- [5] A. Greka, P. Mundel, Balancing calcium signals through TRPC5 and TRPC6 in podocytes, *J. Am. Soc. Nephrol.* 22 (2011) 1969–1980.
- [6] T. Hofmann, A.G. Obukhov, M. Schaefer, C. Harteneck, T. Gudermann, G. Schultz, Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol, *Nature* 397 (1999) 259–263.
- [7] G. Boulay, Ca²⁺-calmodulin regulates receptor-operated Ca²⁺ entry activity of TRPC6 in HEK-293 cells, *Cell Calcium* 32 (2002) 201–207.
- [8] S.L. Brownlow, S.O. Sage, Transient receptor potential protein subunit assembly and membrane distribution in human platelets, *Thromb. Haemost.* 94 (2005) 839–845.
- [9] I. Jardin, G.M. Salido, J.A. Rosado, Role of lipid rafts in the interaction between hTRPC1, Orai1 and STIM1, *Channels (Austin)* 2 (2008) 401–403.
- [10] P.C. Redondo, I. Jardin, J.J. Lopez, G.M. Salido, J.A. Rosado, Intracellular Ca²⁺ store depletion induces the formation of macromolecular complexes involving hTRPC1, hTRPC6, the type II IP₃ receptor and SERCA3 in human platelets, *Biochim. Biophys. Acta* 1783 (2008) 1163–1176.
- [11] I. Jardin, L.J. Gomez, G.M. Salido, J.A. Rosado, Dynamic interaction of hTRPC6 with the Orai1/STIM1 complex or hTRPC3 mediates its role in capacitative or non-capacitative Ca²⁺ entry pathways, *Biochem. J.* 420 (2009) 267–276.
- [12] A. Berna-Erro, C. Galan, N. Dionisio, L.J. Gomez, G.M. Salido, J.A. Rosado, Capacitative and non-capacitative signaling complexes in human platelets, *Biochim. Biophys. Acta* 1823 (2012) 1242–1251.
- [13] N. Dionisio, L. Albarran, A. Berna-Erro, J.M. Hernandez-Cruz, G.M. Salido, J.A. Rosado, Functional role of the calmodulin- and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-binding (CIRB) site of TRPC6 in human platelet activation, *Cell. Signal.* 23 (2011) 1850–1856.

- [14] G. Ramanathan, S. Gupta, I. Thielmann, I. Pleines, D. Varga-Szabo, F. May, C. Mannhalter, A. Dietrich, B. Nieswandt, A. Braun, Defective diacylglycerol-induced Ca^{2+} entry but normal agonist induced activation responses in TRPC6 deficient mouse platelets, *J. Thromb. Haemost.* 10 (2012) 419–429.
- [15] E.V. Paez Espinosa, J.P. Murad, H.J. Ting, F.T. Khasawneh, Mouse transient receptor potential channel 6: role in hemostasis and thrombogenesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417 (2012) 853–856.
- [16] I. Bogeski, C. Kummerow, D. Al Ansary, E.C. Schwarz, R. Koehler, D. Kozal, N. Takahashi, C. Peinelt, D. Griesemer, M. Bozem, Y. Mori, M. Hoth, B.A. Niemeyer, Differential redox regulation of ORAI ion channels: a mechanism to tune cellular calcium signaling, *Sci Signal* 3 (115) (2010) ra24.
- [17] S. Graham, M. Ding, Y. Ding, S. Sours-Brothers, R. Luchowski, Z. Gryczynski, T. Yorio, H. Ma, R. Ma, Canonical transient receptor potential 6 (TRPC6), a redox-regulated cation channel, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 23466–23476.
- [18] N.R. Scrimgeour, D.P. Wilson, G.Y. Rychkov, Glu(1)(0)(6) in the Orail pore contributes to fast Ca^{2+} -dependent inactivation and pH dependence of Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CRAC) current, *Biochem. J.* 441 (2012) 743–753.
- [19] A. Braun, D. Varga-Szabo, C. Kleinschnitz, I. Pleines, M. Bender, M. Austinat, M. Bosl, G. Stoll, B. Nieswandt, Orail (CRACM1) is the platelet SOC channel and essential for pathological thrombus formation, *Blood* 113 (2009) 2056–2063.
- [20] F. Krotz, H.Y. Sohn, U. Pohl, Reactive oxygen species: players in the platelet game, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24 (2004) 1988–1996.
- [21] P.E. Morange, M.C. Alessi, Thrombosis in central obesity and metabolic syndrome: mechanisms and epidemiology, *Thromb. Haemost.* 110 (2013).
- [22] B. Potzsch, V. Vaskevicius, Haemostasis management of massive bleeding, *Hämostasologie* 31 (2011) 15–20.
- [23] F.W. Green Jr., M.M. Kaplan, L.E. Curtis, P.H. Levine, Effect of acid and pepsin on blood coagulation and platelet aggregation. A possible contributor prolonged gastroduodenal mucosal hemorrhage, *Gastroenterology* 74 (1978) 38–43.
- [24] I. Jardin, P.C. Redondo, G.M. Salido, J.A. Pariente, J.A. Rosado, Endogenously generated reactive oxygen species reduce PMCA activity in platelets from patients with non-insulin dependent diabetes mellitus, *Platelets* 17 (2006) 283–288.
- [25] A. Bouaziz, N.B. Amor, G.E. Woodard, H. Zibidi, J.J. Lopez, A. Bartegi, G.M. Salido, J.A. Rosado, Tyrosine phosphorylation/dephosphorylation balance is involved in thrombin-evoked microtubular reorganisation in human platelets, *Thromb. Haemost.* 98 (2007) 375–384.
- [26] G. Gryniewicz, M. Poenie, R.Y. Tsien, A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 3440–3450.
- [27] I. Jardin, N. Ben Amor, A. Bartegi, J.A. Pariente, G.M. Salido, J.A. Rosado, Differential involvement of thrombin receptors in Ca^{2+} release from two different intracellular stores in human platelets, *Biochem. J.* 401 (2007) 167–174.
- [28] N. Dionisio, M.V. Garcia-Mediavilla, S. Sanchez-Campos, P.L. Majano, I. Benedicto, J.A. Rosado, G.M. Salido, J. Gonzalez-Gallego, Hepatitis C virus NS5A and core proteins induce oxidative stress-mediated calcium signalling alterations in hepatocytes, *J. Hepatol.* 50 (2009) 872–882.
- [29] J.A. Rosado, S.O. Sage, Protein kinase C activates non-capacitative calcium entry in human platelets, *J. Physiol.* 529 (2000) 159–169.
- [30] G.M. Salido, I. Jardin, J.A. Rosado, The TRPC ion channels: association with Orail and STIM1 proteins and participation in capacitative and non-capacitative calcium entry, *Adv. Exp. Med. Biol.* 704 (2011) 413–433.
- [31] P.C. Redondo, I. Jardin, J.M. Hernandez-Cruz, J.A. Pariente, G.M. Salido, J.A. Rosado, Hydrogen peroxide and peroxynitrite enhance Ca^{2+} mobilization and aggregation in platelets from type 2 diabetic patients, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333 (2005) 794–802.
- [32] P.C. Redondo, G.M. Salido, J.A. Pariente, J.A. Rosado, Dual effect of hydrogen peroxide on store-mediated calcium entry in human platelets, *Biochem. Pharmacol.* 67 (2004) 1065–1076.
- [33] J.A. Rosado, P.C. Redondo, G.M. Salido, E. Gomez-Arteta, S.O. Sage, J.A. Pariente, Hydrogen peroxide generation induces pp60src activation in human platelets: evidence for the involvement of this pathway in store-mediated calcium entry, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 1665–1675.
- [34] S. Bartolome, N.K. Dhillon, S. Buch, A.J. Casillan, J.G. Wood, A.R. O'Brien-Ladner, Deferoxamine mimics the pattern of hypoxia-related injury at the microvasculature, *Shock* 31 (2009) 481–485.
- [35] Y. Wu, X. Li, W. Xie, J. Jankovic, W. Le, T. Pan, Neuroprotection of deferoxamine on rotenone-induced injury via accumulation of HIF-1 alpha and induction of autophagy in SH-SY5Y cells, *Neurochem. Int.* 57 (2010) 198–205.
- [36] R.N. Carter, G. Tolhurst, G. Walmsley, M. Vizuete-Förster, N. Miller, M.P. Mahaut-Smith, Molecular and electrophysiological characterization of transient receptor potential ion channels in the primary murine megakaryocyte, *J. Physiol.* 576 (2006) 151–162.
- [37] S.R. Hassock, M.X. Zhu, C. Trost, V. Flockerzi, K.S. Authi, Expression and role of TRPC proteins in human platelets: evidence that TRPC6 forms the store-independent calcium entry channel, *Blood* 100 (2002) 2801–2811.
- [38] P.H. Tseng, H.P. Lin, H. Hu, C. Wang, M.X. Zhu, C.S. Chen, The canonical transient receptor potential 6 channel as a putative phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-sensitive calcium entry system, *Biochemistry* 43 (2004) 11701–11708.



STIM1 regulates TRPC6 heteromultimerization and subcellular location

Letizia ALBARRÁN*, Natalia DIONISIO*, Esther LOPEZ*, Ginés M. SALIDO*, Pedro C. REDONDO* and Juan A. ROSADO*¹

*Department of Physiology, Cell Physiology Research Group, University of Extremadura, 10003 Cáceres, Spain

STIM1 (stromal interaction molecule 1) regulates store-operated channels in the plasma membrane, but the regulation of TRPC (transient receptor potential canonical) heteromultimerization and location by STIM1 is poorly understood. STIM1 is a single transmembrane protein that communicates the filling state of the endoplasmic reticulum to store-operated channels. STIM1 has been reported to regulate the activity of all of the TRPC family members, except TRPC7. TRPC6 has been predominantly associated to second messenger-activated Ca^{2+} entry pathways. In the present paper we report that STIM1 regulates the expression of TRPC6 in the plasma membrane and evokes translocation of this channel to the endoplasmic reticulum. Attenuation of TRPC6 expression in the plasma membrane resulted in a reduction in the association of this channel with TRPC1 and TRPC3. We have

found that expression of TRPC6 in the endoplasmic reticulum results in an increase in the passive Ca^{2+} efflux and basal cytosolic Ca^{2+} concentration, but not in the ability of cells to accumulate Ca^{2+} into the endoplasmic reticulum. We propose a novel mechanism for the regulation of TRPC6 channel location and function by STIM1, probably as a mechanism to modulate second messenger-operated Ca^{2+} entry while potentiating store-operated Ca^{2+} influx.

Key words: Ca^{2+} influx, endoplasmic reticulum, plasma membrane, stromal interaction molecule 1 (STIM1), transient receptor potential canonical (TRPC) channel, TRPC6.

INTRODUCTION

STIM1 (stromal interaction molecule 1) is a Ca^{2+} sensor located in the ER (endoplasmic reticulum) [1,2] and other agonist-sensitive Ca^{2+} compartments, such as acidic Ca^{2+} stores [3] that communicates the filling state of the intracellular Ca^{2+} stores to plasma membrane Ca^{2+} -permeable channels [4–6]. Discharge of the intracellular Ca^{2+} stores leads to a conformational change in STIM1 [7,8] that results in the activation of Ca^{2+} influx by a mechanism called capacitative or store-operated Ca^{2+} entry (SOCE), a relevant pathway in receptor-mediated Ca^{2+} signals. At least two types of store-operated Ca^{2+} currents have been described: the Ca^{2+} -selective I_{CRAC} current mediated by members of the Orai family of proteins [9–13] and the non-selective Ca^{2+} -permeable I_{SOC} currents mediated by members of the TRPC (transient receptor potential canonical) channel family [14,15].

The mammalian TRP (transient receptor potential) superfamily of cation-permeable channels is organized into seven subfamilies: TRPC, TRPV (transient receptor potential vanilloid), TRPM (transient receptor potential melastatin), TRPN (transient receptor potential no mechanoreceptor potential), TRPA (transient receptor potential ankyrin), TRPP (transient receptor potential polycystin) and TRPML (transient receptor potential mucopolipin). TRP channels show a great diversity in their ionic selectivity and activation mechanisms. The first mammalian homologue of *Drosophila* TRPs identified was TRPC1 [16,17]. Since then, seven members of the TRPC family of proteins have been described (TRPC1–TRPC7) [18]. All TRPC family members are gated by receptor occupation and activation of phospholipase C and distinct

TRPC members, especially TRPC1, but also TRPC4 and TRPC5, have been reported to be activated by Ca^{2+} store depletion in different cell types [19,20]. TRPC6 has been widely demonstrated to be involved in receptor-activated DAG (diacylglycerol)-mediated cation entry [21]; however, there is a growing body of evidence supporting a role for TRPC6 in SOCE [22,23] and we have reported that TRPC6 might act as a store-operated or DAG-activated channel in the same cell type depending on the activation mechanism and association/dissociation with the STIM1-linked signalplex [24].

STIM1 has been reported to associate with TRPC1, TRPC2, TRPC4, TRPC5 [6,25] and TRPC6 [24,26] and not with TRPC3 and TRPC7 [6]. STIM1 gates TRPC1 by intermolecular electrostatic interaction, which involves interaction between two conserved negatively charged aspartate residues in TRPC1 (residues 639 and 640) and two positively charged lysine residues located in the polybasic domain of STIM1 (residues 684 and 685) [27]. STIM1 directly or indirectly regulates all of the TRPC proteins except TRPC7. STIM1 has been reported to directly associate to and regulate TRPC1, TRPC4 and TRPC5. On the other hand, co-immunoprecipitation experiments have revealed that indirect regulation of TRPC3 and TRPC6 by STIM1 depends on their coupling with STIM1-regulated TRPC1 and TRPC4 proteins respectively [28].

In the present study we have investigated the role of STIM1 in membrane expression and heteromultimerization of TRPC proteins. We show that transient expression of STIM1 in NG115-401L cells, which express a negligible amount of endogenous STIM1, results in dissociation of TRPC1 and TRPC3 from TRPC6, most likely due to translocation of TRPC6 from the

Abbreviations: $[\text{Ca}^{2+}]_i$, cytosolic free calcium concentration; DAG, diacylglycerol; ER, endoplasmic reticulum; fura 2/AM, fura 2 acetoxymethyl ester; HBS, HEPES-buffered saline; sulfo-NHS-LC-biotin, sulfosuccinimidyl-6'-((biotinamido)hexanoate; PMCA, plasma-membrane Ca^{2+} -ATPase; SERCA, sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase; SOCE, store-operated Ca^{2+} entry; STIM1, stromal interaction molecule 1; TBST, TBS with Tween 20; TG, thapsigargin; TRP, transient receptor potential; TRPC, transient receptor potential canonical; TRPM, transient receptor potential melastatin; TRPV, transient receptor potential vanilloid.

¹ To whom correspondence should be addressed (email jarosado@unex.es).

plasma membrane to the ER. Therefore, STIM1 modulates the subcellular location and function of TRPC6.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Fura 2/AM (fura 2 acetoxymethyl ester) and calcein were from Invitrogen. TG (thapsigargin), Nonidet P40, SDS, anti-actin polyclonal antibody, BSA, calcium chloride, EGTA, glucose, Hepes, DAPI, anti-Orai1 antibody, Trizma® base and ER isolation kit were purchased from Sigma-Aldrich. Complete EDTA-free protease inhibitor tablets were purchased from Roche. Mouse anti-STIM1 antibody was from BD Transduction Laboratories. Rabbit anti-TRPC1 and rabbit anti-TRPC6 polyclonal antibodies were purchased from Alomone Labs. Rabbit anti-TRPC3 antibody and mouse anti-SERCA (sarcolemmal/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase) antibody was from Abcam. Anti-PMCA (plasma-membrane Ca^{2+} -ATPase) antibody was from Affinity Bioreagents. Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG and anti-mouse antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch. Protein A-conjugated agarose beads were purchased from Millipore. Enhanced chemiluminescence detection reagents were from Pierce. Western blot nitrocellulose membranes and Transfectin™ Lipid Reagent were from Bio-Rad Laboratories. Ez-Link sulfo-NHS-LC-biotin [sulfo-succinimidyl-6'-(biotinamido)hexanoate] and streptavidin-conjugated agarose beads were purchased from Thermo Fisher Scientific. All other reagents were of analytical grade.

Cell culture and transfection

NG115-401L and SH-SY5Y cell lines were obtained from the A.T.C.C. (Manassas, VA, U.S.A.), cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium, and supplemented with 10% heat-inactivated FBS in a 37°C incubator with 5% CO_2 .

At the time of the experiments, cells were suspended in HBS (Hepes-buffered saline) (pH 7.45) containing 145 mM NaCl, 10 mM Hepes, 10 mM D-glucose, 5 mM KCl and 1 mM MgSO_4 , supplemented with 0.1% BSA.

Cell transfection with pHluorin-STIM1 was performed using Transfectin™ Lipid Reagent following the manufacturer's instructions using the pHluorin-STIM1 provided by Dr Pingyong Xu. These sequences were synthesized and hybridized as described previously [29].

Measurement of cytosolic free calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)

Washed cells were loaded with fura 2 by incubation with 2 μM fura 2/AM for 45 min at 37°C in the absence of extracellular Ca^{2+} . Cells were subsequently washed and suspended in HBS. Fluorescence was recorded from 2 ml aliquots of magnetically stirred cell suspension (2×10^6 cells/ml) at 37°C using an RF-5301 spectrophotometer (Shimadzu) with excitation wavelengths of 340 and 380 nm and emission at 505 nm. Changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were assessed by the fura 2 340/380 fluorescence ratio according to the method of Grynkiewicz et al. [30]. Ca^{2+} release was estimated using the integral of the rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ for 150 s after addition of TG, taking a sample every second and expressed as $\text{nM} \cdot \text{s}^{-1}$ [24]. To compare the rate of Ca^{2+} efflux from the TG-sensitive stores in the absence of extracellular Ca^{2+} , traces were fitted to the equation $y = Ax + B$, where A is the slope of the curve [31].

Determination of changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in single cells was performed by epifluorescence microscopy (Nikon Diaphot T200) at room temperature using fura 2. Fura 2-loaded cells were placed in a perfusion chamber. Cells were illuminated with a monochromator (Polychrome IV, Photonics) at 340–380 nm, and the emitted fluorescence at 515 nm was captured with a digital camera (Hisca CCD C-6790, Hamamatsu Photonics) and recorded using dedicated software (Aquacosmos 2.6, Hamamatsu Photonics). Changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ recorded with fura 2 are expressed in relation to initial fluorescence after subtraction of background (F/F_0).

Biotinylation of membrane proteins

NG115-401L cells grown in 75- cm^2 tissue culture dishes were washed three times with HBS (without added serum or protein). Söerren's buffer (3 ml) (16 mM Na_2HPO_4 and 114 mM NaH_2PO_4 , pH 7.0) containing 2.5 mg EZ-Link sulfo-NHS-LC-biotin was added, and cells were incubated at 4°C for 1 h. The biotinylation reaction was terminated by addition of Tris-base to a final concentration of 33 mM. Following biotinylation, cells were washed twice in Söerren's buffer, disrupted using Nonidet P40 buffer and sonicated. Cells were harvested by centrifugation (16000 g for 5 min at 4°C). Samples were incubated with 25 μl of streptavidin beads overnight at 4°C, centrifuged and resuspended in Laemmli buffer for subsequent analysis by Western blotting.

Subcellular fractionation and ER isolation

Cells were isolated from tissue culture dishes and washed three times with HBS (without added serum or protein). Washed cells were pulled and ER membranes were isolated with an ER isolation kit (Sigma). The whole procedure was performed at 4°C. Briefly, pulled cells were suspended in a hypotonic buffer for 20 min, centrifuged at 600 g and suspended in an isotonic buffer. Cell membranes were disrupted using a Dounce homogenizer, and unbroken cells were removed by 10 min of centrifugation at 1000 g. The mitochondrial fraction was removed from the supernatant by 15 min of centrifugation at 12000 g. The microsomal fraction containing ER membranes was precipitated and separated from the supernatant by ultracentrifugation for 1 h at 100000 g. The pelleted microsomal fraction was washed, resuspended again in isotonic buffer, and ER membranes were further purified from this fraction by Optiprep density gradient separation at 150000 g for 3 h (from top to bottom, 1.6 ml 15%, 0.6 ml 20% mixed microsomal fraction and 0.8 ml 30% Optiprep). The different fractions were separated by SDS/PAGE and probed with antibodies against TRPC6 and STIM2.

Immunoprecipitation and Western blotting

Immunoprecipitation and Western blotting were performed as described previously [32]. Briefly, 500 μl aliquots of cell suspension (2×10^6 cells/ml) were lysed with an equal volume of lysis buffer (pH 8) containing 274 mM NaCl, 40 mM Tris, 4 mM EGTA, 20% glycerol, 1% Nonidet P40, 2 mM Na_3VO_4 and complete EDTA-free protease inhibitor tablets. Cell debris was removed by centrifugation at 15000 g for 30 min at 4°C. For the immunoprecipitation assay, aliquots of cell lysates (1 ml) were incubated with 2 μg of anti-TRPC6 or anti-TRPC3 polyclonal antibodies and 25 μl of Protein A-conjugated agarose beads overnight at 4°C on a rocking platform. Total protein and immunoprecipitated lysates were resolved by SDS/PAGE (8% gel) and separated proteins were electrophoretically transferred on to nitrocellulose membranes for subsequent probing. Blots

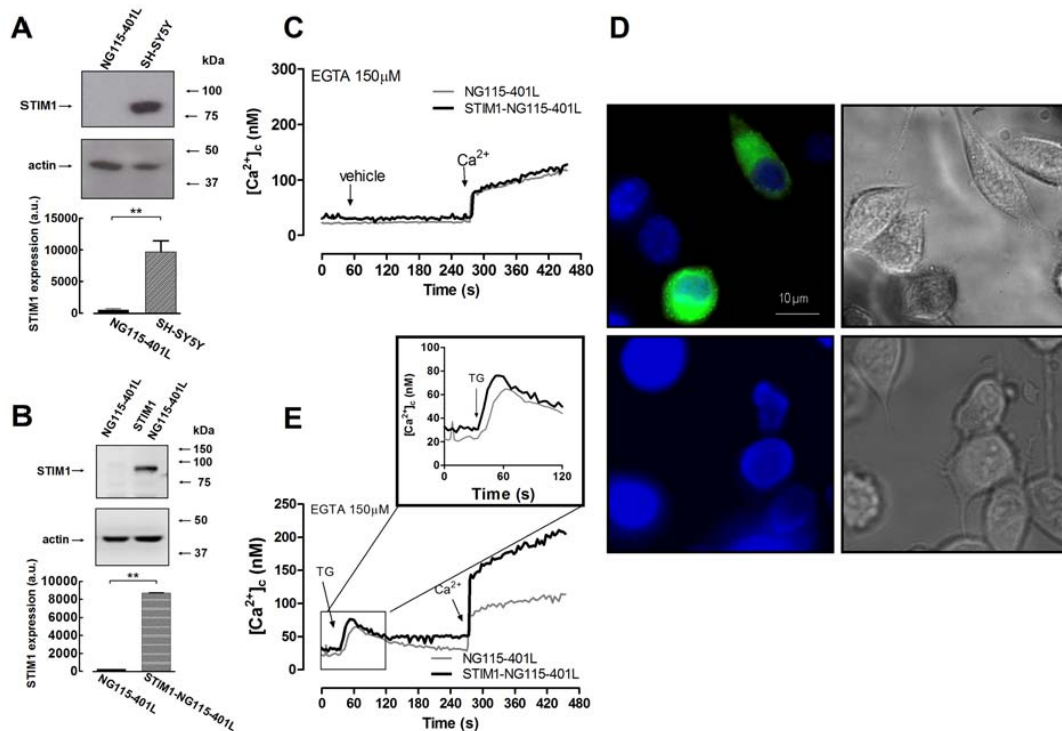


Figure 1 Expression of STIM1 in NG115-401L cells and effect of STIM1 overexpression in TG-induced Ca^{2+} entry

(A) Resting NG115-401L and SH-SY5Y cells were lysed and subjected to Western blot analysis using an anti-STIM1 antibody. Membranes were re-probed with an anti-actin antibody for protein loading control. Histograms represent STIM1 expression in NG115-401L and SH-SY5Y cells, expressed as means \pm S.E.M. of three separate determinations. $**P < 0.01$ compared with NG115-401L cells. Molecular masses are indicated in kDa. (B) NG115-401L cells were transfected with STIM1, as indicated, and used after 48 h for protein detection. Western blotting shows the expression levels of STIM1, which was significantly increased in lysates from cells transfected with STIM1. Membranes were re-probed with anti-actin antibody for protein loading control. Histograms represent STIM1 expression in NG115-401L and STIM1-transfected NG115-401L cells, expressed as means \pm S.E.M. of three separate experiments. $**P < 0.01$ compared with NG115-401L cells transfected with empty vector. (C and E) Wild-type NG115-401L cells and STIM1-expressing NG115-401L cells were loaded with fura 2 and treated in a Ca^{2+} -free medium ($150 \mu\text{M}$ EGTA was added) with vehicle (DMSO; C) or $1 \mu\text{M}$ TG. Changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were monitored using the 340/380 nm ratio and traces were calibrated in terms of $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Traces are representative of 14 independent experiments. (D) NG115-401L cells were transfected with pHluorin-STIM1 (green; upper panels) or empty vector (lower panels). Nuclei were stained with DAPI (blue). Fluorescence was detected using a confocal microscope as described in the Materials and methods section. Images shown are representative of three separate experiments.

were incubated overnight with 10% BSA in TBST (TBS with 0.1% Tween 20) to block residual protein-binding sites. Immunodetection of TRPC1, TRPC6, TRPC3, Orail, STIM1, STIM2 and actin was achieved using the anti-TRPC1, the anti-TRPC6 or the anti-Orail polyclonal antibody diluted 1:1000 in TBST for 2 h at room temperature, the anti-TRPC3, anti-STIM1 or anti-STIM2 antibodies diluted 1:2000, 1:1000 and 1:400 respectively in TBST overnight at 4°C , or the anti-actin antibody diluted 1:1000 in TBST for 1 h at room temperature. The primary antibody was removed and blots were washed six times for 5 min each with TBST. To detect the primary antibody, blots were incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody or horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG antibody diluted 1:10000 in TBST and then exposed to enhanced chemiluminescence reagents for 1 min. Blots were then scanned with the Li-Cor C-digit[®] blot scanner. The density of bands on the film was measured using scanning densitometry.

Confocal microscopy

NG115-401L cells were transfected with pHluorin-STIM1 or empty vector as indicated above and then samples were mounted on to coverslips. The images were taken in live cells at room

temperature using a dual confocal microscope (He-Ne and argon; Bio-Rad Laboratories).

Statistical analysis

Analysis of statistical significance was performed using the Student's *t* test. $P < 0.05$ was considered to be significant.

RESULTS

Expression of STIM1 in NG115-401L cells

To investigate the role of STIM1 in TRPC association we used the mouse neuroblastoma \times rat glioma hybrid NG115-401L cell, which has been demonstrated to endogenously express a negligible amount of STIM1 [33]. As expected, in this cell type, Western blotting using a specific anti-STIM1 antibody was unable to detect STIM1 under conditions in which we were able to detect STIM1 protein expression in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y (Figure 1A; $n = 3$), which was used as a positive control for where STIM1 has been detected previously [4].

In the absence of extracellular Ca^{2+} , treatment of fura 2-loaded NG115-401L cells in stirred cuvettes at 37°C with the SERCA inhibitor TG ($1 \mu\text{M}$) to induce SOCE by passive Ca^{2+} store

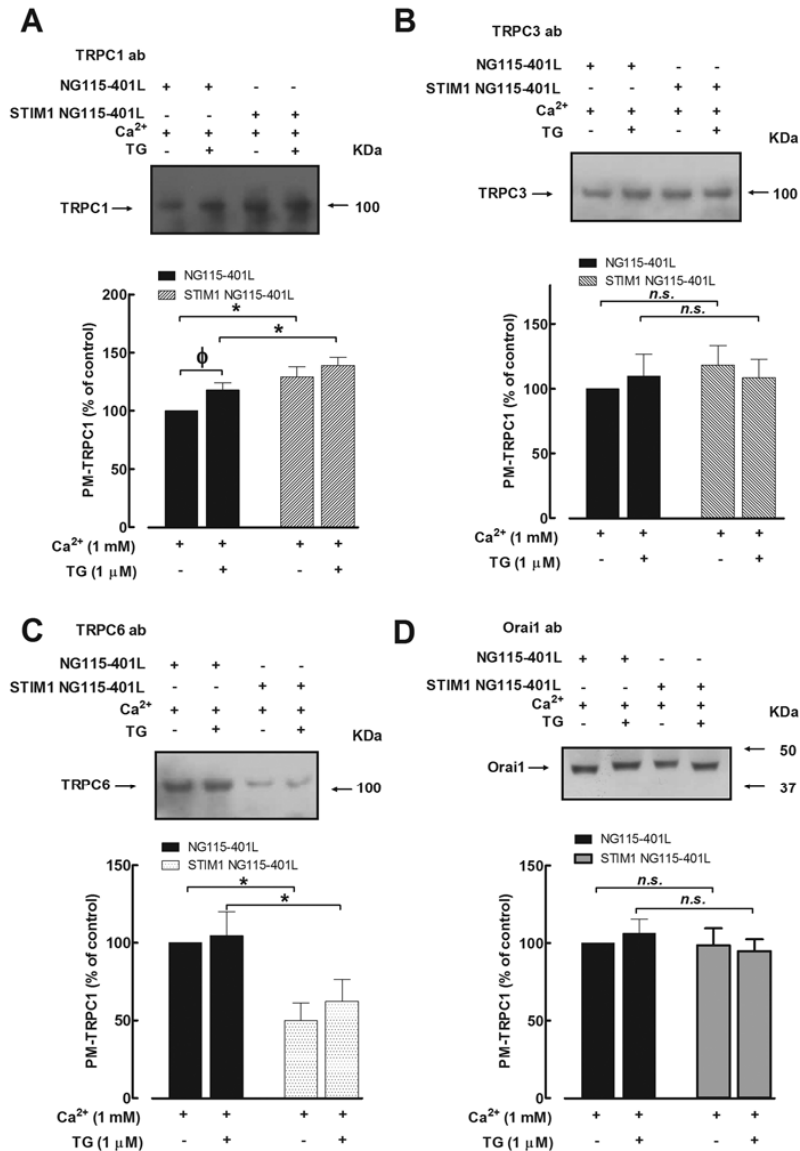


Figure 2 Role of STIM1 on TRPC1, TRPC3, TRPC6 and Orai1 membrane expression

NG112-101L cells were transfected with STIM1, as indicated, and used after 48 h. Cells were stimulated for 3 min with TG (1 μM) in the presence of 1 mM Ca²⁺ or left untreated. Stimulation was terminated in ice-cold Sbercen's buffer, and cell surface proteins were labelled by biotinylation, as described in the Materials and methods section. Labeled proteins were extracted with streptavidin-coated agarose beads and analysed by SDS/PAGE and Western blotting using anti-TRPC1 (A), anti-TRPC3 (B), anti-TRPC6 (C) or anti-Orai1 (D) antibody (ab). Histograms indicate quantification of cell surface proteins. These results are representative of four to six independent experiments. Results are expressed as means ± S.E.M. and presented as percentage of control (non-stimulated and non-transfected cells). **P* < 0.05 compared with NG115-401L cells transfected with empty vector. ϕ *P* < 0.05 compared with control (cells not treated with TG). n.s., not significant. PM, plasma membrane. Molecular masses are indicated in kDa.

discharge resulted in a transient increase in [Ca²⁺]_c. Subsequent addition of Ca²⁺ to the extracellular medium resulted in a sustained but small rise in [Ca²⁺]_c that was not significantly greater than that observed in cells pretreated with vehicle (DMSO) instead of TG (Figures 1C and 1E; *n* = 14); thus suggesting that this Ca²⁺ signal was constitutive, as described previously [33].

In order to explore the role of STIM1 in TRPC biology, we overexpressed STIM1 in NG115-401L cells. As depicted in Figure 1(B), cell transfection with pHluorin-STIM1 significantly

enhanced the expression of STIM1 in NG115-401L cells. As expected in resting cells, when expressed in NG115-401L cells, fluorescently tagged pHluorin-STIM1 showed cytosolic distribution with no detection of puncta formation (Figure 1D). Next, we explored whether overexpression of STIM1 in these cells was able to rescue SOCE. As shown in Figure 1(E), TG-induced Ca²⁺ entry was significantly greater in cells overexpressing STIM1 than in wild-type NG115-401L cells (*P* < 0.05, Student's *t* test; *n* = 14). STIM1 overexpression had no significant effect

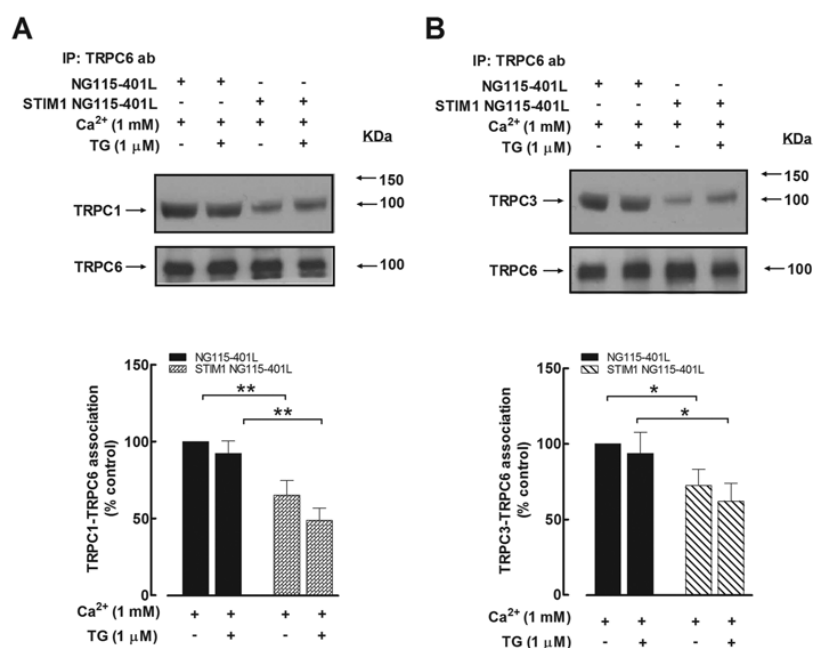


Figure 3 Role of STIM1 on TG-induced coupling between TRPC6 and TRPC1, and between TRPC6 and TRPC3 in neuroblastoma cell lines

NG115-401L cells were transfected with STIM1, as indicated, and used after 48 h. Cells were stimulated for 3 min with TG (1 μM) in the presence of 1 mM Ca²⁺ or left untreated and lysed. Whole-cell lysates were immunoprecipitated (IP) with anti-TRPC6 antibody (ab). Immunoprecipitates were analysed by Western blotting using either anti-TRPC1 antibody (A) or anti-TRPC3 antibody (B) as described in the Materials and Methods section (upper panels). Histograms represent the quantification of TRPC6-TRPC1 or TRPC6-TRPC3 association in control and transfected cells under different experimental conditions. These results are representative of six independent experiments. Results are expressed as means ± S.E.M. and presented as percentage of control (non-stimulated and non-transfected cells). **P* < 0.05 compared with NG115-401L cells transfected with empty vector. Molecular masses are indicated in kDa.

on the accumulation of Ca²⁺ into the TG-sensitive stores as demonstrated by the similar extent of Ca²⁺ released upon treatment with TG in wild-type and STIM1-expressing cells (the integral of the rise in [Ca²⁺]_c above basal for 150 s after the addition of TG, taking data every 1 s, was 3128 ± 418 nM·s⁻¹ in wild-type cells and 3442 ± 374 nM·s⁻¹ in STIM1-expressing cells). In addition, we found that basal [Ca²⁺]_c was significantly higher in STIM1-expressing NG115-401L cells (42.1 ± 4.6 nM) than in their respective controls (wild-type cells: 29.6 ± 4.1 nM; *P* < 0.05; *n* = 14).

Effect of STIM1 overexpression in the plasma membrane location of TRPC and Orai1 channels in NG115-401L cells

In order to investigate whether STIM1 plays a role in the surface expression of TRPC channels, we investigated the location of TRPC1, TRPC3 and TRPC6 in the plasma membrane by biotinylation in wild-type and STIM1-overexpressing NG115-401L cells. Biotinylation of membrane proteins was performed in resting cells and cells treated with TG in order to ascertain whether store depletion has any implication in the surface expression of TRPC proteins. As depicted in Figure 2, the expression of TRPC1, TRPC3 and TRPC6 and Orai1 in the plasma membrane was clearly detectable at resting conditions (*n* = 4). Treatment of NG115-401L cells with 1 μM TG for 3 min significantly enhanced TRPC1 expression in the plasma membrane (*P* < 0.05, Student's *t* test; *n* = 6), as previously described [34], but has a negligible effect, if any, on the surface location of TRPC3 and TRPC6 or Orai1 (*P* > 0.05, Student's *t* test; *n* = 4). STIM1 overexpression increased the expression of TRPC1 in the plasma

membrane (*P* < 0.05, Student's *t* test; *n* = 6), as predicted in the model published by Ambudkar's group [34], but did not significantly alter TRPC3 or Orai1 membrane expression both in the absence or presence of TG (Figure 2; *P* > 0.05, Student's *t* test; *n* = 4). However, the surface expression of TRPC6 was significantly attenuated in STIM1-overexpressing cells (Figure 2; *P* < 0.05, Student's *t* test; *n* = 4). These findings support a role for STIM1 in the surface expression of TRPC6 channels.

Effect of STIM1 overexpression in the association of TRPC channels in NG115-401L cells

Multimerization of TRP channels has been described both in *Drosophila* [35] and mammalian cells [36]. In the latter, inhibition of STIM1 function, either by knockdown of STIM1 with siRNA or by expressing the dominant-negative ΔERM-STIM1D76A, has revealed that STIM1 plays a relevant role in the regulation of TRPC3 and TRPC6 channel function, indirectly through their heteromultimerization with the STIM1-associated TRPC1 and TRPC4 respectively [28]. We have also previously demonstrated the association of TRPC6 with STIM1 and TRPC1 or TRPC3 upon Ca²⁺ store depletion or stimulation with DAG analogues respectively [24,37,38]. Hence, we now investigated the association between TRPC1, TRPC3 and TRPC6 in wild-type NG115-401L cells, mostly lacking STIM1, and STIM1-overexpressing NG115-401L cells by looking for co-immunoprecipitation between these proteins. Again, we performed the experiments in resting cells and cells treated with TG in order to ascertain whether store depletion plays any role in the multimerization of TRPC channels.

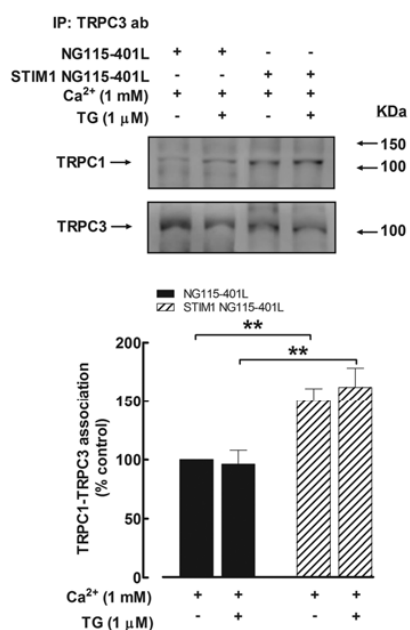


Figure 4 Role of STIM1 on TG-induced coupling between TRPC1 and TRPC3 in NG115-401L cells

NG115-401L cells were transfected with STIM1 as indicated, and used after 48 h to perform the assays. Cells were stimulated in the presence of 1 mM Ca^{2+} for 3 min with 1 μM TG or left untreated and lysed. Samples were immunoprecipitated (IP) with anti-TRPC1 antibody, subjected to Western blotting using anti-TRPC3 antibody (ab) and reprobed with anti-TRPC1 antibody for protein loading control (upper panel). Histograms represent the quantification of TRPC3-TRPC1 association in control and transfected cells under different experimental conditions. These results are representative of six independent experiments. Results are expressed as means \pm S.E.M. and presented as percentage of control (non-stimulated and non-transfected cells). $**P < 0.01$ as compared with cells transfected with empty vector. Molecular masses are indicated in kDa.

As depicted in Figure 3, a detectable co-immunoprecipitation was observed between TRPC6 and both TRPC1 and TRPC3 in resting cells ($n = 6$). The association of TRPC6 with TRPC1 and TRPC3 was not modified by treatment for 3 min with 1 μM TG, which was able to induce extensive Ca^{2+} store depletion as shown in Figure 1, thus suggesting that store depletion is not relevant for the association between these proteins in NG115-401L cells. Overexpression of STIM1 in NG115-401L cells resulted in a significant attenuation of the association between TRPC6 and both TRPC1 and TRPC3 (Figure 3; $P < 0.05$, Student's t test; $n = 6$), which supports a role for STIM1 in TRPC channel multimerization.

Furthermore, co-immunoprecipitation of TRPC1 with the anti-TRPC3 antibody, which was detected at resting conditions, was found to be significantly greater in STIM1-overexpressing NG115-401L cells than in wild-type cells (Figure 4; $n = 6$). Co-immunoprecipitation between these proteins was not altered by Ca^{2+} store depletion as depicted in Figure 4.

Regulation of TRPC6 location by STIM1

TRPC6 proteins have been mainly found to be located in the plasma membrane [39], although the intracellular subpopulation of TRPC6 has been reported to be inserted in the plasma membrane upon receptor activation [40]. Since we have found that expression of STIM1 in NG115-401L cells reduces plasma membrane expression of TRPC6 proteins and its association

with other TRPC channels, we have further evaluated whether STIM1 regulates the cellular level of expression of TRPC6 or the subcellular location of the channel.

To explore the first issue, whole-cell lysates from wild-type and STIM1-expressing NG115-401L cells were subjected to Western blotting using a specific anti-TRPC6 antibody. As shown in Figure 5(A), endogenous TRPC6 expression in NG115-401L cells was not significantly affected by overexpression of STIM1 ($P > 0.05$; $n = 3$). These findings, together with the effect of STIM1 expression on TRPC6 membrane location reported above, indicate that STIM1 might regulate the cellular location of TRPC6.

We have recently reported that TRPC6 is located in the ER in mouse platelets, where this channel is involved in the regulation of resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [41]. A Western blot of NG115-401L cells after subcellular membrane fractionation revealed TRPC6 expression in the ER-enriched fraction only in cells expressing STIM1, but not in wild-type cells (Figure 5B; $n = 3$), whereas location of TRPC6 in the plasma membrane was found in both cell samples, strongly suggesting that STIM1 expression evoked translocation of a TRPC6 subpopulation from the plasma membrane to the ER. The presence of STIM2 in the ER fraction, as well as the absence of TRPC6 in the ER fraction in wild-type cells, indicates the absence of plasma membrane-resident TRPC6 contamination. Thus our results suggest that STIM1 regulates the intracellular location of a TRPC6 subpopulation in the membrane of the ER.

We have reported above that STIM1 expression in NG115-401L cells did not alter the amount of Ca^{2+} accumulated into the TG-sensitive store, presumably the ER, estimated as the integral of the rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ for 150 s after addition of TG, but the resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was enhanced in these cells (Figure 1D). Expression of STIM1 and subsequent translocation of TRPC6 to the ER significantly enhanced the rate of passive Ca^{2+} efflux from the ER as compared with wild-type cells (the rate of increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ upon treatment with TG in the absence of extracellular Ca^{2+} was $1.10 \pm 0.16 \text{ nM}\cdot\text{s}^{-1}$ in wild-type cells and $1.86 \pm 0.19 \text{ nM}\cdot\text{s}^{-1}$ in STIM1-expressing cells (Figure 1E; $P < 0.05$; $n = 14$). These findings would suggest that TRPC6 might be acting as a leak channel of the ER, but direct activation of TRPC6 by the activator Hyp9 in the absence of extracellular Ca^{2+} did not result in a further Ca^{2+} release from the intracellular stores in cells expressing STIM1 (results not shown), thus suggesting that either TRPC6 in the ER is a constitutively active channel or it regulates Ca^{2+} leakage by unknown mechanisms. We have further investigated the relevance of the translocation of TRPC6 from the plasma membrane to the ER. To explore this issue we have stimulated NG115-401L cells transfected with empty vector of STIM1 with the TRPC6 activator Hyp9 in the presence of extracellular Ca^{2+} to induce TRPC6-dependent non-capacitative Ca^{2+} entry. As shown in Figure 6, in cells transfected with STIM1, Hyp9-evoked Ca^{2+} entry was significantly attenuated, most likely due to the reduction in TRPC6 expression in the plasma membrane.

DISCUSSION

STIM1 is a single transmembrane protein mostly located in intracellular Ca^{2+} stores such as the ER, although a small subpopulation has been also described in the plasma membrane [42,43]. ER-resident STIM1 acts as the sensor of the intraluminal Ca^{2+} concentration via its EF-hand domain and, upon discharge of the Ca^{2+} stores, activates the store-operated channels in the plasma membrane [6,44,45]. The mechanism underlying the interaction of STIM1 with store-operated channels has been

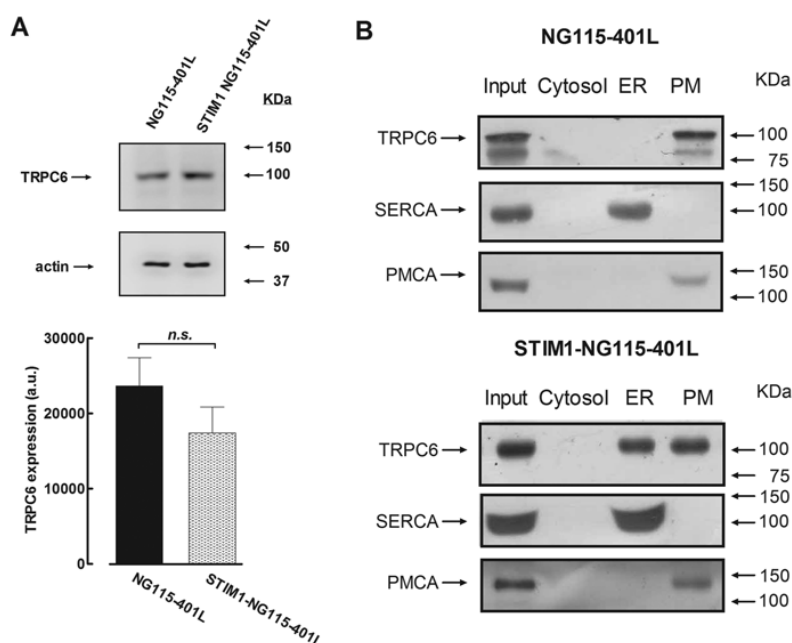


Figure 5 Expression of TRPC6 in total cell lysates and subcellular fractions in NG115-401L cells

(A) Western blot of total cellular protein lysates extracted from wild-type and STIM1-transfected NG115-401L cells. TRPC6 expression was detected with an anti-TRPC6 antibody. Membranes were re-probed with anti-actin antibody for protein loading control. Histograms represent TRPC6 expression in NG115-401L and STIM1-transfected NG115-401L cells, expressed as means \pm S.E.M. of three separate determinations. (B) Western blot analysis of TRPC6 expression in the cytosol, and ER- and plasma membrane (PM)-enriched fractions isolated by Optiprep density gradient, and in the input fraction. The input represents 5% of the whole-cell lysate used for each subcellular fractionation. Membranes were re-probed with anti-SERCA and anti-PMCA antibodies for ER and PM enrichment controls. Molecular masses are indicated in kDa.

extensively investigated and current hypotheses support a direct interaction between STIM1 and both Orai and TRPC proteins in the frame of a Ca^{2+} store-regulated signalplex [46–51]. STIM1 has been reported to regulate TRPC1, TRPC4 and TRPC5 by direct interaction [6] and to modulate TRPC3 and TRPC6 by promoting their heteromultimerization with TRPC1 and TRPC4 respectively [28]. However, whether STIM1 modulates the cellular location of TRPC proteins remains elusive. In the present paper we provide evidence supporting a role of STIM1 in the regulation of the subcellular location of TRPC6. Our results clearly indicate that transient STIM1 expression in cells, that show an undetectable amount of native STIM1 (NG115-401L cells), rescued SOCE in these cells and significantly attenuated the plasma membrane expression of TRPC6, without having any detectable effect on the surface expression of TRPC1, TRPC3 and Orai1. The translocation of TRPC6 from the plasma membrane to the ER results in attenuation of TRPC6-dependent non-capacitative Ca^{2+} entry in these cells. Our analysis of TRPC heteromultimerization reveals that STIM1 expression enhances TRPC1–TRPC3 association, confirming previous reports by Muallem and co-workers [28], but significantly reduces the interaction of TRPC6 with TRPC1 and TRPC3. TRPC6 has been classically considered a DAG-regulated channel [21], although new findings have provided evidence for a role of TRPC6 in SOCE [22,23]. The modulation of TRPC6 shows a great plasticity as demonstrated in human platelets, where TRPC6 might be involved in both SOCE and DAG-activated Ca^{2+} influx depending on the activation mechanism [24].

Since TRPC6 expression in the plasma membrane is attenuated in STIM1-expressing cells and this observation does not correlate

with a reduction in the overall level of TRPC6, as detected by Western blotting, we explored further whether TRPC6 is located in an internal membrane. Although TRP proteins are predominantly located in the plasma membrane, expression of TRP channels, such as TRPM1, TRPM2 or TRPV1, in intracellular membranes has been reported as acting as ionic channels [52–54]. We have recently reported the functional expression of TRPC6 in the ER of mouse platelets, where TRPC6 acts as a Ca^{2+} leak channel [41]. Our results indicate that TRPC6 is not expressed in the ER membrane in NG115-401L cells lacking detectable STIM1 amounts; however, significant amounts of TRPC6 were detected in NG115-401L cells expressing STIM1, which strongly suggest that STIM1 expression induced translocation of TRPC6 from the plasma membrane to the ER, and thus STIM1 regulates the cellular location of TRPC6, which, to our knowledge, is the first description of the modulation of the location of a channel by STIM1. The expression of TRPC6 in the ER membrane resulted in a significant enhancement of the passive Ca^{2+} leakage rate from the TG-sensitive stores (presumably the ER) and a slight increase in resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$. These findings are consistent with the effects observed after TRPC6 knockout in mouse platelets, where TRPC6 has been found located in the ER [41]. The activity of TRPC6 in the ER seems to be constitutive, and thus it should be compensated by a similar increase in SERCA activity since no differences in the ability to accumulate Ca^{2+} into the ER has been detected in STIM1-expressing cells.

In summary, our results provide evidence for a relevant role of STIM1 in the cellular location of TRPC6. STIM1 has been reported to activate SOCE, but also to suppress other Ca^{2+} influx pathways, such as voltage-operated Ca^{2+} entry through the

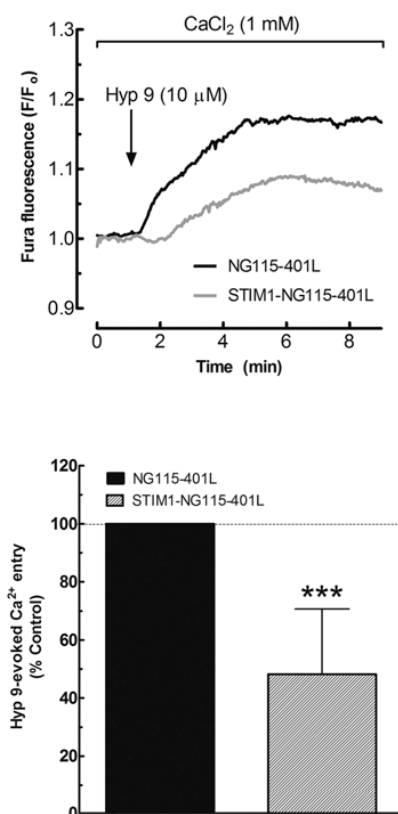


Figure 6 Expression of STIM1 attenuates TRPC6-mediated non-capacitative Ca²⁺ entry in NG115-401L cells

NG115-401L cells were transfected with STIM1 (STIM1-NG115-401L) or empty vector (NG115-401L) as indicated, and used after 48 h to perform the assays. Cells were stimulated with 10 μ M Hyp9 in the presence of 1 mM Ca²⁺. Changes in [Ca²⁺]_i were monitored as described in the Materials and methods section. Histograms represent the quantification of Hyp9-evoked Ca²⁺ entry in control and transfected cells. Results are expressed as means \pm S.E.M. response from cells transfected with empty vector (27 cells) and with STIM1 (19 cells). *** P < 0.001 compared with cells transfected with empty vector.

regulation of Cav1.2 channels [55]. A possible explanation for our findings might reside in a similar regulatory mechanism, mediated by STIM1, and addressed to suppress second messenger-operated Ca²⁺ entry via TRPC6. The functional location of a TRPC6 subpopulation in the ER might be involved in Ca²⁺ handling by this Ca²⁺ store.

AUTHOR CONTRIBUTION

Letizia Albarrán, Natalia Dionisio, Pedro Redondo and Esther Lopez performed the experiments. Ginés Salido and Pedro Redondo participated in the redaction of the draft and discussion, and Juan Rosado designed the study, drafted the paper and discussed the results.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank Dr Pingyong Xu (National Key Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China) for providing the pHluorin-STIM1 plasmid.

FUNDING

This study is supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness [grant numbers BFU2010-21043-C02-01 and BFU2013-45564-C2-1-P] and Junta de Extremadura-FEDER [grant number GR10010]. L.A., N.D. and E.L. are supported by MEC [fellowship BES-2011-043356], University of Extremadura (Acción III) and MEC-Carlos III Health Institute [grant number FI10/00573] respectively.

REFERENCES

- Baba, Y., Hayashi, K., Fujii, Y., Mizushima, A., Watarai, H., Wakamori, M., Numaga, T., Mori, Y., Iino, M., Hiki, M. and Kurosaki, T. (2006) Coupling of STIM1 to store-operated Ca²⁺ entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 16704–16709 [CrossRef PubMed](#)
- Pani, B., Ong, H. L., Liu, X., Rauser, K., Ambudkar, I. S. and Singh, B. B. (2008) Lipid rafts determine clustering of STIM1 in endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions and regulation of store-operated Ca²⁺ entry (SOCE). *J. Biol. Chem.* **283**, 17333–17340 [CrossRef PubMed](#)
- Zbidi, H., Jardin, I., Woodard, G. E., Lopez, J. J., Berna-Erro, A., Salido, G. M. and Rosado, J. A. (2011) STIM1 and STIM2 are located in the acidic Ca²⁺ stores and associates with Orai1 upon depletion of the acidic stores in human platelets. *J. Biol. Chem.* **286**, 12257–12270 [CrossRef PubMed](#)
- Roos, J., DiGregorio, P. J., Yeromin, A. V., Ohlsen, K., Lioudyno, M., Zhang, S., Satriana, O., Kozak, J. A., Wagner, S. L., Cahalan, M. D. et al. (2005) STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *J. Cell Biol.* **169**, 435–445 [CrossRef PubMed](#)
- Zhang, S. L., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J. A., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Stauderman, K. A. and Cahalan, M. D. (2005) STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane. *Nature* **437**, 902–905 [CrossRef PubMed](#)
- Huang, G. N., Zeng, W., Kim, J. Y., Yuan, J. P., Han, L., Muallem, S. and Worley, P. F. (2006) STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(CRAC) and TRPC1 channels. *Nat. Cell Biol.* **8**, 1003–1010 [CrossRef PubMed](#)
- Muik, M., Fahrner, M., Derler, I., Schindl, R., Bergsmann, J., Frischauf, I., Groschner, K. and Romanin, C. (2009) A cytosolic homomerization and a modulatory domain within STIM1 C terminus determine coupling to Orai1 channels. *J. Biol. Chem.* **284**, 8421–8426 [CrossRef PubMed](#)
- Muik, M., Fahrner, M., Schindl, R., Stathopoulos, P., Frischauf, I., Derler, I., Plenk, P., Lackner, B., Groschner, K., Ikura, M. and Romanin, C. (2011) STIM1 couples to Orai1 via an intramolecular transition into an extended conformation. *EMBO J.* **30**, 1678–1689 [CrossRef PubMed](#)
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S. H., Tanasa, B., Hogan, P. G., Lewis, R. S., Daly, M. and Rao, A. (2006) A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* **441**, 179–185 [CrossRef PubMed](#)
- Peinelt, C., Vig, M., Koosmoa, 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 [CrossRef PubMed](#)
- 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 [CrossRef PubMed](#)
- Soboloff, J., Spassova, M. A., Tang, X. D., Hewavitharana, T., Xu, W. and Gill, D. L. (2006) Orai1 and STIM1 reconstitute store-operated calcium channel function. *J. Biol. Chem.* **281**, 20661–20665 [CrossRef PubMed](#)
- Vig, M., Peinelt, C., Beck, A., Koosmoa, D. L., Rabah, D., Koblan-Huberson, M., Kraft, S., Turner, H., Fleig, A., Penner, R. and Kinet, J. P. (2006) CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca²⁺ entry. *Science* **312**, 1220–1223 [CrossRef PubMed](#)
- Parekh, A. B. and Putney, Jr, J. W. (2005) Store-operated calcium channels. *Physiol. Rev.* **85**, 757–810 [CrossRef PubMed](#)
- Wu, S., Chen, H., Alexeyev, M. F., King, J. A., Moore, T. M., Stevens, T. and Balczon, R. D. (2007) Microtubule motors regulate ISOC activation necessary to increase endothelial cell permeability. *J. Biol. Chem.* **282**, 34801–34808 [CrossRef PubMed](#)
- Wes, P. D., Chevesich, J., Jeromin, A., Rosenberg, C., Stetten, G. and Montell, C. (1995) TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 9652–9656 [CrossRef PubMed](#)
- Zhu, X., Chu, P. B., Peyton, M. and Birbaumer, L. (1995) Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the *Drosophila* trp gene. *FEBS Lett.* **373**, 193–198 [CrossRef PubMed](#)
- Montell, C., Birbaumer, L., Flockerzi, V., Bindels, R. J., Bruford, E. A., Caterina, M. J., Clapham, D. E., Harteneck, C., Heller, S., Julius, D. et al. (2002) A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol. Cell* **9**, 229–231 [CrossRef PubMed](#)

- 19 Venkatchalam, K. and Montell, C. (2007) TRP channels. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 367–417 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 20 Cheng, K. T., Ong, H. L., Liu, X. and Ambudkar, I. S. (2013) Contribution and regulation of TRPC channels in store-operated Ca^{2+} entry. *Curr. Top. Membr.* **71**, 149–179 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 21 Dietrich, A. and Gudermann, T. (2007) TRPC6. *Handb. Exp. Pharmacol.* **179**, 125–141 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 22 Brechard, S., Melchior, C., Plancon, S., Schenten, V. and Tschirhart, E. J. (2008) Store-operated Ca^{2+} channels formed by TRPC1, TRPC6 and Orai1 and non-store-operated channels formed by TRPC3 are involved in the regulation of NADPH oxidase in HL-60 granulocytes. *Cell Calcium* **44**, 492–506 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 23 Jardin, I., Redondo, P. C., Salido, G. M. and Rosado, J. A. (2008) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate enhances store-operated calcium entry through hTRPC6 channel in human platelets. *Biochim. Biophys. Acta* **1783**, 84–97 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 24 Jardin, I., Gomez, L. J., Salido, G. M. and Rosado, J. A. (2009) Dynamic interaction of hTRPC6 with the Orai1/STIM1 complex or hTRPC3 mediates its role in capacitative or non-capacitative Ca^{2+} entry pathways. *Biochem. J.* **420**, 267–276 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 25 Lopez, J. J., Salido, G. M., Pariente, J. A. and Rosado, J. A. (2006) Interaction of STIM1 with endogenously expressed human canonical TRP1 upon depletion of intracellular Ca^{2+} stores. *J. Biol. Chem.* **281**, 28254–28264 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 26 El Boustany, C., Bidaux, G., Enfissi, A., Delcourt, P., Prevarskaya, N. and Capoid, T. (2008) Capacitative calcium entry and transient receptor potential canonical 6 expression control human hepatoma cell proliferation. *Hepatology* **47**, 2068–2077 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 27 Zeng, W., Yuan, J. P., Kim, M. S., Choi, Y. J., Huang, G. N., Worley, P. F. and Muallem, S. (2008) STIM1 gates TRPC channels, but not Orai1, by electrostatic interaction. *Mol. Cell* **32**, 439–448 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 28 Yuan, J. P., Zeng, W., Huang, G. N., Worley, P. F. and Muallem, S. (2007) STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nat. Cell Biol.* **9**, 636–645 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 29 Xu, P., Lu, J., Li, Z., Yu, X., Chen, L. and Xu, T. (2006) Aggregation of STIM1 underneath the plasma membrane induces clustering of Orai1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **350**, 969–976 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 30 Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R. Y. (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**, 3440–3450 [PubMed](#)
- 31 Rosado, J. A., Saavedra, F. R., Redondo, P. C., Hernandez-Cruz, J. M., Salido, G. M. and Pariente, J. A. (2004) Reduced plasma membrane Ca^{2+} -ATPase function in platelets from patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Haematologica* **89**, 1142–1144 [PubMed](#)
- 32 Woodard, G. E., Lopez, J. J., Jardin, I., Salido, G. M. and Rosado, J. A. (2010) TRPC3 regulates agonist-stimulated Ca^{2+} mobilization by mediating the interaction between type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, RACK1, and Orai1. *J. Biol. Chem.* **285**, 8045–8053 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 33 Csutora, P., Peter, K., Kilić, H., Park, K. M., Zarayskiy, V., Gwozdz, T. and Bolotina, V. M. (2008) Novel role for STIM1 as a trigger for calcium influx factor production. *J. Biol. Chem.* **283**, 14524–14531 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 34 Cheng, K. T., Liu, X., Ong, H. L., Swaim, W. and Ambudkar, I. S. (2011) Local Ca^{2+} entry via Orai1 regulates plasma membrane recruitment of TRPC1 and controls cytosolic Ca^{2+} signals required for specific cell functions. *PLoS Biol.* **9**, e1001025 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 35 Katz, B., Oberacker, T., Richter, D., Tzadok, H., Peters, M., Minke, B. and Huber, A. (2013) *Drosophila* TRP and TRPL are assembled as homomultimeric channels *in vivo*. *J. Cell Sci.* **126**, 3121–3133 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 36 Villereal, M. I. (2008) Mechanism and functional significance of TRPC channel multimerization. *Semin. Cell Dev. Biol.* **17**, 618–629 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 37 Redondo, P. C., Jardin, I., Lopez, J. J., Salido, G. M. and Rosado, J. A. (2008) Intracellular Ca^{2+} store depletion induces the formation of macromolecular complexes involving hTRPC1, hTRPC6, the type II IP_3 receptor and SERCA3 in human platelets. *Biochim. Biophys. Acta* **1783**, 1163–1176 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 38 Jardin, I., Lopez, J. J., Zbidi, H., Bartegi, A., Salido, G. M. and Rosado, J. A. (2011) Attenuated store-operated divalent cation entry and association between STIM1, Orai1, hTRPC1 and hTRPC6 in platelets from type 2 diabetic patients. *Blood Cells Mol. Dis.* **46**, 252–260 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 39 Hassock, S. R., Zhu, M. X., Trost, C., Flockert, V. and Authi, K. S. (2002) Expression and role of TRPC proteins in human platelets: evidence that TRPC6 forms the store-independent calcium entry channel. *Blood* **100**, 2801–2811 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 40 Cayouette, S., Lussier, M. P., Mathieu, E. L., Bousquet, S. M. and Boulay, G. (2004) Exocytotic insertion of TRPC6 channel into the plasma membrane upon Gq protein-coupled receptor activation. *J. Biol. Chem.* **279**, 7241–7246 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 41 Albarán, I., Berra-Ero, A., Dionisio, N., Redondo, P. C., Lopez, F., Lopez, J. J., Salido, G. M., Brull Sabate, J. M. and Rosado, J. A. (2014) TRPC6 participates in the regulation of cytosolic basal calcium concentration in murine resting platelets. *Biochim. Biophys. Acta* **1843**, 769–796 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 42 Manji, S. S., Parker, N. J., Williams, R. T., van Stekelenburg, L., Pearson, R. B., Dziadek, M. and Smith, P. J. (2000) STIM1: a novel phosphoprotein located at the cell surface. *Biochim. Biophys. Acta* **1481**, 147–155 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 43 Jardin, I., Lopez, J. J., Redondo, P. C., Salido, G. M. and Rosado, J. A. (2009) Store-operated Ca^{2+} entry is sensitive to the extracellular Ca^{2+} concentration through plasma membrane STIM1. *Biochim. Biophys. Acta* **1793**, 1614–1622 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 44 Yuan, J. P., Lee, K. P., Hong, J. H. and Muallem, S. (2011) The closing and opening of TRPC channels by Homer1 and STIM1. *Acta Physiol. (Oxf)* **204**, 238–247 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 45 Fahmer, M., Derler, I., Jardin, I. and Romanin, C. (2013) The STIM1/Orai signaling machinery. *Channels (Austin)* **7**, 330–343 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 46 Yamai, P., Toth, B., Toth, D. J., Hunyady, L. and Balla, T. (2007) Visualization and manipulation of plasma membrane-endoplasmic reticulum contact sites indicates the presence of additional molecular components within the STIM1-Orai1 complex. *J. Biol. Chem.* **282**, 29678–29690 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 47 Liao, Y., Exleben, C., Abramowitz, J., Flockert, V., Zhu, M. X., Armstrong, D. L. and Birbaumer, L. (2008) Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/Israc channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 2895–2900 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 48 Jardin, I., Lopez, J. J., Salido, G. M. and Rosado, J. A. (2008) Orai1 mediates the interaction between STIM1 and hTRPC1 and regulates the mode of activation of hTRPC1-forming Ca^{2+} channels. *J. Biol. Chem.* **283**, 25296–25304 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 49 Yuan, J. P., Zeng, W., Dorwart, M. R., Choi, Y. J., Worley, P. F. and Muallem, S. (2009) SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels. *Nat. Cell Biol.* **11**, 337–343 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 50 Jha, A., Ahuja, M., Maleth, J., Moreno, C. M., Yuan, J. P., Kim, M. S. and Muallem, S. (2013) The STIM1 CTID domain determines access of SARAF to SOAR to regulate Orai1 channel function. *J. Cell Biol.* **202**, 71–79 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 51 Wang, X., Wang, Y., Zhou, Y., Hendron, E., Mancarella, S., Andrade, M. D., Rothberg, B. S., Soboloff, J. and Gill, D. L. (2014) Distinct Orai-coupling domains in STIM1 and STIM2 define the Orai activating site. *Nat. Commun.* **5**, 3183 [PubMed](#)
- 52 Turner, H., Fleig, A., Stokes, A., Kinet, J. P. and Penner, R. (2003) Discrimination of intracellular calcium store subcompartments using TRPV1 (transient receptor potential channel, vanilloid subfamily member 1) release channel activity. *Biochem. J.* **371**, 341–350 [CrossRef](#) [PubMed](#)
- 53 Lange, I., Yamamoto, S., Parida-Sanchez, S., Mori, Y., Fleig, A. and Penner, R. (2009) TRPM2 functions as a lysosomal Ca^{2+} -release channel in β cells. *Sci. Signal.* **2**, ra23 [PubMed](#)
- 54 Oancea, E., Vriens, J., Brauchi, S., Jun, J., Splawski, I. and Clapham, D. E. (2009) TRPM1 forms ion channels associated with melanin content in melanocytes. *Sci. Signal.* **2**, ra21 [PubMed](#)
- 55 Wang, Y., Deng, X., Mancarella, S., Hendron, E., Eguchi, S., Soboloff, J., Tang, X. D. and Gill, D. L. (2010) The calcium store sensor, STIM1, reciprocally controls Orai and Cav1.2 channels. *Science* **330**, 105–109 [CrossRef](#) [PubMed](#)

Received 23 April 2014/14 July 2014; accepted 4 August 2014

Published as BJ Immediate Publication 4 August 2014, doi:10.1042/BJ20140523

DISCUSIÓN

El ión Ca^{2+} es el mensajero intracelular más ampliamente distribuido ya que es el único ión metálico que tiene la capacidad de ejercer esta función, y dicha propiedad metálica le confiere la ventaja, con respecto al resto de mensajeros intracelulares, de que no requiere gasto energético puesto que no es necesaria su síntesis ni biotransformación. Es por ello que la señalización debida a este ión es producida por cambios en su concentración citosólica, lo cual ejerce un control sobre una gran diversidad de procesos celulares como la contracción muscular, la agregación plaquetaria o incluso pudiendo provocar en la célula un hecho tan determinante como la muerte por apoptosis.

Debido a ello, la homeostasis intracelular del Ca^{2+} está finamente regulada por una serie de mecanismos entre los que encuentra la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular. La entrada de Ca^{2+} en células no eléctricamente excitables se produce a través de distintas vías, entre las que destaca el mecanismo de ECC, un proceso regulado por el estado de relleno de los almacenes intracelulares de Ca^{2+} , que se activa cuando estos son vaciados, y se inactiva una vez han sido rellenos (Putney 1986). Desde su descubrimiento en 1986 numerosas investigaciones se han dirigido a esclarecer los mecanismos que participan en este tipo de entrada de Ca^{2+} . Los homólogos de los canales TRP de *Drosophila* en mamíferos desempeñan un papel importante en la función celular, puesto que permiten la conducción de corrientes catiónicas a través de las membranas celulares. Concretamente, se ha destacado la importancia de estos canales en la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular. Los primeros estudios sugerían que los TRP (y sobre todo los de la subfamilia TRPC) mediaban la entrada de Ca^{2+} . Años después, con el descubrimiento de STIM1 como sensor de Ca^{2+} del RE (Roos et al. 2005; Zhang et al. 2005) y del canal Orai1 como responsable de las corrientes I_{CRAC} (Feske et al. 2006), los TRPC fueron considerados como mediadores de las corrientes I_{SOC} , un tipo de corriente menos selectiva para el ión Ca^{2+} .

No obstante, además del papel ionotrópico de estos canales TRP, estudios recientes han puesto de manifiesto que participan también en la regulación de distintos mecanismos de señalización del Ca^{2+} intracelular. Por ejemplo, el canal TRPC1 puede actuar como modulador negativo de la entrada de Ca^{2+} a través del canal TRPV6 mediante la atenuación de la expresión de éste (Schindl et al. 2012). En el desarrollo de esta tesis doctoral, hemos puesto de manifiesto que el canal TRPA1 podría estar implicado en la regulación de la ECC por su implicación en la regulación del principal complejo molecular involucrado directamente en dicho mecanismo. Estos hallazgos, llevados a cabo en megacariocitos, fueron realizados mediante dos estrategias experimentales diferentes: el silenciamiento de la expresión de TRPA1 mediada por la maduración celular inducida experimentalmente con PMA, y la

inhibición farmacológica de éste. No obstante, aunque no podemos confirmar que la maduración celular en sí misma produce un incremento de la ECC, la inhibición farmacológica del canal tiene el mismo efecto, lo que sugiere que el incremento anteriormente descrito podría ser, al menos parcialmente, dependiente de TRPA1.

El análisis posterior de los mecanismos de homeostasis intracelular de Ca^{2+} utilizando el inhibidor farmacológico de TRPA1, HC-030031, evidenció que dicha sustancia no altera la capacidad de acumular Ca^{2+} en los almacenes intracelulares o la habilidad de los agonistas para liberarlo puesto que el tratamiento de células MEG01 con el inhibidor farmacológico no produjo alteración alguna en la liberación de Ca^{2+} inducida por trombina ni en la liberación pasiva inducida por TG.

Uno de los principales acontecimientos en la activación de la ECC es la asociación de las proteínas STIM1 y Orai1 que tiene lugar tras el vaciamiento de los depósitos intracelulares y la consecuente multimerización de STIM1 (Huang et al. 2006; Muik et al. 2009). Estudios enfocados a identificar la posible implicación del canal TRPA1 en la ECC demostraron que TRPA1 regula negativamente la asociación STIM1-Orai1 independiente de Ca^{2+} . La regulación de complejos de señalización por TRPA1 se asemeja a otros previamente descritos, como es el caso de TRPC3, que recluta subunidades de Orai1, STIM1, RACK1 e IP_3RI formando un macrocomplejo que regula la liberación de Ca^{2+} inducida por agonistas y la entrada de Ca^{2+} en células HEK293. En estos estudios hemos visto que TRPA1 se asocia de forma constitutiva con las principales proteínas implicadas en la ECC, STIM1 y Orai1, y que dicho acoplamiento es incrementado tras la estimulación celular con agonistas. Los resultados indican que tanto la reducción de la expresión proteica como la inactivación farmacológica de TRPA1 dan lugar a un incremento significativo en la asociación de STIM1-Orai1 en células estimuladas con agonistas fisiológicos, poniendo de manifiesto que el papel regulador de TRPA1 sobre la ECC se puede llevar a cabo, al menos, mediante la atenuación de la asociación entre las proteínas STIM1 y Orai1, necesaria para el adecuado funcionamiento de la ECC.

El papel de TRPA1 como modulador de la ECC desaparece con la maduración celular, y por ello las plaquetas maduras no expresan este canal a nivel de proteína, aunque conservan el ARN mensajero de sus precursores megacariocíticos. Debido al carácter inhibidor de TRPA1, y a la disminución de su expresión con la maduración celular, en plaquetas se observa una ECC mucho más notoria tras el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} con respecto de la que se produce en células MEG01, producida por una mayor interacción de STIM1 y Orai1.

En consonancia con otros estudios que también han demostrado que algunas proteínas implicadas en la homeostasis intracelular de Ca^{2+} como el canal TPC2 (Lopez et al. 2012b), las bombas de la familia SERCA (Lopez et al. 2008; Bobe et al. 2011) o el canal TRPC3 (Bandyopadhyay et al. 2008; Woodard et al. 2010) modulan la ECC en diferentes tipos celulares, este estudio demuestra la regulación de dicho mecanismo por TRPA1. No obstante, no podemos establecer fehacientemente el mecanismo por el cual TRPA1 reduce la asociación entre las proteínas implicadas en la ECC; aunque sea especulativo, suponemos que podría deberse a que el TRPA1 es capaz de unir, y por lo tanto secuestrar, subunidades de STIM1 y Orai1 reduciendo las posibilidades de interacción entre ambas proteínas.

Este estudio presenta una nueva e interesante función de TRPA1 en la homeostasis de Ca^{2+} no asociada con la función sensorial termo-química conocida hasta la fecha, y debería por tanto ser tomada en cuenta como posible diana terapéutica en el diseño de nuevos fármacos destinados a la modificación de la entrada de Ca^{2+} en las células.

Además de la modulación de la ECC por proteínas implicadas en la homeostasis intracelular de Ca^{2+} , existen diversos mecanismos que pueden influir en su regulación. Es el caso por ejemplo de diferentes parámetros físicos como la temperatura (Xiao et al. 2011) y el estado redox (Bogeski et al. 2010), o por modificaciones postraduccionales como la fosforilación (Lopez et al. 2012a) o proteínas adaptadoras (Jardin et al. 2012).

Algunos estudios realizados por otros laboratorios sugieren que la actividad de Orai1 puede verse inhibida por condiciones oxidantes, mientras que otras proteínas, como es el caso de TRPC6 pueden ser activadas por ROS (Bogeski et al. 2010; Graham et al. 2010). En linfocitos maduros, la presencia de ROS produce el reemplazamiento de Orai1 por Orai3, insensible a ROS, para evitar la disminución de la actividad linfocitaria en tejidos inflamados, en los que se dan condiciones oxidantes. Del mismo modo, se ha demostrado que Orai1 es sensible a pH por lo que su actividad disminuye en condiciones de pH ácido (Scrimgeour et al. 2012). Puesto que Orai1 y TRPC6 son las principales proteínas implicadas en la entrada capacitativa y no capacitativa de Ca^{2+} respectivamente, nos pareció razonable postular que en determinadas condiciones TRPC6 podría suponer una vía alternativa de entrada de Ca^{2+} en caso de que la actividad de Orai1 pudiera estar atenuada, como sucede en condiciones ácidas u oxidantes (Krotz et al. 2004), hemorragias (Potsch et al. 2011), o enfermedades tales como el síndrome metabólico (Green et al. 1978), sangrados masivos (Morange et al. 2013) o diabetes mellitus (Jardin et al. 2006).

Por ello, el siguiente estudio de esta tesis doctoral, se encaminó a investigar si estas situaciones podrían modular la función del canal TRPC6. TRPC6 es un canal catiónico permeable a Ca^{2+} , aunque de forma no selectiva, perteneciente a la superfamilia de TRP cuya expresión es abundante en numerosos tipos celulares entre los que se incluyen plaquetas, células musculares, células renales o leucocitos (Aguade et al. 1989; Dietrich et al. 2007; Jardin et al. 2008b). Tradicionalmente, TRPC6 fue descrito como canal operado por el segundo mensajero DAG, aunque en la actualidad también existen varias investigaciones que han propuesto la participación de TRPC6 en el mecanismo de la ECC (Jardin et al. 2008b). De acuerdo a la propiedad de TRPC6 como canal no capacitativo, se ha demostrado que se asocia con TRPC3 en regiones de la membrana plasmática independientemente de las balsas lipídicas, que es donde normalmente se localizan los macrocomplejos capacitativos. Sin embargo, tras el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} , TRPC6 se disocia de TRPC3 e interacciona con STIM1, Orai1 y TRPC1, lo cual hace suponer que TRPC6 funciona como punto de convergencia entre ambos tipos de entrada de Ca^{2+} en plaquetas (Redondo et al. 2008; Jardin et al. 2009a; Berna-Erro et al. 2012). Puesto que se conoce que su función es relevante en procesos como la contracción del músculo liso e incluso en enfermedades como la glomeruloesclerosis focal segmental, en este trabajo exploramos el papel de TRPC6 en plaquetas murinas bajo diferentes condiciones experimentales, como la acidez, la exposición a ROS o la simulación de condiciones de hipoxia, similares a las que pueden producirse en el organismo en determinadas circunstancias o enfermedades.

Este estudio fue realizado en plaquetas murinas de animales salvajes o TRPC6 KO. Los resultados obtenidos indicaron que en condiciones normales la expresión proteica de TRPC6 no es necesaria para una correcta movilización de Ca^{2+} ni para la óptima agregación plaquetaria inducidas por trombina o por TG. Sin embargo, TRPC6 desempeña una función importante en la entrada no capacitativa de Ca^{2+} inducida por OAG, aunque esta función no tiene repercusión en la agregación plaquetaria.

Por otra parte, la exposición a ROS o a condiciones que simulan un estado de hipoxia mediante el secuestro del hierro del medio, no altera la agregación plaquetaria inducida por agonistas, poniendo de manifiesto que TRPC6 es insensible a ambas condiciones. Sin embargo, sí que presenta sensibilidad a las condiciones de acidez, viéndose afectada la agregación plaquetaria. En este caso, la respuesta al vaciamiento de los depósitos inducido por trombina o TG disminuye pero no desaparece. Dado que experimentalmente demostramos que la trombina *per se* no se inactiva a pH ácido, los resultados obtenidos podrían indicar que los

receptores de trombina en las plaquetas de ratón o las moléculas señalizadoras que se encuentran por encima del DAG e IP₃ en la cascada de señalización son sensibles al pH ácido.

Sin embargo, los resultados más significativos fueron obtenidos al estimular las células con OAG. Es interesante desatacar que a pesar de que la agregación plaquetaria inducida por OAG está afectada en todos los animales, WT o TRPC6 KO, este efecto es mucho más evidente en los animales WT, sugiriendo que el canal TRPC6 podría inactivarse a pH ácido. Analizando la entrada de Ca²⁺ a pH ácido se observó que en animales KO la entrada de Ca²⁺ restante mediada por OAG era insensible al pH. Este último hallazgo nos hizo postular que la entrada de Ca²⁺ presenta dos componentes: uno sensible a pH, que consiste o contiene las subunidades de TRPC6, y otro insensible a pH, aún sin identificar.

La función de TRPC6 en plaquetas de ratón fue estudiada también en otros laboratorios utilizando ratones transgénicos que carecen de TRPC6 funcional (Paez Espinosa et al. 2012; Ramanathan et al. 2012; Harper et al. 2013). Sin embargo, no se pudo esclarecer completamente la implicación del canal en la función celular dado que se obtuvieron resultados contradictorios en los diferentes grupos de investigación (Authi 2007). De hecho, la mayoría de los estudios acerca de las funciones de los diferentes TRPC han generado numerosas controversias, lo que sugiere que la regulación de este tipo de canales es bastante compleja, y que probablemente sea específica del tipo celular estudiado. Por todo ello, la función de TRPC6 debe continuar siendo estudiada.

Como se ha indicado anteriormente, tres grupos de investigación diferentes han realizado estudios acerca de TRPC6 utilizando animales KO e incluso uno de ellos ha mostrado datos experimentales en relación a la [Ca²⁺]_c basal de plaquetas en reposo (Ramanathan et al. 2012). Ramanathan y colaboradores encontraron un ligero descenso no significativo en la [Ca²⁺]_c basal en plaquetas en reposo aisladas de animales deficientes en TRPC6. Nuestros resultados sin embargo, muestran una [Ca²⁺]_c basal disminuida en un 18.73% en plaquetas deficientes en TRPC6. Estas diferencias podrían ser explicadas por varias razones: 1) la varianza intrínseca generada por la diferente trayectoria genética existente entre las cepas de ratones utilizadas en los diferentes estudios. El grupo de Ramanathan utilizó un modelo murino produciendo un alelo de TRPC6 silenciado generado por la inserción de un cassette de selección que reemplazaba al exón 7, mientras que nuestra cepa fue generada insertando un cassette de selección en el exón 4; 2) Los diferentes protocolos usados por ambos grupos para el aislamiento de plaquetas previo a las medidas de la [Ca²⁺]_c. La ausencia total de Ca²⁺ durante el proceso de aislamiento de las plaquetas es imprescindible para evitar su activación

espontánea y posible alteración de los resultados obtenidos. Sin embargo, esta condición podría tener un efecto en la homeostasis del Ca^{2+} puesto que se sabe que la concentración de Ca^{2+} extracelular condiciona la actividad de TRPC6 (Jung et al. 2002; Shi et al. 2004). Además, se ha observado que en plaquetas también se expresa el receptor que actúa como sensor del Ca^{2+} extracelular (CaR, también conocido como CASR) (House et al. 1997). CaR es un receptor de membrana sensible a la $[\text{Ca}^{2+}]$ extracelular cuya actividad se ha demostrado que está relacionada con la del canal TRPC6 en miocitos ventriculares de ratas neonatas (Sun et al. 2010). Para evitar que la función plaquetaria se viera alterada debido a la ausencia de Ca^{2+} durante el aislamiento de las células, las preincubamos en presencia de 50 μM de Ca^{2+} durante 5 minutos a 37°C previamente a la realización de los experimentos. La concentración utilizada durante esta preincubación se considera suficiente para evitar la activación espontánea de las plaquetas, evitar cualquier alteración de la actividad de TRPC6 y permitir la compensación de la posible pérdida del Ca^{2+} almacenado en los depósitos intracelulares durante el proceso de aislamiento. Adicionalmente, evitamos la entrada de Ca^{2+} activada espontáneamente por la liberación pasiva de Ca^{2+} por agonistas secundarios como el tromboxano o el ADP, añadiendo en la suspensión celular inhibidores de las ciclooxigenasas como el ácido acetilsalicílico o apirasa respectivamente.

Las variaciones en los protocolos junto con el elevado número de repeticiones realizadas ($n \geq 26$) debido a las pequeñas diferencias encontradas que se llevaron a cabo en nuestro grupo con respecto del grupo de Ramanathan podrían explicar las diferencias halladas en nuestro estudio.

Nuestros resultados demuestran la presencia de TRPC6 tanto en la membrana plasmática como en la de las organelas internas. El hecho de que la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ encontrada en ausencia y en presencia de Ca^{2+} extracelular sea similar indica que la fracción de TRPC6 localizada en la membrana celular no está implicada en la reducción de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ observada en plaquetas de animales KO, pero sí podría estarlo la fracción localizada en las membranas internas. Esta afirmación también se basa en la reducida liberación pasiva de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares observada en animales KO con respecto de los WT. Además, puesto que el escape pasivo de los orgánulos fue medido tras la inhibición de SERCA, podemos suponer que la fracción intracelular de TRPC6 se localiza en los depósitos intracelulares sensibles a agonistas. El fraccionamiento subcelular nos permitió identificar TRPC6 en las fracciones enriquecidas en RE, en las cuales se testó la ausencia de PMCA para descartar la posible contaminación con fracciones de la membrana plasmática.

Por todo lo anteriormente descrito, podemos afirmar que TRPC6 podría tener una actividad basal en plaquetas en reposo y una función de regulación de la $[Ca^{2+}]_c$ basal. Esta hipótesis ha sido propuesta también por otros grupos de investigación. Por ejemplo, en células HEK293 en reposo se ha descrito mediante patch-clamp una actividad basal de TRPC6 (Dietrich et al. 2003). Asimismo, en la misma investigación se observó que la glicosilación de TRPC6, un mecanismo implicado en el correcto plegado de las proteínas, es la principal responsable de la regulación de la actividad de TRPC6 en estado basal, ya que la eliminación de los sitios de glicosilación mediante mutaciones puntuales incrementa en gran medida su actividad. Del mismo modo, otro estudio realizado en células musculares lisas de arteria mesentérica de conejo mostró que la función de TRPC6 depende de la $[Ca^{2+}]_c$ (Shi et al. 2010). Los registros de patch clamp obtenidos pusieron de manifiesto que la actividad de TRPC6 inducida por angiotensina II se incrementó hasta 5 veces en presencia del quelante intracelular de Ca^{2+} BAPTA en comparación con las células sin tratar, mientras que una $[Ca^{2+}]_c$ aumentada inhibió la actividad de TRPC6 inducida por angiotensina II, lo cual demuestra que la actividad de TRPC6 es sensible a la $[Ca^{2+}]_c$ como se esperaría de cualquier mecanismo destinado a la regulación de la $[Ca^{2+}]_c$ basal. También se ha descrito que la CaM interacciona y regula negativamente TRPC6, y que dicha interacción depende de la $[Ca^{2+}]_c$, puesto que elevadas concentraciones de Ca^{2+} promueven este acoplamiento (Boulay 2002; Kwon et al. 2007; Friedlova et al. 2010; Dionisio et al. 2011). En definitiva, nuestro trabajo evidencia el papel de TRPC6 en el mantenimiento de la $[Ca^{2+}]_c$ basal como un canal que permite el escape pasivo del ión cuando se encuentra localizado en las membranas de los almacenes intracelulares de Ca^{2+} sensibles a agonistas.

Como hemos mencionado con anterioridad, TRPC6 se ha considerado clásicamente como un canal activado por DAG, aunque investigaciones recientes han aportado nuevas evidencias acerca del papel de TRPC6 en la ECC, e incluso se ha propuesto que puede funcionar de un modo o de otro en función del mecanismo de activación en un mismo tipo celular. Las hipótesis actuales defienden la formación de un macrocomplejo señalizador formado por las proteínas STIM1, Orai y TRPC en la conducción de la corriente I_{SOc} (Jardin et al. 2008a; Liao et al. 2008; Desai et al. 2015), e incluso la autorregulación que puede producirse entre ellas. Es el caso por ejemplo de STIM1, que puede regular TRPC1, TRPC4 y TRPC5 mediante interacción directa (Huang et al. 2006), y modular TRPC3 y TRPC6 promoviendo su heteromultimerización con TRPC1 y TRPC4 respectivamente (Yuan et al. 2007). Además, el último trabajo que constituye esta tesis doctoral ha puesto de manifiesto que la proteína STIM1 desempeña un papel fundamental en la regulación de TRPC6, pudiendo modificar su localización subcelular.

Los resultados obtenidos en esta investigación han demostrado que la expresión transitoria de STIM1 en células que de forma nativa tienen una cantidad indetectable de ella, consigue establecer una ECC y atenuar significativamente la expresión del canal TRPC6 en la membrana plasmática. No obstante, la expresión de STIM1 no produjo ninguna modificación destacable en la expresión de TRPC1, TRPC3 y Orai1 en la superficie celular. Asimismo, y confirmando resultado previamente publicados por Muallem y colaboradores (Zeng et al. 2008), hemos observado que la expresión de STIM1 favorece la interacción de TRPC1 con TRPC3, al tiempo que disminuye la asociación de TRPC6 con TRPC1 y con TRPC3.

La disminución de la expresión de TRPC6 en la membrana plasmática es consecuencia de su traslocación a las membranas intracelulares del RE, y ello tiene como resultado la atenuación de la ENCC dependiente de TRPC6. Aunque las proteínas TRP se encuentran localizadas principalmente en la membrana plasmática, varios canales TRP como TRPM1, TRPM2 o TRPV1 pueden localizarse en las membranas intracelulares e incluso mantener su función de canal iónico (Turner et al. 2003; Lange et al. 2009; Oancea et al. 2009). Del mismo modo, y como se ha discutido anteriormente TRPC6 puede localizarse también en membranas internas en plaquetas de ratón actuando como canal pasivo de liberación de Ca^{2+} desde el depósito intracelular. Los resultados obtenidos en este trabajo ponen de manifiesto que en células que carecen de STIM1, no se detecta TRPC6 en la membrana del RE, mientras que en células donde se ha expresado STIM1 se observan cantidades significativas de TRPC6, lo cual sugiere que STIM1 podría inducir la traslocación de TRPC6 desde la membrana plasmática hacia la membrana del RE. La expresión de TRPC6 en la membrana del RE produjo además un aumento significativo del escape pasivo de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares sensibles a TG (probablemente el RE), y un leve incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ basal. Estos resultados concuerdan por tanto con los discutidos anteriormente obtenidos en plaquetas murinas de animales TRPC6 KO.

La actividad de TRPC6 en el RE parece ser constitutiva, y por tanto debería ser compensada por un incremento similar en la actividad de SERCA, puesto que no se han observado diferencias en la capacidad de almacenar Ca^{2+} en el interior del RE de células que no expresan STIM1 con respecto de aquellas que sí lo hacen.

Podemos concluir por tanto, que STIM1 tiene un papel importante en la regulación de la localización de TRPC6. STIM1 es definido fundamentalmente como el sensor de Ca^{2+} del RE que activa la ECC, sin embargo también se ha descrito que participa en la supresión de otras vías de entrada de Ca^{2+} , como por ejemplo la entrada de Ca^{2+} activada por voltaje mediante la

regulación de canales Cav1.2 (Wang et al. 2010; Dionisio et al. 2015). Nuestros resultados podrían explicarse en consecuencia como un mecanismo regulador similar, mediado por STIM1 y dirigido a eliminar la entrada de Ca^{2+} operada por segundos mensajeros a través de TRPC6. Además, la localización funcional de TRPC6 en la membrana del RE podría estar implicada en la captación de Ca^{2+} por parte de dicho depósito.

The Ca^{2+} ion is the most widely distributed intracellular messenger as it is the only metal ion with the ability to perform this function. That metal property gives the advantage, over the rest of intracellular messengers, that does not require energy consumption since its biotransformation and synthesis is not necessary. That is why the signalization due to Ca^{2+} ion is produced by changes in $[\text{Ca}^{2+}]_c$, which exercises control over a wide variety of cell processes like muscle contraction, platelet aggregation and even cell death or apoptosis.

As a result, intracellular Ca^{2+} homeostasis is tightly regulated by several mechanisms including Ca^{2+} influx from the extracellular medium. Ca^{2+} entry in non-excitabile cells occurs through different pathways, including SOCE, a process regulated by the filling state of the intracellular Ca^{2+} stores, which is activated upon store depletion and inactivated once they have been filled (Putney 1986). Since its discovery in 1986, a large number of investigations have been directed to elucidate the mechanisms involved in this Ca^{2+} entry. Mammalian homologues of *Drosophila* TRP channels play a relevant role in cell function, as they allow the passage of cation currents through cell membranes. Specifically, the importance of these channels in Ca^{2+} entry from the extracellular medium has been highlighted. Early studies suggested that TRP (and especially those of the TRPC subfamily) mediated Ca^{2+} entry. In the years thereafter, with the discovery of STIM1 as Ca^{2+} sensor of the ER (Roos et al. 2005; Zhang et al. 2005) and Orai1 channel as the responsible for the I_{CRAC} currents (Feske et al. 2006), TRPC channels were considered to be mediators of I_{SOC} currents, a type of current less selective for Ca^{2+} .

Even so, besides the ionotropic role of these TRP channels, recent studies have revealed that they also are involved in the regulation of several signalling mechanisms of intracellular Ca^{2+} , and specifically in the regulation of Ca^{2+} movements through other channels. For instance, TRPC1 negatively modulates Ca^{2+} entry through TRPV6 by attenuating its expression (Schindl et al. 2012). In the experiments carried out in this Thesis, we demonstrated that TRPA1 might be involved in SOCE regulation by means of regulation of the main protein complex directly involved on it, consisting of STIM1 and Orai1. These findings, carried out in megakaryocytes were performed using two different experimental approaches: silencing the expression of TRPA1 as a result of cell maturation experimentally induced with PMA, as well as inactivation of TRPA1 function using pharmacological tools. However, although we can not confirm that cell maturation itself causes SOCE enhancement, pharmacological inhibition of the channel has the same effect, suggesting that the increase described above may be at least partially dependent on TRPA1.

Further analysis of the regulatory mechanisms of Ca^{2+} homeostasis using the TRPA1 specific pharmacological inhibitor, HC-030031, showed that the substance does not alter the ability to accumulate Ca^{2+} into the intracellular stores or the agonist ability to induce Ca^{2+} release since MEG01 treatment with the inhibitor did not alter thrombin-induced Ca^{2+} release or passive leak induced by TG.

One of the main events in SOCE activation is the association of Orai1 and STIM1 proteins that occurs upon store depletion and the subsequent multimerization of STIM1 (Huang et al. 2006; Muik et al. 2009). Studies focused on identifying the possible role of TRPA1 in SOCE have demonstrated that TRPA1 negatively regulates the Ca^{2+} independent STIM1-Orai1 coupling. The regulation of signalling complexes by TRPA1 is similar to other previously described, as is the case of TRPC3, which recruits subunits of Orai1, STIM1, RACK1 and IP_3RI into a signalplex which regulates agonist-induced Ca^{2+} release and Ca^{2+} influx in HEK293 cells (Bandyopadhyay et al. 2008; Woodard et al. 2010). In these studies we have found that TRPA1 is constitutively associated to STIM1 and Orai1, and this coupling increases after agonist cell stimulation. The results indicate that both downregulation of protein expression as pharmacological inactivation of TRPA1 significantly enhanced STIM1-Orai1 association in stimulated cells. This leads us to believe that regulatory role of TRPA1 in SOCE can be carried out by attenuating coupling between STIM1 and Orai1, which is necessary for the good working of SOCE.

The role of TRPA1 as a SOCE modulator disappears with cell maturation and therefore mature platelets do not express the channel at protein level, while retaining its messenger RNA from the megakaryocytic precursors. Due to the inhibitor character of TRPA1, and the downregulation of TRPA1 protein expression after cell maturation, a greater SOCE has been shown in mature human platelets compared to megakaryocytes in similar conditions, presumably produced by a higher interaction between STIM1 and Orai1.

Consistent with other studies that have also shown some proteins related to Ca^{2+} homeostasis as TPC2 (Lopez et al. 2012b), SERCA pumps family (Lopez et al. 2008; Bobe et al. 2011) or TRPC3 channel (Bandyopadhyay et al. 2008; Woodard et al. 2010) modulating SOCE in different cell types, this study reports the regulation of this mechanism by TRPA1. However, it is impossible to ascertain the mechanism by which TRPA1 reduces the association between the major proteins involved in SOCE; though this is speculative, we assume that it could be because the TRPA1 is able to bind, and therefore recruit, STIM1 and Orai1 subunits reducing the chances of interaction between them.

This research presents a new and interesting TRPA1 function in Ca^{2+} homeostasis not linked to the previously reported thermal and noxious sensitivity, and it should be taken into account as a possible target in the design of new drugs addressed to modify Ca^{2+} entry into cells.

In addition to SOCE modulation by proteins involved in intracellular Ca^{2+} homeostasis, several mechanisms might influence its regulation. This is the case for physical parameters such as temperature (Xiao et al. 2011) and redox state (Bogeski et al. 2010), or by post-translational modifications such as phosphorylation (Lopez et al. 2012a) or the effect of adaptor proteins (Jardin et al. 2012).

Studies performed by other laboratories suggest that Orai1 activity can be inhibited by oxidizing conditions, while other proteins, as is the case with TRPC6, which might be activated by ROS (Bogeski et al. 2010; Graham et al. 2010). In mature lymphocytes, ROS generate Orai1 replacement by Orai3, which is insensitive to ROS, to prevent attenuation of lymphocyte function in inflamed tissues, in which oxidizing conditions exist. Similarly it has been shown that Orai1 is sensitive to pH, and thus it reduces its activity at acidic conditions (Scrimgeour et al. 2012). Since Orai1 and TRPC6 are the main proteins involved in capacitative and non capacitative Ca^{2+} entry respectively, we found reasonable to postulate that under certain situations TRPC6 could be an alternative pathway of Ca^{2+} influx in case Orai1 activity could be attenuated, as in acidic or oxidizing conditions (Krotz et al. 2004), hemorrhage (Potzsch et al. 2011), or diseases such as metabolic syndrome (Green et al. 1978), massive bleedings (Morange et al. 2013) or diabetes mellitus (Jardin et al. 2006).

Therefore, the following study of this dissertation was directed to investigate whether these situations might modulate TRPC6 function. TRPC6 is a non selective cation channel belonging to TRP superfamily widely expressed in many cell types including platelets, muscle cells, kidney cells or leukocytes (Aguade et al. 1989; Dietrich et al. 2007; Jardin et al. 2008b). Originally, TRPC6 was described as a second messenger DAG-operated channel, although currently several studies have also proposed TRPC6 participation in SOCE (Jardin et al. 2008b). According to this new feature, TRPC6 has been shown to be associated with TRPC3 in plasma region regardless lipid rafts, where capacitative macrocomplex are usually located. However, TRPC6 dissociates TRPC3 and interacts to STIM1, Orai1 and TRPC1, thus suggesting that TRPC6 might act as a point of convergence between capacitative and non capacitative Ca^{2+} entry (Redondo et al. 2008; Jardin et al. 2009a; Berna-Erro et al. 2012). Since it is well known the pivotal role of TRPC6 in processes such as smooth muscle contraction and even disorders like

focal segmental glomerulosclerosis, we explored its possible involvement in murine platelets under certain conditions similar to those that may occur in the body at certain circumstances or some diseases.

This study was performed in murine platelets from wild type or TRPC6 KO mice. Results showed that at normal conditions TRPC6 protein expression is not required for proper Ca^{2+} mobilization or for optimal platelet aggregation induced either by thrombin or TG. However, TRPC6 plays an important role in non capacitative Ca^{2+} entry induced by OAG, although this function has no effect on platelet aggregation.

Moreover, exposure to ROS or conditions simulating a state of hypoxia by sequestering iron ions do not alter the agonist-induced platelet aggregation, showing that TRPC6 is insensitive to both conditions. However, TRPC6 seems to be sensitive to acidic conditions, as platelet aggregation is affected. In this case, response to TG or thrombin-induced store depletion decreases but not was abolished. Since we demonstrated that thrombin *per se* was not inactivated at low pH, the results may indicate that thrombin receptor in mouse platelets or signaling molecules which are located upstream of DAG and IP3 in the signaling cascade are sensitive to acidic pH.

Even so, the most significant results were discovered through the second messenger OAG, a DAG analog. Interestingly, although platelet aggregation induced by OAG is attenuated in WT and KO mice, this effect is much more evident in WT mice, suggesting that TRPC6 could be inactivated at low pH. The remaining OAG-mediated Ca^{2+} entry in KO animals was observed to be insensitive to pH. This latter finding made us postulate that Ca^{2+} influx has two components: one sensitive to pH, consisting or containing TRPC6 subunits, and a second one insensitive to pH, still unidentified.

TRPC6 function in murine platelets was also studied in other laboratories using transgenic mice lacking functional TRPC6 (Paez Espinosa et al. 2012; Ramanathan et al. 2012; Harper et al. 2013). However, it was not possible to fully clarify TRPC6 function due to conflicting results obtained in the different research groups (Authi 2007). In fact, most of studies regarding the role of TRPCs function have generated much controversy, suggesting that regulation of these channels is rather complex, and it is probably to be specific on the cell type. Therefore, the function should continue to be studied TRPC6.

As mentioned above, three different research groups have performed studies about TRPC6 using KO animals and even one of them have shown experimental data relating to

$[Ca^{2+}]_c$ of resting platelets (Ramanathan et al. 2012). Ramanathan and colleagues found a slight non-significant decrease in $[Ca^{2+}]_c$ of resting platelets isolated from TRPC6 deficient animals. Our results however show a $[Ca^{2+}]_c$ basal decreased in 18.73% TRPC6 deficient platelets. These differences could be explained by several reasons: 1) the intrinsic variance generated by the different genetic background between different strains of mice used in the different studies. Ramanathan's group used a murine model whose silencing was generated by insertion of a selection cassette which replaced the exon 7, whereas our strain was generated by inserting a selection cassette in exon 4; 2) The protocols used by both groups in order to isolate platelets prior to measurements of $[Ca^{2+}]_c$. The total absence of Ca^{2+} during the platelets isolation is essential to prevent spontaneous activation and possible alteration of results. However, this condition could have an effect on Ca^{2+} homeostasis since it is known that the concentration of extracellular Ca^{2+} may alter TRPC6 activity (Jung et al. 2002; Shi et al. 2004). Furthermore, receptor acting as extracellular Ca^{2+} sensor (CaR, also known as CASR) has been reported to be expressed in platelets (House et al. 1997). CaR is a surface receptor sensitive to extracellular Ca^{2+} concentration whose activity has been demonstrated to be related to TRPC6 in ventricular myocytes of neonatal rats (Sun et al. 2010). In order to prevent disturbance of platelet function due to Ca^{2+} absence during cell isolation, we preincubated them with 50 μ M Ca^{2+} for 5 minutes at 37 °C prior to performing the experiments. This concentration is considered enough to prevent spontaneous platelet activation, to prevent any alteration on TRPC6 activity and to compensate the possible loss of stored Ca^{2+} from intracellular stores during the isolation. Additionally, we avoid the Ca^{2+} influx spontaneously activated by passive leak of Ca^{2+} due to secondary agonists such as thromboxane or ADP, by adding specific inhibitors such as aspirin or apyrase respectively.

Variations in protocols together with the high number of experiments ($n \geq 26$) performed due to small differences observed by our group with respect to Ramanathan's one might explain the differences found in our study.

Our results demonstrate the presence of TRPC6 both in the plasma membrane and in internal organelles. The similar $[Ca^{2+}]_c$ found in the absence and presence of extracellular Ca^{2+} indicates that TRPC6 fraction located on the plasma membrane is not involved in the decreased $[Ca^{2+}]_c$ observed in KO platelets, but the fraction located in the internal membranes could be. This statement is also based on the reduced passive Ca^{2+} leak from the intracellular stores observed in KO mice with respect to WT. In addition, since the passive leak from organelles was measured after SERCA inhibition, we can assume that the intracellular fraction of TRPC6 is located on agonist-sensitive intracellular stores. The subcellular fractionation

allowed us to identify TRPC6 in ER-enriched fractions, in which the absence of PMCA was tested to rule out possible contamination with the plasma membrane fractions.

For all these reasons, we postulate that TRPC6 might have a basal activity in resting platelets and a function of basal $[Ca^{2+}]_c$ regulation. This hypothesis was also proposed by other research groups. For instance, a basal TRPC6 activity has been proved by patch-clamp in resting HEK293 cells (Dietrich et al. 2003). Additionally in the same study, TRPC6 glycosylation, a mechanism involved in the proper protein folding, was found to be responsible for regulating TRPC6 basal activity, as deletion of this glycosylation sites by point mutations greatly increases its activity. Similarly, another study on smooth muscle cells of rabbit mesenteric artery showed that TRPC6 function depends on the $[Ca^{2+}]_c$ (Shi et al. 2010). Patch clamp records obtained in these cells showed that TRPC6 activity induced by angiotensin II increased five-fold in the presence of intracellular chelator Ca^{2+} BAPTA compared to untreated cells, whereas an increased $[Ca^{2+}]_c$ inhibited TRPC6 activity induced by angiotensin II, revealing that TRPC6 activity is sensitive $[Ca^{2+}]_c$ as it would be expected of any mechanism addressed to the regulation of basal $[Ca^{2+}]_c$. It has also been reported that CaM interacts and negatively regulates TRPC6, and that this interaction depends on the $[Ca^{2+}]_c$, since high concentrations of Ca^{2+} promoted this coupling (Boulay 2002; Kwon et al. 2007; Friedlova et al. 2010; Dionisio et al. 2011). In short, our work evidences the role of TRPC6 in maintaining basal $[Ca^{2+}]_c$, as a leak channel which allows passive leakage, when it is located in the membranes of intracellular Ca^{2+} stores.

As mentioned previously, TRPC6 has classically been considered as a DAG-activated channel, although recent research has provided new evidence about the role of TRPC6 in SOCE, and it has even been proposed that TRPC6 can work in one way or another depending on the mechanism which triggers its activation in the same cell type. Current hypotheses support the formation of a signaling macrocomplex comprised of STIM, Orai and TRPC proteins to conduct I_{SOCE} currents (Jardin et al. 2008a; Liao et al. 2008; Desai et al. 2015), and even the self-regulation which can occur among them. Is the case for STIM1, which can regulate TRPC1, TRPC4 and TRPC5 by direct interaction (Huang et al. 2006), and modulates TRPC3 and TRPC6 by promoting their heteromultimerization with TRPC1 and TRPC4, respectively (Yuan et al. 2007). In addition, the latest work included in this dissertation shows that STIM1 plays a key role in regulating TRPC6 and modifies its subcellular location.

The results of this research have shown that transient expression of STIM1 in cells which natively have an undetectable amount of it, manages to establish SOCE and significantly

attenuate expression of TRPC6 channel in the plasma membrane. However, STIM1 produced no remarkable changes in the cell surface expression of TRPC1, TRPC3 and Orai1. Also, confirming previously published results by Muallem et al. (Zeng et al. 2008), we observed that STIM1 expression enhances the interaction between TRPC1 and TRPC3, while impairs TRPC6 association with TRPC1 and TRPC3.

The decreased expression of TRPC6 in the plasma membrane is a consequence of its intracellular translocation to ER membranes, and this results in attenuation of non capacitative Ca^{2+} entry. Although TRP proteins are mainly located in the plasma membrane, several TRP channels as TRPM1, TRPM2 or TRPV1 can also be located in intracellular membranes even maintaining its function of ion channel (Turner et al. 2003; Lange et al. 2009; Oancea et al. 2009). Similarly, and as discussed above it can also be located in TRPC6 inner membranes in murine platelets acting as passive Ca^{2+} leak channel from intracellular stores. The results obtained in this study show that in cells lacking STIM1, TRPC6 is not detected in the ER membrane, while in cells that have transiently expressed STIM1 significant amounts of TRPC6 are observed in the ER membrane, suggesting that STIM1 may induce TRPC6 translocation from the plasma membrane into the ER membrane. TRPC6 expression in the ER membrane also produced a significant increase in Ca^{2+} leakage from TG-sensitive intracellular stores (presumably the ER), and a slight increase in basal $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Therefore, these results agree with those discussed above in murine platelets from TRPC6 KO animals.

TRPC6 activity in ER appears to be constitutive, and thus it should be compensated by a similar increase in SERCA activity, as no differences have been observed in the ability to store Ca^{2+} into the ER in STIM1-expressing cells with respect to those that do it.

We can conclude therefore that STIM1 has an important role in the regulation of TRPC6 location. STIM1 is essentially defined as the Ca^{2+} sensor of the ER which activates SOCE. However it has also been described that STIM1 participates in the suppression of other pathways of Ca^{2+} entry, such as voltage-activated Ca^{2+} entry by regulating channels $\text{Ca}_v1.2$ (Wang et al. 2010; Dionisio et al. 2015). Accordingly, our results might be explained as a similar regulatory mechanism mediated by STIM1 and directed to suppress the Ca^{2+} entry operated by second messengers through TRPC6. In addition, functional location TRPC6 in the ER membrane may be involved in Ca^{2+} reuptake by this store.

CONCLUSIONES

- TRPA1 modula negativamente la ECC en la línea celular megacarioblástica MEG01 a través de la atenuación de la asociación STIM1-Orai1.
- La expresión de TRPA1 disminuye durante la maduración megacarioblástica hasta su completa desaparición en plaquetas, permitiendo en consecuencia una mayor ECC.
- Una fracción de TRPC6 localizada en los depósitos de Ca^{2+} sensibles a agonistas actúa permitiendo el escape pasivo de Ca^{2+} y desempeña un pape fundamental en la regulación de la concentración citosólica de Ca^{2+} basal en plaquetas de ratón.
- La funcionalidad del canal TRPC6 se atenúa en condiciones de acidez del medio extracelular en plaquetas murinas, pero es insensible al estrés oxidativo y a la hipoxia.
- STIM1 modula la heteromultimerización de TRPC6 y su localización subcelular, induciendo su traslocación desde la membrana plasmática hacia la membrana del RE.

- TRPA1 negatively regulates store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) in the megakaryoblastic cell line MEG01 by the attenuation of STIM1-Orai1 interaction.
- Megakaryocyte maturation attenuates TRPA1 protein expression, thus explaining the absence of TRPA1 and a greater SOCE in mature human platelets.
- An intracellular pool of TRPC6 located in agonist-sensitive intracellular Ca^{2+} compartments, acts as a leak channel and plays a relevant role in the regulation of the cytosolic basal calcium concentration in murine resting platelets.
- TRPC6 function is attenuated by acidic pH while it is insensitive to ROS exposure or hypoxic-like conditions in mouse platelets.
- STIM1 modulates TRPC6 heteromultimerization and subcellular location, by inducing its translocation from the plasma membrane to the ER.

BIBLIOGRAFÍA

- Adebiyi, A., D. Narayanan, et al. (2011). "Caveolin-1 assembles type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and canonical transient receptor potential 3 channels into a functional signaling complex in arterial smooth muscle cells." *J Biol Chem* **286**(6): 4341-4348.
- Aguade, M., N. Miyashita, et al. (1989). "Restriction-map variation at the zeste-tko region in natural populations of *Drosophila melanogaster*." *Mol Biol Evol* **6**(2): 123-130.
- Aires, V., A. Hichami, et al. (2007). "Activation of TRPC6 calcium channels by diacylglycerol (DAG)-containing arachidonic acid: a comparative study with DAG-containing docosahexaenoic acid." *Biochimie* **89**(8): 926-937.
- Alessi, M. C., M. Poggi, et al. (2007). "Plasminogen activator inhibitor-1, adipose tissue and insulin resistance." *Curr Opin Lipidol* **18**(3): 240-245.
- Almirza, W. H., P. H. Peters, et al. (2012). "Role of Trpc channels, Stim1 and Orai1 in PGF(2alpha)-induced calcium signaling in NRK fibroblasts." *Cell Calcium* **51**(1): 12-21.
- Alvarez, J., M. Montero, et al. (1992). "Cytochrome P450 may regulate plasma membrane Ca²⁺ permeability according to the filling state of the intracellular Ca²⁺ stores." *FASEB J* **6**(2): 786-792.
- Andersen, N. H., T. L. Eggerman, et al. (1980). "On the multiplicity of platelet prostaglandin receptors. I. Evaluation of competitive antagonism by aggregometry." *Prostaglandins* **19**(5): 711-735.
- Authi, K. S. (2007). "TRP channels in platelet function." *Handb Exp Pharmacol*(179): 425-443.
- Baba, Y., K. Hayashi, et al. (2006). "Coupling of STIM1 to store-operated Ca²⁺ entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(45): 16704-16709.
- Baker, G. R., P. M. Sullam, et al. (1997). "A simple, fluorescent method to internally label platelets suitable for physiological measurements." *Am J Hematol* **56**(1): 17-25.
- Balduini, A., A. Pecci, et al. (2004). "Expression, activation, and subcellular localization of the Rap1 GTPase in cord blood-derived human megakaryocytes." *Exp Cell Res* **300**(1): 84-93.
- Bandyopadhyay, B. C., H. L. Ong, et al. (2008). "TRPC3 controls agonist-stimulated intracellular Ca²⁺ release by mediating the interaction between inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and RACK1." *J Biol Chem* **283**(47): 32821-32830.
- Bandyopadhyay, B. C., S. C. Pingle, et al. (2011). "Store-operated Ca²⁺ signaling in dendritic cells occurs independently of STIM1." *J Leukoc Biol* **89**(1): 57-62.
- Battinelli, E. and J. Loscalzo (2000). "Nitric oxide induces apoptosis in megakaryocytic cell lines." *Blood* **95**(11): 3451-3459.

- Battinelli, E., S. R. Willoughby, et al. (2001). "Induction of platelet formation from megakaryocytoid cells by nitric oxide." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(25): 14458-14463.
- Bautista, D. M., M. Hoth, et al. (2002). "Enhancement of calcium signalling dynamics and stability by delayed modulation of the plasma-membrane calcium-ATPase in human T cells." J Physiol **541**(Pt 3): 877-894.
- Berger, G., J. P. Caen, et al. (1993). "Ultrastructural demonstration of CD36 in the alpha-granule membrane of human platelets and megakaryocytes." Blood **82**(10): 3034-3044.
- Berna-Erro, A., A. Braun, et al. (2009). "STIM2 regulates capacitive Ca²⁺ entry in neurons and plays a key role in hypoxic neuronal cell death." Sci Signal **2**(93): ra67.
- Berna-Erro, A., C. Galan, et al. (2012). "Capacitative and non-capacitative signaling complexes in human platelets." Biochim Biophys Acta **1823**(8): 1242-1251.
- Berridge, M. J. (1987). "Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers." Annu Rev Biochem **56**: 159-193.
- Berridge, M. J. (1995). "Capacitative calcium entry." Biochem J **312** (Pt 1): 1-11.
- Berridge, M. J. (1997). "Elementary and global aspects of calcium signalling." J Exp Biol **200**(Pt 2): 315-319.
- Berridge, M. J. (2001). "The versatility and complexity of calcium signalling." Novartis Found Symp **239**: 52-64; discussion 64-57, 150-159.
- Berridge, M. J., M. D. Bootman, et al. (2003). "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(7): 517-529.
- Bird, G. S. and J. W. Putney, Jr. (1993). "Inhibition of thapsigargin-induced calcium entry by microinjected guanine nucleotide analogues. Evidence for the involvement of a small G-protein in capacitative calcium entry." J Biol Chem **268**(29): 21486-21488.
- Birnbaumer, L., X. Zhu, et al. (1996). "On the molecular basis and regulation of cellular capacitative calcium entry: roles for Trp proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(26): 15195-15202.
- Blackhart, B. D., G. Cuenco, et al. (1994). "The anion-binding exosite is critical for the high affinity binding of thrombin to the human thrombin receptor." Growth Factors **11**(1): 17-28.
- Bobbe, R., L. Hadri, et al. (2011). "SERCA2a controls the mode of agonist-induced intracellular Ca²⁺ signal, transcription factor NFAT and proliferation in human vascular smooth muscle cells." J Mol Cell Cardiol **50**(4): 621-633.
- Bogeski, I., C. Kummerow, et al. (2010). "Differential redox regulation of ORAI ion channels: a mechanism to tune cellular calcium signaling." Sci Signal **3**(115): ra24.

- Bootman, M. D., T. J. Collins, et al. (2001). "Calcium signalling--an overview." Semin Cell Dev Biol **12**(1): 3-10.
- Born, G. V. (1962). "Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal." Nature **194**: 927-929.
- Boulay, G. (2002). "Ca(2+)-calmodulin regulates receptor-operated Ca(2+) entry activity of TRPC6 in HEK-293 cells." Cell Calcium **32**(4): 201-207.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Brechard, S., C. Melchior, et al. (2008). "Store-operated Ca²⁺ channels formed by TRPC1, TRPC6 and Orai1 and non-store-operated channels formed by TRPC3 are involved in the regulation of NADPH oxidase in HL-60 granulocytes." Cell Calcium.
- Bygrave, F. L. and A. Benedetti (1996). "What is the concentration of calcium ions in the endoplasmic reticulum?" Cell Calcium **19**(6): 547-551.
- Cao, D. S., L. Zhong, et al. (2012). "Expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) and its role in insulin release from rat pancreatic beta cells." PLoS One **7**(5): e38005.
- Carlsson, S. R., J. Roth, et al. (1988). "Isolation and characterization of human lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp-1 and h-lamp-2. Major sialoglycoproteins carrying polylectosaminoglycan." J Biol Chem **263**(35): 18911-18919.
- Caroni, P. and E. Carafoli (1981). "The Ca²⁺ pumping ATPase of heart sarcolemma. Characterization, calmodulin dependence, and partial purification." J Biol Chem **256**(7): 3263-3270.
- Cattaneo, M. (2009). "Light transmission aggregometry and ATP release for the diagnostic assessment of platelet function." Semin Thromb Hemost **35**(2): 158-167.
- Cavallini, L., M. Coassin, et al. (1995). "Two classes of agonist-sensitive Ca²⁺ 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.
- Celikel, R., R. A. McClintock, et al. (2003). "Modulation of alpha-thrombin function by distinct interactions with platelet glycoprotein Ibalpha." Science **301**(5630): 218-221.
- Cramer, E. M., G. Berger, et al. (1994). "Platelet alpha-granule and plasma membrane share two new components: CD9 and PECAM-1." Blood **84**(6): 1722-1730.
- Cvetkov, T. L., K. W. Huynh, et al. (2011). "Molecular architecture and subunit organization of TRPA1 ion channel revealed by electron microscopy." J Biol Chem **286**(44): 38168-38176.

Chadwick, C. C., A. Saito, et al. (1990). "Isolation and characterization of the inositol trisphosphate receptor from smooth muscle." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(6): 2132-2136.

Choi, H. J., Y. G. Park, et al. (2007). "Lactosylceramide alpha2,3-sialyltransferase is induced via a PKC/ERK/CREB-dependent pathway in K562 human leukemia cells." Mol Cells **23**(2): 138-144.

Chow, T. W., J. D. Hellums, et al. (1992). "Shear stress-induced von Willebrand factor binding to platelet glycoprotein Ib initiates calcium influx associated with aggregation." Blood **80**(1): 113-120.

D'Souza, S. E., M. H. Ginsberg, et al. (1990). "The ligand binding site of the platelet integrin receptor GPIIb-IIIa is proximal to the second calcium binding domain of its alpha subunit." J Biol Chem **265**(6): 3440-3446.

Daniel, J. L., C. Dangelmaier, et al. (1998). "Molecular basis for ADP-induced platelet activation. I. Evidence for three distinct ADP receptors on human platelets." J Biol Chem **273**(4): 2024-2029.

De Botton, S., S. Sabri, et al. (2002). "Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes." Blood **100**(4): 1310-1317.

Derler, I., M. Fahrner, et al. (2009). "A Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) modulatory domain (CMD) within STIM1 mediates fast Ca²⁺-dependent inactivation of ORAI1 channels." J Biol Chem **284**(37): 24933-24938.

Derler, I., P. Plenk, et al. (2013). "The extended transmembrane Orai1 N-terminal (ETON) region combines binding interface and gate for Orai1 activation by STIM1." J Biol Chem **288**(40): 29025-29034.

Desai, P. N., X. Zhang, et al. (2015). "Multiple types of calcium channels arising from alternative translation initiation of the Orai1 message." Sci Signal **8**(387): ra74.

Dietrich, A. and T. Gudermann (2007). "Trpc6." Handb Exp Pharmacol(179): 125-141.

Dietrich, A., M. Mederos y Schnitzler, et al. (2003). "N-linked protein glycosylation is a major determinant for basal TRPC3 and TRPC6 channel activity." J Biol Chem **278**(48): 47842-47852.

Dionisio, N., L. Albarran, et al. (2011). "Functional role of the calmodulin- and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-binding (CIRB) site of TRPC6 in human platelet activation." Cell Signal **23**(11): 1850-1856.

Dionisio, N., T. Smani, et al. (2015). "Homer proteins mediate the interaction between STIM1 and Cav1.2 channels." Biochim Biophys Acta **1853**(5): 1145-1153.

Dominguez-Rodriguez, A., I. Diaz, et al. (2012). "Urotensin-II signaling mechanism in rat coronary artery: role of STIM1 and Orai1-dependent store operated calcium influx in vasoconstriction." Arterioscler Thromb Vasc Biol **32**(5): 1325-1332.

Earley, S., A. L. Gonzales, et al. (2009). "Endothelium-dependent cerebral artery dilation mediated by TRPA1 and Ca²⁺-Activated K⁺ channels." Circ Res **104**(8): 987-994.

Eder, P., M. Poteser, et al. (2007). "TRPC3: a multifunctional, pore-forming signalling molecule." Handb Exp Pharmacol(179): 77-92.

Endo, M. (2009). "Calcium-induced calcium release in skeletal muscle." Physiol Rev **89**(4): 1153-1176.

Fasolato, C., M. Hoth, et al. (1993). "A GTP-dependent step in the activation mechanism of capacitative calcium influx." J Biol Chem **268**(28): 20737-20740.

Feske, S., Y. Gwack, et al. (2006). "A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function." Nature **441**(7090): 179-185.

Flaumenhaft, R. (2003). "Molecular basis of platelet granule secretion." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(7): 1152-1160.

Fox, J. E., J. K. Boyles, et al. (1988). "Identification of a membrane skeleton in platelets." J Cell Biol **106**(5): 1525-1538.

Fox, J. E., C. C. Reynolds, et al. (1987). "Spectrin is associated with membrane-bound actin filaments in platelets and is hydrolyzed by the Ca²⁺-dependent protease during platelet activation." Blood **69**(2): 537-545.

Friedlova, E., L. Grycova, et al. (2010). "The interactions of the C-terminal region of the TRPC6 channel with calmodulin." Neurochem Int **56**(2): 363-366.

Frojmovic, M. M. and J. G. Milton (1982). "Human platelet size, shape, and related functions in health and disease." Physiol Rev **62**(1): 185-261.

Fung, C. Y., C. Cendana, et al. (2007). "Primary and secondary agonists can use P2X(1) receptors as a major pathway to increase intracellular Ca²⁺ in the human platelet." J Thromb Haemost **5**(5): 910-917.

Furie, B., B. C. Furie, et al. (2001). "A journey with platelet P-selectin: the molecular basis of granule secretion, signalling and cell adhesion." Thromb Haemost **86**(1): 214-221.

Furuichi, T., S. Yoshikawa, et al. (1989). "Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P400." Nature **342**(6245): 32-38.

Fuster, V., L. Badimon, et al. (1992). "The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1)." N Engl J Med **326**(4): 242-250.

Galan, C., H. Zbidi, et al. (2009). "STIM1, Orai1 and hTRPC1 are important for thrombin- and ADP-induced aggregation in human platelets." Arch Biochem Biophys **490**(2): 137-144.

Garcia-Anoveros, J. and K. Nagata (2007). "Trpa1." Handb Exp Pharmacol(179): 347-362.

Gilio, K., R. van Kruchten, et al. (2010). "Roles of platelet STIM1 and Orai1 in glycoprotein VI- and thrombin-dependent procoagulant activity and thrombus formation." J Biol Chem **285**(31): 23629-23638.

Ginsberg, M. H., L. Taylor, et al. (1980). "The mechanism of thrombin-induced platelet factor 4 secretion." Blood **55**(4): 661-668.

Graham, S., M. Ding, et al. (2010). "Canonical transient receptor potential 6 (TRPC6), a redox-regulated cation channel." J Biol Chem **285**(30): 23466-23476.

Green, F. W., Jr., M. M. Kaplan, et al. (1978). "Effect of acid and pepsin on blood coagulation and platelet aggregation. A possible contributor prolonged gastroduodenal mucosal hemorrhage." Gastroenterology **74**(1): 38-43.

Green, N. M. (1963). "Avidin. 3. The Nature of the Biotin-Binding Site." Biochem J **89**: 599-609.

Grynkiewicz, G., M. Poenie, et al. (1985). "A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties." J Biol Chem **260**(6): 3440-3450.

Handagama, P., R. M. Scarborough, et al. (1993). "Endocytosis of fibrinogen into megakaryocyte and platelet alpha-granules is mediated by alpha IIb beta 3 (glycoprotein IIb-IIIa)." Blood **82**(1): 135-138.

Hardie, R. C. and B. Minke (1992). "The trp gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in Drosophila photoreceptors." Neuron **8**(4): 643-651.

Harper, A. G. and S. O. Sage (2007). "A key role for reverse Na⁺/Ca²⁺ exchange influenced by the actin cytoskeleton in store-operated Ca²⁺ entry in human platelets: evidence against the de novo conformational coupling hypothesis." Cell Calcium **42**(6): 606-617.

Harper, M. T., J. E. Londono, et al. (2013). "Transient receptor potential channels function as a coincidence signal detector mediating phosphatidylserine exposure." Sci Signal **6**(281): ra50.

Hartwig, J. H. and M. DeSisto (1991). "The cytoskeleton of the resting human blood platelet: structure of the membrane skeleton and its attachment to actin filaments." J Cell Biol **112**(3): 407-425.

Hatanaka, H. and T. Amano (1981). "A mouse neuroblastoma x rat glioma hybrid cell produces immunoreactive substance P-like material." Brain Res **215**(1-2): 305-316.

Heijnen, H. F., N. Debili, et al. (1998). "Multivesicular bodies are an intermediate stage in the formation of platelet alpha-granules." Blood **91**(7): 2313-2325.

Heldin, C. H. (1992). "Structural and functional studies on platelet-derived growth factor." EMBO J **11**(12): 4251-4259.

- Herrera, R., S. Hubbell, et al. (1998). "A role for the MEK/MAPK pathway in PMA-induced cell cycle arrest: modulation of megakaryocytic differentiation of K562 cells." Exp Cell Res **238**(2): 407-414.
- Hilgemann, D. W., D. A. Nicoll, et al. (1991). "Charge movement during Na⁺ translocation by native and cloned cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger." Nature **352**(6337): 715-718.
- Hirata, T., F. Ushikubi, et al. (1996). "Two thromboxane A2 receptor isoforms in human platelets. Opposite coupling to adenylyl cyclase with different sensitivity to Arg60 to Leu mutation." J Clin Invest **97**(4): 949-956.
- Hocking, A. M., T. Shinomura, et al. (1998). "Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix." Matrix Biol **17**(1): 1-19.
- Hogan, P. G., R. S. Lewis, et al. (2010). "Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI." Annu Rev Immunol **28**: 491-533.
- Holmsen, H. and H. J. Day (1970). "The selectivity of the thrombin-induced platelet release reaction: subcellular localization of released and retained constituents." J Lab Clin Med **75**(5): 840-855.
- Holmsen, H., L. Robkin, et al. (1979). "Effects of antimycin A and 2-deoxyglucose on secretion in human platelets. Differential inhibition of the secretion of acid hydrolases and adenine nucleotides." Biochem J **182**(2): 413-419.
- House, M. G., L. Kohlmeier, et al. (1997). "Expression of an extracellular calcium-sensing receptor in human and mouse bone marrow cells." J Bone Miner Res **12**(12): 1959-1970.
- Huang, G. N., W. Zeng, et al. (2006). "STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels." Nat Cell Biol **8**(9): 1003-1010.
- Irvine, R. F. (1990). "'Quantal' Ca²⁺ release and the control of Ca²⁺ entry by inositol phosphates--a possible mechanism." FEBS Lett **263**(1): 5-9.
- Irvine, R. F. and R. M. Moor (1987). "Inositol(1,3,4,5)tetrakisphosphate-induced activation of sea urchin eggs requires the presence of inositol trisphosphate." Biochem Biophys Res Commun **146**(1): 284-290.
- Israels, S. J., J. M. Gerrard, et al. (1992). "Platelet dense granule membranes contain both granulophysin and P-selectin (GMP-140)." Blood **80**(1): 143-152.
- Ito, T., Y. Ishida, et al. (1996). "Recombinant human c-Mpl ligand is not a direct stimulator of proplatelet formation in mature human megakaryocytes." Br J Haematol **94**(2): 387-390.
- Jackson, S. P. (2011). "Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly." Nat Med **17**(11): 1423-1436.

Jardin, I., L. Albarran, et al. (2012). "Homers regulate calcium entry and aggregation in human platelets: a role for Homers in the association between STIM1 and Orai1." Biochem J **445**(1): 29-38.

Jardin, I., L. J. Gomez, et al. (2009a). "Dynamic interaction of hTRPC6 with the Orai1-STIM1 complex or hTRPC3 mediates its role in capacitative or non-capacitative Ca(2+) entry pathways." Biochem J **420**(2): 267-276.

Jardin, I., J. J. Lopez, et al. (2009b). "Store-operated Ca²⁺ entry is sensitive to the extracellular Ca²⁺ concentration through plasma membrane STIM1." Biochim Biophys Acta **1793**(10): 1614-1622.

Jardin, I., J. J. Lopez, et al. (2008a). "Orai1 mediates the interaction between STIM1 and hTRPC1 and regulates the mode of activation of hTRPC1-forming Ca²⁺ channels." J Biol Chem **283**(37): 25296-25304.

Jardin, I., P. C. Redondo, et al. (2006). "Endogenously generated reactive oxygen species reduce PMCA activity in platelets from patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus." Platelets **17**(5): 283-288.

Jardin, I., P. C. Redondo, et al. (2008b). "Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate enhances store-operated calcium entry through hTRPC6 channel in human platelets." Biochim Biophys Acta **1783**(1): 84-97.

Jha, A., M. Ahuja, et al. (2013). "The STIM1 CTID domain determines access of SARAF to SOAR to regulate Orai1 channel function." J Cell Biol **202**(1): 71-79.

Jin, J., J. L. Daniel, et al. (1998). "Molecular basis for ADP-induced platelet activation. II. The P2Y1 receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets." J Biol Chem **273**(4): 2030-2034.

Jordt, S. E., D. M. Bautista, et al. (2004). "Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1." Nature **427**(6971): 260-265.

Jung, S., R. Strotmann, et al. (2002). "TRPC6 is a candidate channel involved in receptor-stimulated cation currents in A7r5 smooth muscle cells." Am J Physiol Cell Physiol **282**(2): C347-359.

Kahn, M. L., Y. W. Zheng, et al. (1998). "A dual thrombin receptor system for platelet activation." Nature **394**(6694): 690-694.

Kanthi, Y. M., N. R. Sutton, et al. (2014). "CD39: Interface between vascular thrombosis and inflammation." Curr Atheroscler Rep **16**(7): 425.

Kaushansky, K. (2003). "Thrombopoietin: a tool for understanding thrombopoiesis." J Thromb Haemost **1**(7): 1587-1592.

Kaushansky, K. (2006). "Lineage-specific hematopoietic growth factors." N Engl J Med **354**(19): 2034-2045.

- Kaushansky, K. (2008). "Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis." Blood **111**(3): 981-986.
- Kawasaki, T., I. Lange, et al. (2009). "A minimal regulatory domain in the C terminus of STIM1 binds to and activates ORAI1 CRAC channels." Biochem Biophys Res Commun **385**(1): 49-54.
- Kenney, D. M. and R. W. Linck (1985). "The cytoskeleton of unstimulated blood platelets: structure and composition of the isolated marginal microtubular band." J Cell Sci **78**: 1-22.
- Koss, D. J., G. Riedel, et al. (2013). "Store-operated Ca²⁺ entry in hippocampal neurons: Regulation by protein tyrosine phosphatase PTP1B." Cell Calcium **53**(2): 125-138.
- Krotz, F., H. Y. Sohn, et al. (2004). "Reactive oxygen species: players in the platelet game." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(11): 1988-1996.
- Kwon, Y., T. Hofmann, et al. (2007). "Integration of phosphoinositide- and calmodulin-mediated regulation of TRPC6." Mol Cell **25**(4): 491-503.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lange, I., S. Yamamoto, et al. (2009). "TRPM2 functions as a lysosomal Ca²⁺-release channel in beta cells." Sci Signal **2**(71): ra23.
- Levin, J. and S. Ebbe (1994). "Why are recently published platelet counts in normal mice so low?" Blood **83**(12): 3829-3831.
- Liao, Y., C. Erxleben, et al. (2008). "Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/Icrac channels." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(8): 2895-2900.
- Liou, J., M. L. Kim, et al. (2005). "STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx." Curr Biol **15**(13): 1235-1241.
- Lopez, E., A. Berna-Erro, et al. (2013). "FKBP52 is involved in the regulation of SOCE channels in the human platelets and MEG 01 cells." Biochim Biophys Acta **1833**(3): 652-662.
- Lopez, E., I. Jardin, et al. (2012a). "STIM1 tyrosine-phosphorylation is required for STIM1-Orai1 association in human platelets." Cell Signal **24**(6): 1315-1322.
- Lopez, J. J., C. Camello-Almaraz, et al. (2005). "Ca²⁺ accumulation into acidic organelles mediated by Ca²⁺- and vacuolar H⁺-ATPases in human platelets." Biochem J **390**(Pt 1): 243-252.
- Lopez, J. J., N. Dionisio, et al. (2012b). "Two-pore channel 2 (TPC2) modulates store-operated Ca(2+) entry." Biochim Biophys Acta.

- Lopez, J. J., I. Jardin, et al. (2008). "STIM1 regulates acidic Ca²⁺ store refilling by interaction with SERCA3 in human platelets." Biochem Pharmacol **75**(11): 2157-2164.
- Lopez, J. J., G. M. Salido, et al. (2006). "Interaction of STIM1 with endogenously expressed human canonical TRP1 upon depletion of intracellular Ca²⁺ stores." J Biol Chem **281**(38): 28254-28264.
- Lowenberg, E. C., J. C. Meijers, et al. (2010). "Platelet-vessel wall interaction in health and disease." Neth J Med **68**(6): 242-251.
- Ma, Y. Q., J. Yang, et al. (2006). "Regulation of integrin alphaIIb beta3 activation by distinct regions of its cytoplasmic tails." Biochemistry **45**(21): 6656-6662.
- Mahaut-Smith, M. P., S. J. Ennion, et al. (2000). "ADP is not an agonist at P2X(1) receptors: evidence for separate receptors stimulated by ATP and ADP on human platelets." Br J Pharmacol **131**(1): 108-114.
- Mercer, J. C., W. I. Dehaven, et al. (2006). "Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1." J Biol Chem **281**(34): 24979-24990.
- Metcalfe, E. E., N. J. Traaseth, et al. (2005). "Serine 16 phosphorylation induces an order-to-disorder transition in monomeric phospholamban." Biochemistry **44**(11): 4386-4396.
- Metzelaar, M. J., P. L. Wijngaard, et al. (1991). "CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells." J Biol Chem **266**(5): 3239-3245.
- Montell, C. (2005). "The TRP superfamily of cation channels." Sci STKE **2005**(272): re3.
- Morange, P. E. and M. C. Alessi (2013). "Thrombosis in central obesity and metabolic syndrome: mechanisms and epidemiology." Thromb Haemost **110**(4): 669-680.
- Muik, M., M. Fahrner, et al. (2009). "A Cytosolic Homomerization and a Modulatory Domain within STIM1 C Terminus Determine Coupling to ORAI1 Channels." J Biol Chem **284**(13): 8421-8426.
- Muik, M., M. Fahrner, et al. (2011). "STIM1 couples to ORAI1 via an intramolecular transition into an extended conformation." EMBO J **30**(9): 1678-1689.
- Mullins, F. M., C. Y. Park, et al. (2009). "STIM1 and calmodulin interact with Orai1 to induce Ca²⁺-dependent inactivation of CRAC channels." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(36): 15495-15500.
- Murugappa, S. and S. P. Kunapuli (2006). "The role of ADP receptors in platelet function." Front Biosci **11**: 1977-1986.
- Nagata, K., Y. Okano, et al. (1997a). "Differential expression of low Mr GTP-binding proteins in human megakaryoblastic leukemia cell line, MEG-01, and their possible involvement in the differentiation process." Thromb Haemost **77**(2): 368-375.

- Nagata, Y., Y. Muro, et al. (1997b). "Thrombopoietin-induced polyploidization of bone marrow megakaryocytes is due to a unique regulatory mechanism in late mitosis." J Cell Biol **139**(2): 449-457.
- Neher, E. and G. J. Augustine (1992). "Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells." J Physiol **450**: 273-301.
- Ni, H., V. Ramakrishnan, et al. (2001). "Increased thrombogenesis and embolus formation in mice lacking glycoprotein V." Blood **98**(2): 368-373.
- Nieswandt, B., W. Bergmeier, et al. (2000). "Expression and function of the mouse collagen receptor glycoprotein VI is strictly dependent on its association with the FcRgamma chain." J Biol Chem **275**(31): 23998-24002.
- Nieswandt, B. and S. P. Watson (2003). "Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor?" Blood **102**(2): 449-461.
- O'Brien, P. J., M. Molino, et al. (2001). "Protease activated receptors: theme and variations." Oncogene **20**(13): 1570-1581.
- Oancea, E., J. Vriens, et al. (2009). "TRPM1 forms ion channels associated with melanin content in melanocytes." Sci Signal **2**(70): ra21.
- Ogura, M., Y. Morishima, et al. (1985). "Establishment of a novel human megakaryoblastic leukemia cell line, MEG-01, with positive Philadelphia chromosome." Blood **66**(6): 1384-1392.
- Ohba, T., H. Watanabe, et al. (2007). "Upregulation of TRPC1 in the development of cardiac hypertrophy." J Mol Cell Cardiol **42**(3): 498-507.
- Olah, T., J. Fodor, et al. (2011). "Overexpression of transient receptor potential canonical type 1 (TRPC1) alters both store operated calcium entry and depolarization-evoked calcium signals in C2C12 cells." Cell Calcium **49**(6): 415-425.
- Packham, M. A. and J. F. Mustard (1984). "Platelet adhesion." Prog Hemost Thromb **7**: 211-288.
- Paez Espinosa, E. V., J. P. Murad, et al. (2012). "Mouse transient receptor potential channel 6: role in hemostasis and thrombogenesis." Biochem Biophys Res Commun **417**(2): 853-856.
- Pandol, S. J. and M. S. Schoeffield-Payne (1990). "Cyclic GMP mediates the agonist-stimulated increase in plasma membrane calcium entry in the pancreatic acinar cell." J Biol Chem **265**(22): 12846-12853.
- Pani, B., H. L. Ong, et al. (2008). "Lipid rafts determine clustering of STIM1 in endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions and regulation of store-operated Ca²⁺ entry (SOCE)." J Biol Chem **283**(25): 17333-17340.

- Paredes, R. M., J. C. Etzler, et al. (2008). "Chemical calcium indicators." Methods **46**(3): 143-151.
- Parekh, A. B. and J. W. Putney, Jr. (2005). "Store-operated calcium channels." Physiol Rev **85**(2): 757-810.
- Park, C. Y., P. J. Hoover, et al. (2009). "STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1." Cell **136**(5): 876-890.
- Patel, S., J. S. Marchant, et al. (2010). "Two-pore channels: Regulation by NAADP and customized roles in triggering calcium signals." Cell Calcium **47**(6): 480-490.
- Penniston, J. T. and A. Enyedi (1998). "Modulation of the plasma membrane Ca²⁺ pump." J Membr Biol **165**(2): 101-109.
- Periasamy, M. and A. Kalyanasundaram (2007). "SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease." Muscle Nerve **35**(4): 430-442.
- Potzsch, B. and V. Ivaskevicius (2011). "Haemostasis management of massive bleeding." Hamostaseologie **31**(1): 15-20.
- Pozzan, T., R. Rizzuto, et al. (1994). "Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores." Physiol Rev **74**(3): 595-636.
- Pulcinelli, F. M., J. L. Daniel, et al. (1995). "Fibrinogen binding is independent of an increase in intracellular calcium concentration in thrombin degranulated platelets." Thromb Haemost **73**(2): 304-308.
- Putney, J. W., Jr. (1986). "A model for receptor-regulated calcium entry." Cell Calcium **7**(1): 1-12.
- Racke, F. K., K. Lewandowska, et al. (1997). "Sustained activation of the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway is required for megakaryocytic differentiation of K562 cells." J Biol Chem **272**(37): 23366-23370.
- Ramanathan, G., S. Gupta, et al. (2012). "Defective diacylglycerol-induced Ca²⁺ entry but normal agonist-induced activation responses in TRPC6-deficient mouse platelets." J Thromb Haemost **10**(3): 419-429.
- Rand, M. D., M. Kalafatis, et al. (1994). "Platelet coagulation factor Va: the major secretory platelet phosphoprotein." Blood **83**(8): 2180-2190.
- Randriamampita, C. and R. Y. Tsien (1993). "Emptying of intracellular Ca²⁺ stores releases a novel small messenger that stimulates Ca²⁺ influx." Nature **364**(6440): 809-814.
- Redondo, P. C., A. G. Harper, et al. (2007). "Dual role of tubulin-cytoskeleton in store-operated calcium entry in human platelets." Cell Signal **19**(10): 2147-2154.

Redondo, P. C., I. Jardin, et al. (2008). "Intracellular Ca²⁺ store depletion induces the formation of macromolecular complexes involving hTRPC1, hTRPC6, the type II IP₃ receptor and SERCA3 in human platelets." Biochim Biophys Acta **1783**(6): 1163-1176.

Richardson, P. J., K. Siddle, et al. (1984). "Immunoaffinity purification of intact, metabolically active, cholinergic nerve terminals from mammalian brain." Biochem J **219**(2): 647-654.

Rink, T. J. and S. O. Sage (1990). "Calcium signaling in human platelets." Annu Rev Physiol **52**: 431-449.

Roos, J., P. J. DiGregorio, et al. (2005). "STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function." J Cell Biol **169**(3): 435-445.

Rosado, J. A., S. L. Brownlow, et al. (2002). "Endogenously expressed Trp1 is involved in store-mediated Ca²⁺ entry by conformational coupling in human platelets." J Biol Chem **277**(44): 42157-42163.

Rosado, J. A., S. Jenner, et al. (2000a). "A role for the actin cytoskeleton in the initiation and maintenance of store-mediated calcium entry in human platelets. Evidence for conformational coupling." J Biol Chem **275**(11): 7527-7533.

Rosado, J. A., T. Porras, et al. (2001a). "Cyclic nucleotides modulate store-mediated calcium entry through the activation of protein-tyrosine phosphatases and altered actin polymerization in human platelets." J Biol Chem **276**(19): 15666-15675.

Rosado, J. A. and S. O. Sage (2000b). "The actin cytoskeleton in store-mediated calcium entry." J Physiol **526 Pt 2**: 221-229.

Rosado, J. A. and S. O. Sage (2000c). "Coupling between inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and human transient receptor potential channel 1 when intracellular Ca²⁺ stores are depleted." Biochem J **350 Pt 3**: 631-635.

Rosado, J. A. and S. O. Sage (2001b). "Activation of store-mediated calcium entry by secretion-like coupling between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type II and human transient receptor potential (hTrp1) channels in human platelets." Biochem J **356**(Pt 1): 191-198.

Rothberg, B. S., Y. Wang, et al. (2013). "Orai channel pore properties and gating by STIM: implications from the Orai crystal structure." Sci Signal **6**(267): pe9.

Safer, D. and V. T. Nachmias (1994). "Beta thymosins as actin binding peptides." Bioessays **16**(8): 590.

Sage, S. O., J. E. Merritt, et al. (1989). "Receptor-mediated calcium entry in fura-2-loaded human platelets stimulated with ADP and thrombin. Dual-wavelengths studies with Mn²⁺." Biochem J **258**(3): 923-926.

Sage, S. O., N. Pugh, et al. (2013). "Pericellular Ca(2+) recycling potentiates thrombin-evoked Ca(2+) signals in human platelets." Physiol Rep **1**(5): e00085.

Samad, A., L. Sura, et al. (2011). "The C-terminal basic residues contribute to the chemical- and voltage-dependent activation of TRPA1." Biochem J **433**(1): 197-204.

Sargeant, P., R. W. Farndale, et al. (1993). "ADP- and thapsigargin-evoked Ca²⁺ entry and protein-tyrosine phosphorylation are inhibited by the tyrosine kinase inhibitors genistein and methyl-2,5-dihydroxycinnamate in fura-2-loaded human platelets." J Biol Chem **268**(24): 18151-18156.

Savage, B., F. Almus-Jacobs, et al. (1998). "Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow." Cell **94**(5): 657-666.

Scrimgeour, N. R., D. P. Wilson, et al. (2012). "Glu(1)(0)(6) in the Orai1 pore contributes to fast Ca(2)(+)-dependent inactivation and pH dependence of Ca(2)(+) release-activated Ca(2)(+) (CRAC) current." Biochem J **441**(2): 743-753.

Schindl, R., R. Fritsch, et al. (2012). "Canonical transient receptor potential (TRPC) 1 acts as a negative regulator for vanilloid TRPV6-mediated Ca²⁺ influx." J Biol Chem **287**(42): 35612-35620.

Schottelius, M., B. Laufer, et al. (2009). "Ligands for mapping alphavbeta3-integrin expression in vivo." Acc Chem Res **42**(7): 969-980.

Segal, G. M., T. Stueve, et al. (1988). "Analysis of murine megakaryocyte colony size and ploidy: effects of interleukin-3." J Cell Physiol **137**(3): 537-544.

Shi, J., M. Ju, et al. (2010). "TRPC6 channels stimulated by angiotensin II are inhibited by TRPC1/C5 channel activity through a Ca²⁺- and PKC-dependent mechanism in native vascular myocytes." J Physiol **588**(Pt 19): 3671-3682.

Shi, J., E. Mori, et al. (2004). "Multiple regulation by calcium of murine homologues of transient receptor potential proteins TRPC6 and TRPC7 expressed in HEK293 cells." J Physiol **561**(Pt 2): 415-432.

Shuttleworth, T. J., J. L. Thompson, et al. (2007). "STIM1 and the noncapacitative ARC channels." Cell Calcium **42**(2): 183-191.

Singh, B. B., X. Liu, et al. (2002). "Calmodulin regulates Ca(2+)-dependent feedback inhibition of store-operated Ca(2+) influx by interaction with a site in the C terminus of TrpC1." Mol Cell **9**(4): 739-750.

Sinkins, W. G., M. Estacion, et al. (1998). "Functional expression of TrpC1: a human homologue of the Drosophila Trp channel." Biochem J **331** (Pt 1): 331-339.

Soboloff, J., M. A. Spassova, et al. (2006). "Orai1 and STIM reconstitute store-operated calcium channel function." J Biol Chem **281**(30): 20661-20665.

Spassova, M. A., J. Soboloff, et al. (2006). "STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca(2+) channels." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(11): 4040-4045.

Stathopoulos, P. B., R. Schindl, et al. (2013). "STIM1/Orai1 coiled-coil interplay in the regulation of store-operated calcium entry." Nat Commun **4**: 2963.

Stathopoulos, P. B., L. Zheng, et al. (2009). "Stromal interaction molecule (STIM) 1 and STIM2 calcium sensing regions exhibit distinct unfolding and oligomerization kinetics." J Biol Chem **284**(2): 728-732.

Stenberg, P. E., R. P. McEver, et al. (1985). "A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation." J Cell Biol **101**(3): 880-886.

Stenberg, P. E., M. A. Shuman, et al. (1984). "Redistribution of alpha-granules and their contents in thrombin-stimulated platelets." J Cell Biol **98**(2): 748-760.

Streb, H., R. F. Irvine, et al. (1983). "Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate." Nature **306**(5938): 67-69.

Sun, Y. H., Y. Q. Li, et al. (2010). "Calcium-sensing receptor activation contributed to apoptosis stimulates TRPC6 channel in rat neonatal ventricular myocytes." Biochem Biophys Res Commun **394**(4): 955-961.

Sundivakkam, P. C., A. M. Kwiatek, et al. (2009). "Caveolin-1 scaffold domain interacts with TRPC1 and IP3R3 to regulate Ca²⁺ store release-induced Ca²⁺ entry in endothelial cells." Am J Physiol Cell Physiol **296**(3): C403-413.

Sura, L., V. Zima, et al. (2012). "C-terminal acidic cluster is involved in Ca²⁺-induced regulation of human transient receptor potential ankyrin 1 channel." J Biol Chem **287**(22): 18067-18077.

Thastrup, O., A. P. Dawson, et al. (1989). "Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage." Agents Actions **27**(1-2): 17-23.

Thomas, D. W., R. B. Mannon, et al. (1998). "Coagulation defects and altered hemodynamic responses in mice lacking receptors for thromboxane A₂." J Clin Invest **102**(11): 1994-2001.

Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4354.

Turner, H., A. Fleig, et al. (2003). "Discrimination of intracellular calcium store subcompartments using TRPV1 (transient receptor potential channel, vanilloid subfamily member 1) release channel activity." Biochem J **371**(Pt 2): 341-350.

Vazquez, G., J. P. Lievremont, et al. (2001). "Human Trp3 forms both inositol trisphosphate receptor-dependent and receptor-independent store-operated cation channels in DT40 avian B lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(20): 11777-11782.

- Vazquez, G., B. J. Wedel, et al. (2004). "The mammalian TRPC cation channels." Biochim Biophys Acta **1742**(1-3): 21-36.
- Verkleij, M. W., L. F. Morton, et al. (1998). "Simple collagen-like peptides support platelet adhesion under static but not under flow conditions: interaction via alpha2 beta1 and von Willebrand factor with specific sequences in native collagen is a requirement to resist shear forces." Blood **91**(10): 3808-3816.
- Vial, C., B. Hechler, et al. (1997). "Presence of P2X1 purinoceptors in human platelets and megakaryoblastic cell lines." Thromb Haemost **78**(6): 1500-1504.
- Vitrat, N., K. Cohen-Solal, et al. (1998). "Endomitosis of human megakaryocytes are due to abortive mitosis." Blood **91**(10): 3711-3723.
- Vu, T. K., D. T. Hung, et al. (1991). "Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation." Cell **64**(6): 1057-1068.
- Wang, Y., X. Deng, et al. (2008). "Stim, ORAI and TRPC channels in the control of calcium entry signals in smooth muscle." Clin Exp Pharmacol Physiol **35**(9): 1127-1133.
- Wang, Y., X. Deng, et al. (2010). "The calcium store sensor, STIM1, reciprocally controls Orai and CaV1.2 channels." Science **330**(6000): 105-109.
- Wes, P. D., J. Chevesich, et al. (1995). "TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(21): 9652-9656.
- White, J. G. (1968). "Effects of colchicine and vinca alkaloids on human platelets. II. Changes in the dense tubular system and formation of an unusual inclusion in incubated cells." Am J Pathol **53**(3): 447-461.
- White, J. G. (1972). "Interaction of membrane systems in blood platelets." Am J Pathol **66**(2): 295-312.
- White, J. G. (1987). "An overview of platelet structural physiology." Scanning Microsc **1**(4): 1677-1700.
- Williams, R. T., S. S. Manji, et al. (2001). "Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins." Biochem J **357**(Pt 3): 673-685.
- Woodard, G. E., J. J. Lopez, et al. (2010). "TRPC3 regulates agonist-stimulated Ca²⁺ mobilization by mediating the interaction between type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, RACK1, and Orai1." J Biol Chem **285**(11): 8045-8053.
- Woodard, G. E., G. M. Salido, et al. (2008). "Enhanced exocytotic-like insertion of Orai1 into the plasma membrane upon intracellular Ca²⁺ store depletion." Am J Physiol Cell Physiol **294**(6): C1323-1331.
- Wuytack, F. and L. Raeymaekers (1992). "The Ca²⁺-transport ATPases from the plasma membrane." J Bioenerg Biomembr **24**(3): 285-300.

- Xia, J., R. Pan, et al. (2014). "Native store-operated calcium channels are functionally expressed in mouse spinal cord dorsal horn neurons and regulate resting calcium homeostasis." J Physiol **592**(Pt 16): 3443-3461.
- Xiao, B., B. Coste, et al. (2011). "Temperature-dependent STIM1 activation induces Ca²⁺ influx and modulates gene expression." Nat Chem Biol **7**(6): 351-358.
- Xu, S. Z. and D. J. Beech (2001). "TrpC1 is a membrane-spanning subunit of store-operated Ca²⁺ channels in native vascular smooth muscle cells." Circ Res **88**(1): 84-87.
- Yang, Y. C., A. B. Ciarletta, et al. (1986). "Human IL-3 (multi-CSF): identification by expression cloning of a novel hematopoietic growth factor related to murine IL-3." Cell **47**(1): 3-10.
- Young, K. W., M. D. Bootman, et al. (2000). "Lysophosphatidic acid-induced Ca²⁺ mobilization requires intracellular sphingosine 1-phosphate production. Potential involvement of endogenous EDG-4 receptors." J Biol Chem **275**(49): 38532-38539.
- Yuan, J. P., W. Zeng, et al. (2009). "SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels." Nat Cell Biol **11**(3): 337-343.
- Yuan, J. P., W. Zeng, et al. (2007). "STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels." Nat Cell Biol **9**(6): 636-645.
- Zayats, V., A. Samad, et al. (2013). "Regulation of the transient receptor potential channel TRPA1 by its N-terminal ankyrin repeat domain." J Mol Model **19**(11): 4689-4700.
- Zeng, W., J. P. Yuan, et al. (2008). "STIM1 gates TRPC channels, but not Orai1, by electrostatic interaction." Mol Cell **32**(3): 439-448.
- Zhang, S. L., Y. Yu, et al. (2005). "STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane." Nature **437**(7060): 902-905.
- Zhang, X., W. Zhang, et al. (2014). "Complex role of STIM1 in the activation of store-independent Orai1/3 channels." J Gen Physiol **143**(3): 345-359.
- Zhu, M. X., A. M. Evans, et al. (2010). "Two-pore channels for integrative Ca signaling." Commun Integr Biol **3**(1): 12-17.
- Zhu, X., P. B. Chu, et al. (1995). "Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the Drosophila trp gene." FEBS Lett **373**(3): 193-198.
- Zhu, X., M. Jiang, et al. (1996). "trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca²⁺ entry." Cell **85**(5): 661-671.