



TESIS DOCTORAL

Papel de Orai, STIM y TRPC en la entrada de calcio

Natalia Alba Dionisio Flores

Departamento de Fisiología

Conformidad de los Directores:

Fdo: Juan Antonio Rosado Dionisio

Fdo: Ginés María Salido Ruiz

2013



FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

Campus universitario
Avenida de la Universidad s/n
10003 Cáceres
Telf.: 927 25 71 39

D. Ginés María Salido Ruiz, Doctor en Biología y Catedrático del Departamento de Fisiología en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura y **D. Juan Antonio Rosado Dionisio**, Doctor en Veterinaria y Profesor Titular de Fisiología en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura,

INFORMAN

Que la presente memoria presentada por Dña. Natalia Alba Dionisio Flores, con el título “**Papel de Orai, STIM y TRPC en la entrada de calcio**”, 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 la Universidad de Cambridge en Cambridge (Reino Unido). 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 Europeo” 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 8 de octubre de 2013:

Fdo: D. Ginés María
Salido Ruiz

Fdo: D. Juan Antonio
Rosado Dionisio

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

Proyecto de investigación **BFU2010-21043-C02-01** del
Ministerio de Ciencia en Innovación.

Proyecto de investigación **GR10010** de la
Junta de Extremadura-FEDER.

Natalia Alba Dionisio Flores ha disfrutado de una beca-contrato **PRE09020**
para la formación predoctoral de personal investigador de la Junta de
Extremadura (Junta de Extremadura, Consejería de Empleo, Empresa e
Innovación y Fondo Social Europeo).

GOBIERNO DE EXTREMADURA

Consejería de Empleo, Empresa e Innovación



UNIÓN EUROPEA

Fondo Europeo de Desarrollo Regional
Fondo Social Europeo

Una manera de hacer Europa

AGRADECIMIENTOS

Con esta Tesis terminan cuatro años de formación predoctoral, cuatro años en los que he tenido la suerte de contar con personas que me han ayudado y apoyado.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis tutores su labor durante este tiempo. A Rosado, por la oportunidad que me dio hace más o menos ocho años, cuando me animó a entrar como Alumna Interna en el Departamento, ya que desde entonces, y gracias a su ayuda, he aprendido mucho y he podido desarrollarme como investigadora. Y a Ginés, por sus consejos, por su dedicación, por acogerme en el Departamento desde el primer día y por confiar en mí.

Todos los que se dedican a la investigación saben que en esta profesión hay días que se pueden hacer muy duros. Pero, cuando se tienen compañeros como los que yo tengo en el Departamento de Fisiología, incluso los días en los que no te sale ni un solo revelado se llevan mejor. Por eso, gracias a Tapia, a Antonio y a Pedro. Y sobre todo gracias al resto de habitantes de “becarios”: a los que se han ido yendo (Hanene, Raquel, Isaac, JJ, Álvaro... me habéis enseñado muchas cosas) y a los que siguen y hacen que trabajar en el Departamento sea genial: Ana, Myriam, Lourdes, Deborah, Patri (también gracias por los buenos momentos fuera del laboratorio), Alejandro (ya sabes que te prometí que te agradecería ayudarme “a forjar mi alma investigadora”). Especialmente tengo que dedicar esta Tesis a Inés por sus dulces, su simpatía y sus maleos; y a Leti y Esther, porque trabajar a su lado este tiempo ha sido un verdadero placer, por compartir risas y grandes momentos, por entenderme y porque “la gente seria no es de fiar”. Por supuesto, a Carmensita, que siempre me ha animado, me ha cuidado y ha creído en mí. Y a Merche, por alegrarnos los días con sus canciones, por ayudarnos en todo y por hacer más agradable el trabajo.

I also want to thank Dr. Stewart O. Sage for welcoming me in his laboratory in Cambridge, and for his help and patience during my stay there. Also, thanks to the friends I met there (Olivia, Patrick, Nik, Sina), who made those three months

a great experience, and especially to my awesome *sister* Anja, who made me feel at home in Cambridge.

Gracias también a la gente de Inmunología (Sara, Bea, Juan, Raquel) y a los cónclaves de becarios con Yolanda, Estefi, María, Mar...

A veces nos olvidamos de que somos quienes somos gracias en gran parte a los maestros y profesores que nos hemos ido cruzando y que nos han ido guiando. En mi caso, he tenido la suerte de encontrarme con gente valiente y con vocación desde el principio (cómo no, si mi primer maestro fue mi padre), que siempre me ha ayudado. Gracias a los profes del Colegio "San José", y, entre ellos, a Ana, por "convertirme" a las ciencias cuando yo tenía claro que era de letras; y a los del IES "Profesor Hernández Pacheco", sobre todo a Molano, por hacer que las Matemáticas fueran mi asignatura favorita.

Durante los cuatro años que dura el doctorado, hay también personas que lo "sufren" aunque no se dediquen a ello. Entre todas esas personas, quiero agradecer especialmente a mi familia. A mis abuelos, por su afecto incondicional. Y sobre todo a mis padres, por su cariño, por apoyarme en todo momento, por enseñarme el valor del esfuerzo y del sacrificio, por animarme a hacer cosas cuando yo pensaba que no podría, por ser mis maestros y por demostrarme que, siendo buenas personas, se gana siempre. También a mi hermano Berto, al que seguro que le habría gustado ver esta Tesis y que sé que me ayuda desde donde está. Y a mi Marina, porque es genial tener una hermana y una amiga como ella y poder compartir momentos juntas, por esas miradas de "¿qué dicen?" y porque sé que siempre voy a poder contar con ella.

Y a mi otra familia, a mis amigos, muchísimas gracias por llenar estos años de risas, de consejos, de viajes y de apoyo. Es una suerte estar rodeada de gente tan genial. Gracias en especial a Pepe y Diego por sus abrazos, a Luis por cuidarme y por los momentos de frikismo compartido (tenemos pendiente descubrir quién es el primer mensajero), a mi "hamijo" Álvaro por los conciertos y las fantas juntos, a Cris y Andrea por el maleo y por escucharme siempre, a Mario por sus ánimos y nuestras conversaciones, a Pablo por sus canciones de la semana, a María por los consejos con la Tesis y por los días en la Central, a Patri por su amistad desde que empecé Veterinaria, a M y a B por los grandes momentos en el Messenger y por su cariño y apoyo, a Euge porque es y siempre será nuestra psicóloga de confianza y por todos los grandísimos momentos

juntas (¡y los que quedan!)... A Hugo, porque es una de las personas que más admiro y porque sé que siempre puedo contar con él y con sus consejos. Y a la otra mitad del "vs. The World", a Amaia, aunque no me puedo quedar sólo con un motivo: gracias por los consejos, por los pompones, por escucharme, por estar siempre ahí, por los viajes, por los momentos de risa maníaca y por ser una ninja majérrima (mieeehr).

Y a <3 <-lm(n~e, data=vidas), por hacer que todo sea mucho mejor y porque nunca pensé que un comando de estadística pudiera alegrarme cada día. Soy una chica con mucha suerte.

—Do you know what happens to lads who ask too many questions?

—No. What?

—Damned if I know. Probably they get answers, and serve 'em right.

(Terry Pratchett)

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	23
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	33
1.- Plaquetas.....	33
2.- Desarrollo plaquetario.....	34
3.- Estructura plaquetaria.....	36
4.- Función plaquetaria.....	47
5.- Regulación de la agregación plaquetaria.....	50
6.- Vías de señalización de la activación y agregación plaquetaria.....	55
7.- Células de cultivo HEK293.....	63
8.- Homeostasis del Ca ²⁺	66
9.- Homeostasis del Ca ²⁺ en la función plaquetaria.....	83
OBJETIVOS.....	89
METODOLOGÍA.....	95
1.- Reactivos.....	95
2.- Preparación de las plaquetas.....	97
3.- Cultivo celular.....	99
4.- Métodos de determinación de la viabilidad celular.....	99
5.- Determinación de la concentración de Ca ²⁺ intracelular. Fluorimetría.....	101
6.- Determinación de la entrada de Mn ²⁺	104
7.- Técnicas para el aislamiento y cuantificación de proteínas.....	104
8.- Técnica para la introducción de péptidos y anticuerpos en las células. Electroporación reversible.....	112
9.- Técnica de inmunofluorescencia.....	113
10.- Determinación de las concentraciones de colesterol.....	114
11.- Preparación de M β CD cargada de colesterol (CLCD).....	114
12.- Biotinilación de proteínas de la superficie celular.....	114
13.- Medida del contenido de F-actina.....	115
14.- Medida del contenido en microtúbulos.....	116
15.- Agregación plaquetaria.....	116
16.- Tratamiento estadístico.....	117
RESULTADOS.....	121
1.- Lipid rafts modulate the activation but not the maintenance of store- operated Ca ²⁺ entry.....	123

2.- Lipid rafts are essential for the regulation of SOCE by plasma membrane resident STIM1 in human platelets.....	135
3.- The cytoskeleton plays a modulatory role in the association between STIM1 and the Ca ²⁺ channel subunits Orai1 and TRPC1.....	143
4.- Functional role of the calmodulin- and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-binding (CIRB) site of TRPC6 in human platelet activation.....	155
DISCUSIÓN.....	165
CONCLUSIONES.....	189
BIBLIOGRAFÍA.....	195

ABREVIATURAS

- $[Ca^{2+}]_c$: Concentración de Ca^{2+} citosólico.
- $[Ca^{2+}]_o$: Concentración extracelular de Ca^{2+} .
- 5HT: 5-hidroxitriptamina.

A

- aa: Aminoácido.
- AA: Ácido araquidónico.
- ABP: Proteínas unidas a actina.
- AC: Adenilato ciclasa.
- ADP: Adenosina difosfato.
- AMPc: Adenosina monofosfato cíclico.
- ASA: Aspirina.
- ATP: Adenosina trifosfato.

B

- BSA: Albúmina de suero bovino.
- BtK: Tirosina cinasa de Bruton.

C

- Ca^{2+} : Calcio.
- CAD: Dominio activador de los canales CRAC.
- CaIDAG-GEF/RasGRP: Factor de intercambio de nucleótidos de guanina regulado por Ca^{2+} y DAG.
- CaM: Calmodulina.
- CRAC: Corrientes activadas por la liberación de Ca^{2+} .
- CICR: Liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} .

- CIF: Factor del influjo de Ca^{2+} .
- CIRB: Dominio de unión de los TRPCs a IP_3R y a calmodulina.
- CLCD: M β CD cargada de colesterol.
- CMD: Dominio modulador de los canales CRAC.
- COX: Cicloxigenasa.
- COX-I: Cicloxigenasa I.
- CRAC: Canales de Ca^{2+} activados por la liberación de Ca^{2+} .

D

- DAG: D-1,2-diacilglicerol.
- Dominio K: Dominio rico en lisinas.
- DTT: Ditiotreitól.

E

- ECC: Entrada capacitativa de calcio.
- EF-hand: Dominio de unión a Ca^{2+} .
- EGF: Factor de crecimiento epidermal.
- ENCC: Entrada no capacitativa de Ca^{2+} .
- EPs: Receptor de prostaglandina I_2 .
- EWKFAR: Dominio característico de los TRPs.

F

- FAK: Cinasa de adhesión focal.
- FcR γ : Receptor Fc- γ .
- FGF: Factor de crecimiento derivado de la plaqueta.
- FGF: Factor de crecimiento de los fibroblastos.
- FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

G

- GMPc: Guanosina monofosfato cíclica.
- GP: Glicoproteína.
- GTP: Guanosina trifosfato.

H

- H⁺: Protones.
- H⁺-ATPasa: Bomba de H⁺ vacuolar.
- HBS: Tampón Hepes salino.
- HEK293: *Human Embryonic Kidney 293 Cells*.
- HRP: Peroxidasa de rábano picante.

I

- ICAM-2: Molécula de adhesión intracelular 2.
- IgG: Inmunoglobulina G.
- Iono: Ionomicina.
- IP₃: Inositol 1,4,5-trifosfato.
- IP₃R: Receptor inositol 1,4,5-trifosfato.
- IP₄: Inositol 1,3,4,5-tetrakisfosfato.

J

- JP: Jasplakinolida.

L

- LB: Solución Laemmli.
- LDPR/S: Lugar de escisión de la trombina en el receptor de trombina.
- LRR: Secuencia de leucinas muy conservadas.

M

- MLC: Cadena ligera de miosina.
- MLCK: Cinasa de la cadena ligera de miosina.
- Mn²⁺: Manganeseo.
- MP: Membrana plasmática.

N

- Na⁺: Sodio.
- NAADP: Nicotinato de adenina dinucleótido fosfato.
- NADP: Nicotinadenín dinucleótido fosfato.
- NCX: Intercambiador Na⁺/Ca²⁺.
- NGF: Factor de crecimiento nervioso.
- NMDA: Ácido N-metil-D-aspártico.
- NO: Óxido nítrico.
- NRTKs: Tirosina cinasa no receptor.

O

- OAG: 1-oleoil-2-acetil-sn-glicerol (análogo de DAG).

- OASF: Fragmento más pequeño activador de Orai1.

P

- P47: Pleckstrina.
- PA: Ácido fosfatídico.
- PAF: Factor activador de las plaquetas.
- PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1.
- PAR: Receptor activado por las proteasas.
- PBS: Tampón fosfato salino.
- PDGF: Factor de crecimiento derivado de la plaqueta.
- PF-4: Factor plaquetario 4.
- PG: Prostaglandina.
- PGG₂: Prostaglandina G₂.
- PGH₂: Prostaglandina H₂.
- PGI₂: Prostaglandina I₂.
- PH: Dominio de unión a pleckstrina.
- PI3-K: Fosfatidil inositol 3 cinasa.
- PIP₂: Fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato.
- PIP₃: Fosfatidil inositol 3,4,5-trifosfato.
- PKA: Proteína cinasa A.
- PKB: Proteína serina/treonina cinasa Akt.
- PKC: Proteína cinasa C.
- PKG: Proteína cinasa G.
- PLA2: Fosfolipasa A₂.
- PLC: Fosfolipasa C.
- PMCA: Bomba ATPasa de Ca²⁺ de la membrana plasmática.

- PPP: Plasma pobre en plaquetas.
- PRP: Plasma rico en plaquetas.
- PTKs: Proteínas tirosina cinasas.
- PTP: Proteínas tirosina fosfatasa.

R

- RE: Retículo endoplásmico.
- RGD: Secuencia arginina-glicina-aspartato.
- ROC: Canal activado por receptor.
- RTKs: Receptores tirosina cinasa.
- RyR: Receptor de la rianodina.

S

- SAM: Dominio alfa estéril.
- SCA: Sistema canalicular abierto.
- SCaMPER: Canal liberador de calcio mediado por esfingolípidos unidos a proteínas del retículo endoplásmico.
- Ser/Thr: Serina/treonina.
- SERCA: Bomba ATPasa de Ca²⁺ del retículo sarco/endoplásmico.
- SH: Dominio de unión a Src.
- SMOC: Canal activado por segundos mensajeros.

- SOAR: Región de STIM1 activadora de Orai1.
- SOC: Canal activado por el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} .
- STD: Sistema tubular denso.

T

- TBHQ: 2,5-di(ter-butil)-1,4-hidroquinona.
- TBS: Solución de lavado.
- TBST: Solución de lavado con Tween 20.
- TG: Tapsigargina.
- TPC: Canales de dos dominios de poro.
- TRP: Receptor de potencial transitorio.
- TRPC1: Receptor de potencial transitorio C1.

- TRPC3: Receptor de potencial transitorio C3.
- TxA₂: Tromboxano A₂.

V

- VASP: Fosfoproteína estimulada por vasodilatadores.
- VOCs: Canal activado por voltaje.
- vWF: Factor de Von Willebrand.

INTRODUCCIÓN

En las células eucariotas el ion calcio (Ca^{2+}) constituye la señal más versátil de las implicadas en el control de procesos y funciones celulares, de manera que por sí mismo es un mecanismo universal de señalización celular. Una vez que aumenta transitoriamente su concentración en el citoplasma ($[\text{Ca}^{2+}]_c$), ejerce efectos reguladores alostéricos de muchas enzimas y proteínas. Además, el Ca^{2+} puede actuar en la transducción de señales tras su entrada al citoplasma desde el medio extracelular, como resultado de la activación de canales iónicos localizados en la membrana plasmática (MP), o como un segundo mensajero liberado desde depósitos intracelulares, fundamentalmente desde el retículo endoplásmico (RE), mediante las vías de transducción de señales en las que participan los receptores de membrana acoplados a proteínas G. Entre las importantes funciones fisiológicas en las que el Ca^{2+} juega un papel determinante podemos señalar la contracción muscular y la motilidad celular, incluyendo los movimientos de cilios y flagelos, así como la regulación de actividades enzimáticas, de bombas iónicas y de componentes del citoesqueleto (filamentos de actina y microtúbulos).

En mamíferos, la concentración sérica de Ca^{2+} está finamente regulada, siendo la del calcio total 2,2-2,6 mmol/L (9-10,5 mg/dL) y la del calcio iónico 1,1-1,4 (4,5-5,6 mg/dL). La $[\text{Ca}^{2+}]_c$ se mantiene normalmente en el rango de 10-100 nM. Para mantener esta baja concentración, el Ca^{2+} es bombeado activamente desde el citosol al medio extracelular y hacia el interior del RE y, algunas veces, a la mitocondria. Además, determinadas proteínas citosólicas, como la **calmodulina**, y algunas organelas, como los compartimentos acídicos, actúan como tampones de Ca^{2+} . Muchos de los eventos mediados por Ca^{2+} tienen lugar cuando el Ca^{2+} libre citosólico se une y activa a la proteína reguladora calmodulina (CaM). La CaM puede, por su parte, activar proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} /CaM o puede actuar directamente sobre otras proteínas efectoras.

Son muchas las señales específicas que pueden inducir un súbito incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ hasta 500-1000 nM mediante la apertura de canales del RE y de MP. La vía más común que incrementa la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ es la vía de la fosfolipasa C (PLC). Diversos receptores de la superficie celular, incluyendo los

receptores acoplados a proteínas G y los receptores tirosina cinasa, activan la enzima PLC. A su vez, la PLC hidroliza a los fosfolípidos de membrana, PIP₂, produciendo inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG), dos clásicos segundos mensajeros. El DAG activa la enzima proteína cinasa C (PKC), mientras que el IP₃ difunde en el citosol y se une a su receptor en el RE, el IP₃R, que es un canal de Ca²⁺, de forma que se libera Ca²⁺ desde el RE.

La salida de Ca²⁺ desde el RE activa la entrada de Ca²⁺ desde el exterior celular por activación de canales operados por los almacenes (SOCs, del inglés *Store-Operated Channels*). Esta corriente de entrada de Ca²⁺, que se produce como consecuencia de la liberación del Ca²⁺ almacenado en los depósitos intracelulares, se conoce como corriente de Ca²⁺ activada por liberación de Ca²⁺ (I_{CRAC} , del inglés *Ca²⁺-release-activated Ca²⁺ current*). También es común referirse a ella como entrada de Ca²⁺ operada por los depósitos (SOCE, del inglés *Store-Operated Ca²⁺ Entry*) o entrada capacitativa (ECC). El mecanismo responsable de que se produzca I_{CRAC} no se conoce completamente y está siendo objeto de estudio en nuestro Departamento desde hace más de una década. Por el momento contamos con un modelo de entrada de Ca²⁺ operada por los depósitos en el que están implicadas las proteínas Orai1, STIM1 y varias proteínas TRPC (Jardin *et al.*, 2008a; Jardin *et al.*, 2009a). Recientes estudios han señalado a la fosfolipasa A2β (PLA), el NAADP y la proteína STIM1 como posibles mediadores de I_{CRAC} (Dionisio *et al.*, 2011; Lopez *et al.*, 2006b; Rosado *et al.*, 2005).

Tanto Orai1 como los TRPCs son proteínas incorporadas en la **bicapa lipídica** de la MP, y se sabe que el colesterol presente en la misma es fundamental para el mantenimiento de la simetría de la bicapa, de forma que la depleción del colesterol tiene efectos muy profundos tanto en la arquitectura como en la función de dicha membrana. La movilidad lateral de las proteínas de la MP se reduce cuando el colesterol celular se depleciona, y este cambio en la movilidad es una consecuencia de la reorganización del citoesqueleto de actina y de la condensación de la membrana. Es conocido que los agentes que actúan sobre la actina cortical interfieren con la activación de la ECC: la estabilización del **citoesqueleto** cortical con jasplakinolida reduce la ECC en la mayoría de las células (Rosado *et al.*, 2000b), posiblemente por interferir con la asociación entre STIM1 y canales de Ca²⁺ (Tamarina *et al.*, 2008), mientras que la disrupción del citoesqueleto con latrunculina A o con citocalasina D activa algunas rutas de la

entrada de Ca^{2+} (Morales *et al.*, 2005). Por otro lado, STIM1 se localiza fundamentalmente en la endomembrana de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} (aunque también se ha comunicado su presencia en la MP), actuando como el sensor de Ca^{2+} que informa a los canales implicados en la ECC de la cantidad de Ca^{2+} almacenado, y por tanto de la conveniencia de permitir la entrada del catión. La transmisión de esta información requiere una aproximación de la endomembrana a la MP, de modo que el contacto STIM1-Orai1-TRPCs sea posible, y es en esta aproximación donde otro componente del citoesqueleto, los microtúbulos, podría jugar un importante papel fisiológico.

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 2009-2013, y bajo la dirección de los doctores J.A. Rosado y G.M. Salido, experimentos para determinar con mayor precisión científica algunos mecanismos que permitan ampliar nuestro conocimiento de la ECC. Particularmente, hemos centrado nuestra atención en la función de tres actores principales de este fenómeno: las balsas lipídicas de membrana, el citoesqueleto y la calmodulina. De ahí que hayamos titulado esta Tesis "Papel de Orai, STIM y TRPC en la entrada de calcio", que sometemos a la consideración de la Comisión Evaluadora y con la que aspiramos a la obtención del grado de Doctora Europea por la Universidad de Extremadura.

INTRODUCTION

In eukaryotic cells the ion calcium (Ca^{2+}) is the most versatile signal involved in controlling cellular processes and functions, so that it is a universal mechanism of cell signalling. Once its concentration in the cytoplasm ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) is transiently increased, it acts as an allosteric regulator of many enzymes and proteins. In addition, Ca^{2+} is involved in signal transduction after its entry from the extracellular medium into the cytoplasm, as a result of the activation of ion channels located on the plasma membrane (PM). It also acts as a second messenger released from intracellular stores, mainly from the endoplasmic reticulum (ER) through the signal transduction pathways involving membrane receptors coupled to G proteins. Among the important physiological functions in which Ca^{2+} plays a role, we can highlight muscle contraction and cell motility, including the movements of cilia and flagella, as well as the regulation of enzymatic activities, of ion pumps and components of the cytoskeleton (actin filaments and microtubules).

In mammals, the Ca^{2+} concentration in serum is tightly regulated, being the total one from 2.2 to 2.6 mmol/L (9 to 10.5 mg/dL) and the ionic one from 1.1 to 1.4 (4.5 to 5.6 mg/dL). $[\text{Ca}^{2+}]_c$ is normally maintained in the range of 10-100 nM. To maintain this low concentration, Ca^{2+} is actively pumped from the cytosol to the extracellular medium and into the ER and, sometimes, into the mitochondria. Furthermore, certain cytosolic proteins such as **calmodulin**, and organelles such as acidic calcium stores act as Ca^{2+} buffers. Many of the Ca^{2+} -mediated events occurs when free cytosolic Ca^{2+} binds to the regulatory protein calmodulin (CaM) and activates it. CaM can activate Ca^{2+} -dependant protein kinases or can act directly on other effector proteins.

There are many specific signals that can induce a sudden increase in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ to 500-1000 nM by opening channels of the RE and PM. The most common way to increase $[\text{Ca}^{2+}]_c$ is by the pathway of phospholipase C (PLC). Several cell surface receptors, including the G protein-coupled receptors and tyrosine kinase receptors, activate the enzyme PLC. In turn, PLC hydrolyzes membrane phospholipids PIP_2 , producing inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) and diacylglycerol (DAG), two classic second messengers. DAG activates the enzyme protein

kinase C (PKC), while IP_3 diffuses in the cytosol and binds to its receptor in the ER, IP_3R , which is a Ca^{2+} channel, so that Ca^{2+} is released from the ER.

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+} , which is produced after the release of the Ca^{2+} stored in the intracellular stores, is known as Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release (I_{CRAC} , from Ca^{2+} -release-activated Ca^{2+} Current). It is also commonly called Store-Operated Ca^{2+} Entry (SOCE). The mechanism responsible for I_{CRAC} is not completely understood and it has been studied in our Department for over a decade. At the moment we have a model for SOCE which involves proteins Orai1, STIM1 and several TRPC proteins (Jardin *et al.*, 2008a; Jardin *et al.*, 2009a). Recent studies pointed phospholipase A2 β (PLA), NAADP and STIM1 as potential mediators of I_{CRAC} (Dionisio *et al.*, 2011; Lopez *et al.*, 2006b; Rosado *et al.*, 2005).

Both Orai1 and TRPCs are proteins located in the **lipid bilayer** of PM, and it is known that cholesterol in this bilayer is essential to maintain the symmetry of the structure, so that cholesterol depletion has a profound effect both in the architecture and function of the membrane. Lateral mobility of the proteins in the PM is reduced when cellular cholesterol is depleted, and this change in mobility is a result of the reorganization of the actin cytoskeleton and condensation of the membrane. It has been reported that the agents that act on the cortical actin interfere with the activation of SOCE: the stabilization of the cortical **cytoskeleton** with jasplakinolide reduces SOCE in most cells (Rosado *et al.*, 2000a), possibly by interfering with the association between STIM1 and Ca^{2+} channels (Tamarina *et al.*, 2008), while disruption of the cytoskeleton with latrunculin A or with cytochalasin D activates some pathways of Ca^{2+} entry (Morales *et al.*, 2005). STIM1 is located mainly in the endomembrane of Ca^{2+} intracellular stores (although its presence in the PM has also been reported), acting as the sensor of Ca^{2+} which reports the amount of Ca^{2+} stored into the channels involved in SOCE. Transmission of this information requires an approximation of the endomembrane to the PM, so that STIM1-Orai1-TRPCs contact is possible. It is in this approach where other components of the cytoskeleton, the microtubules, may play an important physiological role.

Given these and other considerations, which will be explained below, we have conducted, at the laboratories of the Department of Physiology at the Faculty of Veterinary Medicine, during the period 2009-2013, and under the supervision of the doctors J.A. Rosado and G.M. Salido, experiments to determine with more scientific accuracy some mechanisms that will expand our understanding of SOCE. In particular, we focused our attention on the role of three key players in this phenomenon: membrane lipid rafts, cytoskeleton and calmodulin. We have therefore entitled this Thesis "Role of Orai, STIM and TRPC in the calcium entry", which we submit for consideration by the Evaluation Commission and with which we aim to obtain the degree of European Doctor of the University of Extremadura.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

1.- Plaquetas.

En el torrente sanguíneo humano circulan aproximadamente 1 trillón de plaquetas. Éstas constituyen uno de los elementos formes de la sangre (junto a los eritrocitos y a los leucocitos) y son los fragmentos celulares más pequeños que circulan por ella. Fueron descritas por primera vez en 1882 por Giulio Bizzozzero, que las llamó “petites plaques” y, aunque entonces ya se demostró que participaban en la hemostasia y coagulación sanguínea, fue en 1886 cuando Eberth y Schimmelbusch definieron estas células como el pilar básico del proceso de coagulación sanguínea (Tocantis, 1948).

Las plaquetas son células anucleadas con forma de disco biconvexo (discocitos), con 0,5-3 μm de diámetro, 4-7 μm^3 de volumen, 10 pg de peso y carga eléctrica negativa en su superficie. La razón exacta de la forma de disco no se conoce, aunque esta forma podría ayudar a su capacidad de circular cerca del endotelio en el torrente sanguíneo. Su concentración normal en la sangre es de 1,5 a 3,5 x 10⁸ plaquetas/mL y su vida media circulando en sangre es de 8 a 11 días, para, tras este período, ser destruidas por los macrófagos del sistema retículo-histiocitario del bazo, hígado y médula ósea (Frojmovic *et al.*, 1982). Al microscopio óptico, en frotis teñidos con la coloración de May-Grünwald-Giemsa, aparecen como elementos rojizos y de contenido granular; mientras que, al observarlas al microscopio electrónico, aparecen como elementos discoides biconvexos, de superficie lisa salvo por pequeñas invaginaciones (las entradas al sistema canalicular abierto). Cuando las plaquetas se activan, su morfología se transforma en irregular y esférica, con multitud de pseudópodos (White, 1987).

La función principal de las plaquetas es la de contribuir al mantenimiento de la hemostasia. Esta función la llevan a cabo de dos formas: por un lado, en los sitios donde se produce el daño vascular y las hemorragias, las plaquetas forman el tapón hemostático, reduciendo así la pérdida de sangre (Kaushansky, 2008); y por otro lado, y para el desarrollo y la consolidación del trombo, las plaquetas activan la cascada de coagulación y actúan como sitios catalíticos, exponiendo fosfolípidos en su superficie (Lowenberg *et al.*, 2010). Por otra parte,

las plaquetas están también implicadas en otros procesos, fisiológicos o patológicos, como la defensa antimicrobiana, la inflamación, la regulación inmunitaria o el crecimiento de tumores y la metástasis (Gresele *et al.*, 2008). Asimismo, la secreción de diferentes factores autocrinos desde las plaquetas es fundamental para controlar la hemostasia. Algunos de estos factores son la trombina, la adenosina bifosfato (ADP) o factores activadores de plaquetas, que se liberan con el fin de activar otras plaquetas para reparar el daño vascular, produciendo vasoconstricción y reclutamiento de otras células como los macrófagos y los leucocitos para evitar posibles infecciones (Kaplan *et al.*, 1979; Linder *et al.*, 1979; Zucker *et al.*, 1979). Además, la secreción plaquetaria es importante para evitar enfermedades que comprenden tumores vasculares, previniendo hemorragias (Ho-Tin-Noe *et al.*, 2009).

2.-Desarrollo plaquetario.

En un humano adulto se producen aproximadamente 10^{11} plaquetas al día (Italiano, 2008), para garantizar el mantenimiento de la concentración de las mismas en sangre. Estas nuevas plaquetas se distribuyen entre una parte circulante en el torrente sanguíneo (aproximadamente dos tercios de las nuevas plaquetas) y una parte tisular (que constituye el tercio restante). La formación de nuevas plaquetas es a partir de los megacariocitos de la médula ósea (a partir de un megacariocito maduro se producen entre 1000 y 3000 plaquetas (Stenberg *et al.*, 1989)), en un proceso denominado megacariocitopoyesis, regulado por factores de transcripción y citocinas como la trombopoyetina. La megacariocitopoyesis es un proceso que comprende la especialización de las células madre hematopoyéticas pluripotenciales hacia los megacarioblastos (progenitores de los megacariocitos). La proliferación y diferenciación de los megacarioblastos producirá promegacariocitos, que, tras una poliploidización, darán lugar a los megacariocitos, células altamente especializadas que producirán plaquetas a través de su maduración y de la fragmentación de su citoplasma (Kaushansky, 2008). El proceso de la producción de plaquetas a partir de los megacariocitos por un gran número de replicaciones del ADN, pero sin división celular, se denomina endocitosis (Nagata *et al.*, 1997; Vitrat *et al.*, 1998). Entre la diferenciación de las células precursoras y la producción de plaquetas en el ser humano transcurren aproximadamente 10 días (Harker *et al.*, 1969; Patel *et al.*, 2005).

Por lo tanto, en este proceso podemos distinguir morfológicamente cuatro tipos de células:

-Megacarioblasto: Esta célula es parecida a una célula madre hematopoyética. Su tamaño es de entre 30 y 40 μm de diámetro y posee una alta ratio núcleo/citoplasma (debido a un incremento en la ploidía). Además, el megacarioblasto presenta cromatina fina (debido a la eucromatina, que es transcripcionalmente activa), nucleolo prominente y un anillo de citoplasma basófilo pequeño, sin gránulos, rico en ribosomas, con alta actividad de síntesis proteica y mitocondrias de gran tamaño (Behnke, 1968).

-Promegacariocito granular: Esta célula tiene un tamaño de aproximadamente 80 μm de diámetro. El núcleo casi ha finalizado de sintetizar el material genético y presenta un contorno irregular, y el citoplasma se hace mayor y más basófilo, con un aumento de la cantidad de gránulos presentes (Behnke, 1968).

-Megacariocito granular: Con un tamaño de entre 50 y 100 μm , esta célula posee un núcleo polilobular y un citoplasma que se va haciendo azurófilo de forma progresiva, de forma similar a las plaquetas (Behnke, 1968).

-Megacariocito maduro: En esta fase, se producirán las proplaquetas, que acabarán compactando y perdiendo su núcleo para liberar plaquetas individuales al torrente sanguíneo (Chang *et al.*, 2007). Este proceso no se conoce con exactitud, y se han presentado varios modelos que podrían explicarlo. Uno de ellos sugiere que se producen una serie de invaginaciones en la membrana del megacariocito, de tal forma que se acotan unas demarcaciones que producirán la membrana de la plaqueta (Behnke, 1968). Otro de los modelos sugiere que en la superficie del megacariocito se desarrollarán gruesos pseudópodos que atravesarán las sinusoides medulares (cuya pared está formada por dos capas celulares, una endotelial y la otra adventicia), pasando entre las células adventicias y penetrando en el endotelio (Radley *et al.*, 1980). Finalmente, otra de las teorías indica que las proplaquetas viajan desde la médula ósea hasta los pulmones, donde, debido al estrés mecánico de la respiración, se fragmentan dando lugar a las plaquetas (Kaufman *et al.*, 1965).

3.-Estructura plaquetaria.

La plaqueta se caracteriza, aparte de por la mencionada ausencia de núcleo, por presentar la siguiente estructura:

3.1-Membrana externa.

La membrana de las plaquetas es una estructura trilaminar formada por una bicapa lipoproteica con colesterol, lípidos neutros, glicolípidos y glicoproteínas. Estas últimas actúan como receptores de los agonistas fisiológicos de las plaquetas (ADP, trombina, tromboxano A₂ (TxA₂), fibronectina, laminina, vitronectina, trombospondina, factor de von Willebrand (vWF)) y para ligandos como el colágeno (Gresele *et al.*, 2008; Lowenberg *et al.*, 2010). Esta estructura es la que permite que la membrana tenga un aspecto rígido y plástico, y que la plaqueta pueda llevar a cabo ciertas funciones.

Los fosfolípidos presentes en la membrana tienen una distribución asimétrica en la misma, de forma que los cargados negativamente (como la fosfatidilserina) se encuentran en la parte interna de la membrana, desempeñando una función procoagulante. Si la plaqueta está en reposo, estos fosfolípidos de la cara interna no podrán contactar con los factores plasmáticos que activan la coagulación. En cambio, durante la agregación plaquetaria, estos fosfolípidos se externalizan, contactando así con esos factores.

En la membrana plasmática encontramos las balsas lipídicas, unas zonas concretas de la membrana que son dominios de la misma ricos en colesterol y esfingolípidos, de un diámetro aproximado de 50 nm, encargados de organizar la unión de diferentes moléculas de señalización (Prieschl *et al.*, 2000). Su denominación de “balsas” se debe a que se encuentran flotando entre el resto de lípidos de la membrana plasmática, gracias a que forman una fase lipídica de mayor densidad que la del resto.

Estas balsas lipídicas participan en numerosas funciones celulares, y ayudan a la interacción de las proteínas asociadas a la ECC mediante la constitución de plataformas para las proteínas de membrana implicadas en la entrada de Ca²⁺ (Jardin *et al.*, 2008d; Pani *et al.*, 2008; Sampieri *et al.*, 2008). Además, estos dominios de balsas lipídicas son importantes para la activación

de muchas funciones celulares, incluyendo la adhesión y migración celular, la apoptosis, la organización del citoesqueleto, la exocitosis y la endocitosis (Pani *et al.*, 2009; Simons *et al.*, 2000). Estos procesos celulares son asimismo dependientes de los aumentos en la concentración de Ca^{2+} , y se sabe que los estas balsas lipídicas regulan el mecanismo de activación de la ECC (Sampieri *et al.*, 2008).

Es la membrana plasmática la que permite la interacción de la plaqueta con el medio exterior, gracias a receptores como las integrinas, una familia formada por 24 proteínas resultantes de la asociación de subunidades α y β , que reconocen a proteínas que presentan la secuencia arginina-glicina-aspartato (RGD), es decir, fibrinógeno, fibronectina, vitronectina, vWF y colágeno. Las integrinas más importantes son las siguientes:

-Integrina GPIIb/IIIa (o $\alpha_{IIb}\beta_3$): También se conoce como receptor de fibrinógeno. Estructuralmente está formada por dos cadenas α_{IIb} y β_3 , cada una con un largo dominio extracelular, formando una región globular donde se encuentran los sitios de unión con los ligandos (Kamata *et al.*, 2005), seguido de un dominio transmembrana y una corta región citoplasmática (Poncz *et al.*, 1987). Es muy abundante en la superficie de las plaquetas activadas, pero permanece asociada a las membranas plaquetarias internas asociada principalmente con los gránulos α (D'Souza *et al.*, 1990). Además de ser receptor para el fibrinógeno, se une también a vWF, vitronectina y fibronectina, por lo que juega un papel fundamental en la hemostasia primaria. Esto sucede cuando se activa la plaqueta, momento en el cual la integrina establece una interacción estable entre vWF y la matriz extracelular, usando el fibrinógeno como molécula puente para el trombo plaquetario (Savage *et al.*, 1998). Esta integrina puede formar complejos en presencia de calcio (Fujimura *et al.*, 1983; Santoro, 1988). Debido a su importante papel en la patogénesis de la trombosis, el bloqueo de la función de esta integrina se ha utilizado como terapia preventiva en pacientes con oclusiones coronarias (Coller, 2001).

-Integrina GPIb/IX/V: Esta integrina constituye el segundo receptor más abundante de las plaquetas (Du *et al.*, 1987). Su función es mediar la adhesión plaquetaria a la matriz subendotelial, para lo cual recluta factores de coagulación para las plaquetas activadas. Estructuralmente, está formada por 4 subunidades, GPIb α (~135 kDa), GPIb β (~25 kDa), GPIX (~22 kDa) y GPV (~82 kDa). Las

cuatro se caracterizan por poseer la secuencia LRR (con leucinas altamente conservadas), esencial para el correcto funcionamiento del complejo (Hocking *et al.*, 1998). Esta integrina se une al vWF inmovilizado en el endotelio expuesto, lo cual es fundamental para la adhesión plaquetaria en el sitio donde se ha producido el daño vascular, permitiendo la adhesión firme de las plaquetas al colágeno, mediada por GPVI e integrinas. El vWF se une primeramente al colágeno, componente principal de la matriz subendotelial expuesta al producirse el daño, y tras esta unión, la interacción entre el vWF y la integrina media la unión de las plaquetas con el colágeno. Esta integrina es capaz también de unirse a la trombospondina, a la integrina $\alpha M\beta 2$ y a la P-selectina (Gresele *et al.*, 2008). Además, esta integrina también se une a la trombina, a través de un dominio de unión de alta afinidad, de forma que regula la coagulación sanguínea, la interacción entre el factor XI y la trombina y la activación plaquetaria (Celikel *et al.*, 2003). La integrina GPIb/IX/V juega asimismo un papel muy importante en la inflamación, puesto que media la interacción con las células endoteliales activadas y los leucocitos, gracias a su unión con la P-selectina y la integrina leucocitaria Mac-1. La deficiencia de esta integrina produce el síndrome de Bernard-Soulier (diátesis hemorrágica hereditaria).

-Glicoproteína VI (GPVI): Esta glicoproteína, con un tamaño aproximado de 62 kDa, se localiza 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). Una vez que el complejo GPVI-FcR γ contacta con el colágeno, se activa una vía de señalización que incluye proteínas como Syk, SLP-76, LAT y fosfolipasa C $\gamma 2$ (Ichinohe *et al.*, 1997; Keely *et al.*, 1996; Redondo *et al.*, 2005a; Worth *et al.*, 2006). Se ha visto que la tirosina cinasa de Bruton también participa en las vías de señalización plaquetaria de GPVI, estando implicada en la activación de la entrada de calcio (Keely *et al.*, 1996). Junto a la GPIV (CD36) y GPIa/IIa, GPVI constituye el receptor de colágeno más importante en plaquetas. Esta unión de GPVI al colágeno se produciría tras la unión plaqueta-colágeno, de la cual son responsables receptores como GPIa/IIa (Verkleij *et al.*, 1998). Para la completa activación de las plaquetas por colágeno son necesarias las glicoproteínas GPIIb/IIIa y GPVI, pero mientras la inhibición de la GPVI inhibe la formación del trombo, el bloqueo de la GPIIb/IIIa no tiene efectos destacables. Teniendo esto en cuenta, se ha sugerido que el colágeno se uniría a GPVI activando las

plaquetas y regulando así de manera positiva la GPIIb/IIIa (Gresele *et al.*, 2008; Ichinohe *et al.*, 1997).

-P-selectina (CD62P): Con un tamaño aproximado de 140 KDa, es la mayor de las moléculas de adhesión de la familia de las selectinas. Está principalmente situada en la membrana de los gránulos α , pero también está en los gránulos densos y en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales (Vial *et al.*, 2002). Cuando las plaquetas están inactivadas, apenas una pequeña cantidad de P-selectina se encuentra en la membrana. Sin embargo, cuando se activan, al fusionarse los gránulos con la superficie de la plaqueta se produce una expresión rápida de P-selectina en la superficie, lo cual se suele usar como marcador de activación plaquetaria (Merten *et al.*, 2000). La P-selectina se une al vWF y a la GPIb α , y participa en la hemostasia, así como en la interacción con otras células responsables de la inflamación (Tailor *et al.*, 2005).

-Receptores de trombina: El receptor de la trombina en plaquetas es una glicoproteína con 7 dominios transmembrana que se desensibiliza e internaliza rápida y permanentemente cuando se activa (Authi *et al.*, 1997). Posee un dominio con 100 residuos extracelulares en el extremo amino terminal, con un lugar putativo de escisión por la trombina, llamado sitio LDPR/S (Coughlin *et al.*, 1992). La trombina puede activar las plaquetas a bajas concentraciones, de 0,1 nM (0,01 U/mL), y es el agonista fisiológico más eficaz hidrolizando el fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP₂), siendo este proceso mediado por la fosfolipasa C (PLC) y produciéndose los segundos mensajeros inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y D-1,2-diacilglicerol (DAG). IP₃ inducirá la liberación de Ca²⁺ desde los depósitos intracelulares (Sage *et al.*, 1989; Shukla *et al.*, 1987; Suganuma *et al.*, 1992). La trombina también activa Rho, una pequeña GTPasa de la familia Ras que promueve la reorganización del citoesqueleto de actina y el cambio morfológico de las plaquetas (Moers *et al.*, 2003; Olson *et al.*, 1995). La activación plaquetaria por la trombina está mediada por miembros de la familia de proteínas G acopladas al receptor activado por proteasas (del inglés *Protease-Activated Receptor*, PAR), de los cuales PAR1 y PAR4 se expresan en las plaquetas humanas (Kahn *et al.*, 1998). La activación de estos PAR se produce cuando la trombina corta el extremo N-terminal de cada receptor, creando un nuevo extremo amino del receptor y mostrando un ligando SFLLRN (PAR1) o AYPGKF (PAR4), que activará a cada receptor (Vu *et al.*, 1991). El receptor PAR1

presenta alta afinidad por la trombina y el PAR4 baja (Covic *et al.*, 2000). Ambos liberan Ca^{2+} mayoritariamente del sistema tubular denso (STD), el equivalente al retículo endoplásmico (RE) en las plaquetas; y, en menor medida, de los gránulos ácidos. Por su parte, la integrina GPIb/IX/V, que posee un dominio de alta afinidad a la trombina, lo libera de forma exclusiva desde los gránulos ácidos (Jardin *et al.*, 2007).

-Receptor de ADP: Las plaquetas humanas, como muchas otras células, contienen receptores de ADP. El ADP es un importante agonista fisiológico durante la hemostasia y la trombosis, y es almacenado en los gránulos densos de las plaquetas, liberándose tras la activación de las mismas. Este ADP induce la fosforilación de proteínas, la formación de TxA_2 , el aumento del Ca^{2+} citosólico, el cambio de forma, la agregación y la secreción, e inhibe la formación de adenosín monofosfato cíclica (AMPC) (Gresele *et al.*, 2008). El ADP actúa sobre dos receptores purinérgicos acoplados a proteínas G, P2Y₁ y P2Y₁₂ y para que la respuesta al agonista sea completa ambos receptores tienen que activarse. Estos receptores son miembros de la familia de proteínas de receptores acoplados a proteínas G, con siete dominios transmembrana. P2Y₁ está acoplado a la proteína G_{αq} y es responsable del aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, el cambio morfológico y la agregación de las plaquetas, mediante la activación de la PLCβ (Jin *et al.*, 1998). P2Y₁₂, por su parte, está acoplado a la proteína G_{αi}, que activa a la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3-K) e inhibe a la adenilato ciclasa (AC) (Jones *et al.*, 2011; Kauffenstein *et al.*, 2004).

-Receptor P2X₁: Es un miembro de la familia de los receptores purinérgicos no acoplados a proteínas G, y es la única isoforma de la familia P2X que se expresa en las plaquetas y los megacariocitos (Scase *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 1998). Se trata de canales activados por adenosina 5'-trifosfato (ATP), que permiten la entrada de Ca^{2+} y Na^+ (Mahaut-Smith *et al.*, 2000). Por otra parte, al activarse este receptor se produce un cambio conformacional rápido y reversible y la centralización de los gránulos secretores, así como procesos propios del inicio de la agregación, tales como la exposición de los sitios de unión al colágeno de la integrina GPIIb/IIIa. Este receptor P2X₁ interacciona con las rutas metabólicas de otros receptores, como los receptores P2Y y los receptores de la trombopoyetina; y con el colágeno y la adrenalina (Oury *et al.*, 2001; Vial *et al.*, 2002). Esto se observa en la potenciación sobre el efecto de los receptores P2Y en la movilización de Ca^{2+} , siendo el incremento mayor tanto en la velocidad de

respuesta como en la liberación de Ca^{2+} al activarse los dos receptores, P2Y y P2X₁ de forma simultánea, que al activarse solamente los receptores del ADP. Esto puede deberse a una potenciación de la PLC o de los receptores de IP₃ por la entrada rápida de Ca^{2+} que se produce tras la activación del P2X₁, precediendo a los eventos de la vía de los receptores acoplados a proteínas G (Mahaut-Smith *et al.*, 2000; Vial *et al.*, 2002).

-Receptor de prostaglandina I₂ (EPs): Se trata de un receptor acoplado a proteínas, en concreto a la G_s, que une prostaglandina I₂ (PGI₂) para mantener a las plaquetas en reposo, para lo cual activa la AC, incrementando el AMPc, lo que da lugar a la inhibición de la activación plaquetaria y a la inactivación de las plaquetas que estaban estimuladas (Coleman *et al.*, 1994). Al activarse EPs y producirse un aumento del AMPc, se inhibe la movilización de Ca^{2+} y los procesos de secreción de los gránulos, de forma que se evitan futuros procesos de activación y agregación plaquetaria (Dusting *et al.*, 1990). El AMPc activa asimismo la fosforilación de la fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP), encargada de regular los filamentos de actina y la reorganización del citoesqueleto. Por otra parte, la fosforilación de esta VASP puede modular la inactivación del receptor de fibrinógeno, evitando su interacción con la integrina GPIIb/IIIa, y la activación plaquetaria (Horstrup *et al.*, 1994). Estos mecanismos ayudan al mantenimiento del endotelio como una superficie antitrombótica y ayudan a evitar que se produzca la activación plaquetaria de forma inapropiada.

3.2.-Citoplasma:

El espacio intracelular de las plaquetas se encuentra separado de la membrana plasmática de las mismas por un fino anillo de citoplasma periférico claramente delimitado al observarse al microscopio electrónico, formado mayoritariamente por α -actina. Este anillo se denomina citoesqueleto de membrana, y es el que proporciona la forma discoidal a las plaquetas, además de ser el responsable de la formación de pseudópodos una vez producida la activación de las plaquetas. Este anillo posee proteínas como la talina o la vinculina, proteínas necesarias para la reorganización de actina, como la filamina o la α -actinina, y también proteínas como la proteína cinasa C (PKC).

El citoplasma plaquetario contiene partículas de glucógeno, fuente energética de la célula. La plaqueta se caracteriza por tener en su citoplasma

organelas específicas, un sistema de membranas especializado y diversos gránulos de almacenaje (George, 2000; Gresele *et al.*, 2008).

3.3.-Citoesqueleto:

El citoesqueleto de las plaquetas es el responsable de mantener la forma discoidal que presentan las plaquetas en reposo y además participa en funciones celulares como la exocitosis, endocitosis y transporte intracelular. Este citoesqueleto está muy especializado, y permite que las plaquetas presenten una rápida respuesta ante los daños vasculares, de forma que se pueda alterar el gel contráctil y se pueda remodelar la actina, tanto durante el cambio morfológico plaquetario producido tras la activación, como para producir los pseudópodos. Los componentes principales de este citoesqueleto son los siguientes:

-Citoesqueleto de actina: La actina es la proteína más abundante en las plaquetas. La G-actina es una proteína de aproximadamente 42 kDa que se organiza en una estructura más compleja denominada filamento de actina o F-actina. Esta F-actina constituye un 40% del total de actina (aproximadamente entre 2000 y 5000 filamentos de actina) en las plaquetas en reposo (Hartwig *et al.*, 1991). El restante 60% de actina se almacena formando un complejo con β -4-timosina, la G-actina globular monomérica, que se transforma en filamentos tras producirse la activación plaquetaria, permitiendo así el cambio morfológico de la célula (Safer *et al.*, 1994). El citoesqueleto de actina forma estructuras como anillos contráctiles, que se modifican constantemente debido a ciertas proteínas asociadas a la F-actina, que controlan la ratio de asociación/disociación de nuevas subunidades de G-actina. Algunas de estas proteínas son la tropomodulina o la Cap Z, que se une a las terminaciones de F-actina evitando que se añadan nuevas subunidades de G-actina.

Cuando las plaquetas se encuentran en estado de reposo, los filamentos de actina se interconectan en distintos puntos con una red citoplasmática rígida o gel contráctil, y poseen sitios de unión con proteínas andamio, como la filamina y la α -actinina, que facilitan la unión de estos filamentos a otras proteínas (Rosenberg *et al.*, 1981; Rosenberg *et al.*, 1982). La interacción entre estos filamentos de actina y la región citoplasmática de la subunidad GPIb α del complejo GPIb-IX-V, mediada por la filamina, es fundamental para la organización estructural de las plaquetas en reposo, puesto que proporcionan

una vía de comunicación entre el citoplasma y los receptores de membrana, disponiendo el complejo GPIb-IX-V en línea en la superficie celular, y además comprimen y estabilizan el gel contráctil en el citoplasma impidiendo su dispersión (White, 2008).

La estabilización o la disrupción del citoesqueleto de actina tiene un papel importante en la motilidad celular, en la fagocitosis, la citocinesis y en la extensión o retracción de estructuras como las microvellosidades intestinales o los axones de las neuronas.

-Anillo marginal de microtúbulos: Este anillo fue descrito por primera vez por White, y está formado por tubulina α y β en un equilibrio dinámico entre monómeros y polímeros, originando una estructura protofilamentosa al unir la subunidad β -tubulina de un heterodímero con la α -tubulina del siguiente, de forma que 13 de estos protofilamentos se unen para formar un único filamento de tubulina con un espacio vacío en su interior. Esta estructura está conservada por proteínas llamadas MAP (proteínas asociadas a microtúbulos). El anillo marginal es una de las características más visibles de las plaquetas en reposo al observarlas al microscopio y, junto al citoesqueleto de la membrana, es el encargado de proporcionar la forma discoidal a estas células, al estar formado por un único microtúbulo de 100 μ M de longitud que se enrolla de 8 a 12 veces en la periferia plaquetaria, formando un entramado que soporta la estructura de la célula, de forma que, al desorganizar los microtúbulos (White, 1968), se pierde esta morfología discoidal. Además, su reorganización es esencial para la completa activación y funcionamiento de la plaqueta en procesos de secreción. En la entrada capacitativa de Ca^{2+} (ECC), este anillo actúa por un lado como barrera para prevenir la ECC constitutiva regulada por el STD, y por otro, apoyando la ECC mediada por los depósitos ácidos de Ca^{2+} (Redondo *et al.*, 2007b). Por otra parte, también está involucrado en el transporte de vesículas y otros orgánulos.

-Gel contráctil o esqueleto de membrana de espectrina: Este gel contráctil es el encargado de envolver la superficie citoplasmática del sistema canalicular abierto (SCA) y de los sistemas de membrana que se desplazan hacia el centro debido a la contracción del gel. Está constituido por largas moléculas de aducina, espectrina y filamentos de actina. La espectrina interacciona con los filamentos de actina, produciendo una ultraestructura de poros triangulares

(Patel-Hett *et al.*, 2011). En plaquetas en reposo, los extremos de polimerización de la actina aparecen bien libres o bien unidos a la proteína Arp2/3, e interaccionan también con la aducina, ya que la afinidad entre el complejo actina-aducina con espectrina es mucho mayor que la afinidad de la espectrina con la actina o la aducina por separado (Barkalow *et al.*, 2003).

3.4.-Organelas:

Las plaquetas contienen en su citoplasma una serie de organelas, como los lisosomas y peroxisomas. Los lisosomas son organelas de pequeño tamaño que contienen gran cantidad de enzimas degradativas, como las enzimas β -galactosidasa, catepsina, aril sulfatasa, β -glucuronidasa y fosfatasa ácida (King *et al.*, 2002). La función principal de estos lisosomas es degradar el material ingerido por fagocitosis o pinocitosis. Por su parte, los peroxisomas son también organelas de pequeño tamaño que contienen la enzima catalasa, que se encarga de la degradación del H_2O_2 (Redondo *et al.*, 2005b).

Además, las plaquetas contienen una pequeña cantidad de mitocondrias, que le dan a la célula la energía necesaria mientras circula por el torrente sanguíneo; un número escaso de ribosomas; y, raramente, retículo endoplásmico rugoso o vesículas del aparato de Golgi.

Sin embargo, la estructura más característica de las plaquetas son los gránulos de secreción, donde se almacenan moléculas activas biológicamente, que son secretadas en los sitios de daño vascular, y cuya función es el reclutamiento de otras células sanguíneas para contribuir a la reparación de dicho daño. En células en reposo, los gránulos se localizan cerca del Sistema Canalicular Abierto (SCA), y al producirse la activación de las plaquetas, los gránulos se fusionan con este SCA y se secretan al torrente circulatorio (Flaumenhaft, 2003). Existen principalmente dos tipos de gránulos en las plaquetas: los alfa y los densos.

-Gránulos alfa: Son los gránulos de mayor tamaño (aproximadamente 200-400 nm) y los más abundantes en las plaquetas, conteniendo cada una aproximadamente 40-60 de éstos. Están delimitados por una membrana simple y poseen forma esférica, con núcleos oscuros en el centro, que se corresponden con los proteoglicanos. En su interior contienen proteínas especiales para la

adhesión plaquetaria durante la reparación del vaso. Se producen en el aparato de Golgi trans (Jones, 1960) y adquieren su contenido molecular en los megacariocitos, previamente a su fragmentación, por dos vías. La primera vía se produce a través de la síntesis endógena de proteínas, como el factor plaquetario 4 (PF-4), la tromboglobulina y el vWF, y se produce cerca del aparato de Golgi. La segunda vía tiene lugar mediante endocitosis y pinocitosis mediada por receptores de proteínas citoplasmáticas, como el fibrinógeno, y se realiza en las regiones periféricas de los megacariocitos (de Larouziere *et al.*, 1998). Esta segunda vía continúa en las plaquetas circulantes.

Estos gránulos también almacenan multitud de proteínas de membrana, como la integrina GPIIb/IIIa, la CD62P y la CD36. Asimismo, almacenan la mayor parte de la P-selectina, que se expondrá al medio extracelular cuando se active la plaqueta, reclutando así neutrófilos en el sitio donde se ha producido el daño vascular (Diacovo *et al.*, 1996). Por otra parte, estos gránulos alfa contienen también un gran número de proteínas encargadas de regular la angiogénesis, lo que permite a estos gránulos modular activamente la formación de nuevos vasos en el sitio de reparación (Folkman *et al.*, 2001).

-Gránulos densos: Estos gránulos, que tienen un tamaño aproximado de 250 nm, tienen como función más importante la de reclutar plaquetas en el sitio donde se ha producido el daño vascular. Esto lo consiguen liberando sustancias hemostáticamente activas una vez que se ha producido la activación de las plaquetas. Algunas de estas sustancias son la serotonina, las catecolaminas, el ADP, el ATP y el Ca^{2+} (a concentraciones muy altas, de aproximadamente 2 mM) (White, 2008). Asimismo, contienen pequeñas proteínas de unión al GTP y moléculas de adhesión, como GPIIb, integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ y P-selectina.

Además de estas sustancias, las plaquetas también liberan sustancias autacoides, prostaglandinas G_2 (PGG_2) y H_2 (PGH_2), TxA_2 (Marcus, 1978) y el factor activador de plaquetas (PAF) (Chignard *et al.*, 1979), encargadas de mediar las primeras fases del reclutamiento de plaquetas hacia el lugar donde se ha producido el daño vascular.

3.5.-Sistema de membranas:

Hay dos tipos de membranas internas, que se diferencian por su contenido en colesterol. Estos dos tipos de membranas son:

-Sistema canalicular abierto (SCA): Se trata de un sistema complejo de canales ramificados interconectados a la membrana, de forma que es en realidad una ampliación de la misma, con glicocálix, unidad de membrana y región submembranosa. Sus funciones principales son dos. En primer lugar, cuando se activan, las plaquetas sufren un cambio morfológico y el SCA se evagina, de forma que aumenta así la superficie secretora. Así, el SCA se transforma en una vía a través de la que se secretarán los productos plaquetarios (Flaumenhaft, 2003). En segundo lugar, el SCA sirve también como reservorio de proteínas y receptores de membrana. Por ejemplo, la tercera parte de los receptores de trombina se encuentran en el SCA en plaquetas en reposo, esperando el transporte a la membrana cuando se activan las plaquetas (Gresele *et al.*, 2008) e incluso el transporte de glicoproteínas desde el SCA hacia los gránulos α (Lopez-Vilchez *et al.*, 2007).

-Sistema tubular denso (STD): Formado por un sistema de canales internos cerrados, que aparece cerca de los microtúbulos, rodeando las organelas, y no conectado con la membrana externa. Tiene una función similar al RE liso en otras células, es decir, de almacenamiento de Ca^{2+} (Jardin *et al.*, 2007; White, 1972). El STD posee bombas de Ca^{2+} que introducen Ca^{2+} en el STD y así, junto con otros mecanismos de la membrana, mantienen las concentraciones de Ca^{2+} citosólico en el rango nanomolar en las plaquetas en reposo. Cuando la célula se activa por los agonistas, se inicia una cascada de señales que acaba produciendo síntesis de IP_3 , el cual causará la liberación de Ca^{2+} desde el STD (Berridge, 1995). Por otra parte, el STD es el principal lugar donde se sintetiza TxA_2 y prostaglandinas (PG), dado que en él se localiza la ciclooxigenasa (COX) (Gerrard *et al.*, 1976; Klinger, 1996).

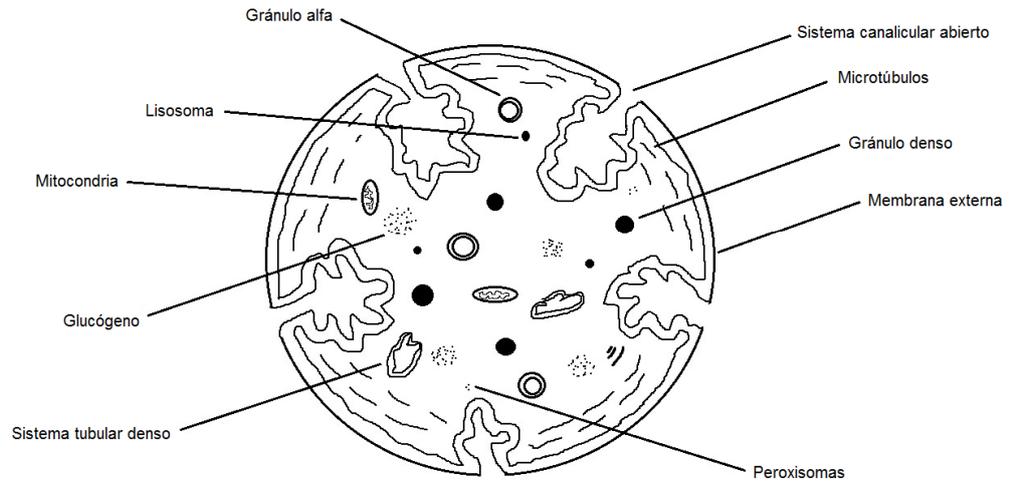


Figura 1. Morfología plaquetaria

4.-Función plaquetaria.

La función fisiológica principal de las plaquetas es la de mantener la hemostasia, es decir, evitar la pérdida de sangre al dañarse un vaso sanguíneo y mantener la integridad del vaso mediante la formación de un tapón hemostático. Para llevar a cabo esta función, las plaquetas obtienen su energía mediante la glucólisis anaerobia a partir de la glucosa, transformando la glucosa en lactato e hidrogeniones, que serán captados por el acetato, entrando en las mitocondrias para que se oxiden en el ciclo de Krebs, produciendo ATP y estabilizando así el pH de la célula (Akkerman, 1978).

Esta función se realiza a través de tres eventos:

-Adhesión plaquetaria: Producida de manera independiente a la plaqueta. Comprende el transporte por difusión de las plaquetas hacia la superficie dañada y la interacción de los receptores de membrana con sus ligandos en las estructuras de la pared lesionada. Cuando el vaso sanguíneo se daña, se expone el colágeno desde el vaso al torrente sanguíneo, permitiendo así la unión del vWF. Este vWF se unirá a su receptor, el GPIb/V/IX en la membrana plasmática de las plaquetas que están circulando por la corriente sanguínea. Dada la fuerza de la corriente, este contacto puede ser reversible y no

provocarse la completa activación plaquetaria, de forma que volverían al torrente sanguíneo. Es por ello que, una vez preactivadas, las plaquetas exponen al exterior de sus membranas plasmáticas 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, los cuales favorecen la unión de las plaquetas al subendotelio que ha sufrido el daño. Por último, las plaquetas se unen también de manera estable al endotelio, produciéndose un cambio morfológico en la célula, de forma que se reduce la resistencia al flujo de sangre y se emiten pseudópodos, reclutando otras plaquetas, además de eritrocitos y leucocitos y proteínas plasmáticas de la sangre para detener la hemorragia (de Groot *et al.*, 2008; Redondo, 2009).

Receptor	Ligando
Complejo GPIb/IX/V	FVW
Subunidad GPIba	P-selectina
Subunidad GPIb β	Trombospondina
	Colágeno
	Trombina
	Factores IX y XII, cininógeno
	Integrina leucocitaria Mac-1
GPVI	Colágeno
	Laminina
GPIV	Colágeno
Integrina $\alpha_2\beta_1$	Colágeno
Integrina $\alpha_5\beta_1$	Fibronectina
Integrina $\alpha_6\beta_1$	Laminina
Integrina $\alpha_v\beta_3$	FVW
	Fibronectina
	Vitronectina
	Osteospondina
Integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$	FVW
	Fibrinógeno
	Fibronectina
	Vitronectina
	Trombospondina

Tabla 1. Receptores y ligandos involucrados en la adhesión

-Cambio morfológico y secreción de gránulos: Las plaquetas pierden la forma discoidal que las caracteriza, adquiriendo una forma esférica, expandiéndose y aumentando su superficie mediante la emisión de pseudópodos (Hartwig, 1992),

gracias a la unión de filamentos de actina. Los pseudópodos pueden ser filopodios (expansiones citoplasmáticas sostenidas por los filamentos de actina, que detienen a la plaqueta en el sitio de daño vascular) o lamelipodios (expansiones que permiten que la plaqueta recubra una mayor superficie de la lesión). Las uniones entre los pseudópodos se rellenan de membrana y los microtúbulos que están en estrecho contacto con el gel contráctil se trasladan al centro de la célula. Se produce la desintegración del citoesqueleto y se restituye a partir de la internalización de fragmentos de la membrana externa, lo cual permite a las plaquetas adquirir forma plana. Estos dos procesos son independientes y dependen de la reorganización del citoesqueleto (Gear, 1994; Gear *et al.*, 2008; Redondo, 2009), de la redistribución de los microtúbulos (Carroll *et al.*, 1982; Davies, 1984; Steiner *et al.*, 1979) y de incrementos en la $[Ca^{2+}]_c$ (Hallam *et al.*, 1985). Además, este proceso es fundamental ya que, al incrementarse la superficie de la membrana plasmática, se exponen receptores que antes no estaban expuestos.

La secreción del contenido de los gránulos α y densos ayuda a la amplificación de la señal de activación de las plaquetas. Para la agregación de las mismas, es fundamental la secreción de endoperóxidos y del TxA_2 .

-Agregación plaquetaria: Este mecanismo es fundamental en el control y mantenimiento de la hemostasia, y está involucrado en la formación del tapón hemostático y el trombo arterial. Los estímulos fisiológicos que pueden inducir la activación plaquetaria son diversos, y actúan de forma sinérgica, combinando su acción, de forma que este efecto es mayor que el que pudiera producirse con un único agonista. Los agonistas fisiológicos más importantes en la agregación plaquetaria son, *in vivo*: el colágeno (en las paredes de los vasos sanguíneos), el ADP (secretado por los glóbulos rojos y por las plaquetas), TxA_2 y otros derivados del ácido araquidónico (AA) (el cual es sintetizado por las plaquetas cuando se activan) y la trombina. Otros agonistas, como la serotonina, también contribuyen al proceso de agregación y otros, como la epinefrina, no producen agregación por sí mismos, pero favorecen la agregación mediada por otros agonistas (Packham *et al.*, 2008). La agregación plaquetaria puede ser reversible o irreversible, y depende del estímulo que la produzca. La reversible tiene como misión reparar los pequeños daños producidos en el subendotelio y el tejido vascular, mientras que la irreversible está encaminada a formar una placa hemostática cuando la lesión en el tejido es muy grave. Es en esta

agregación irreversible cuando se secreta el contenido de los gránulos α , sobre todo del receptor del fibrinógeno o GPIIb/IIIa (Kaplan *et al.*, 1979) y densos.

5.-Regulación de la agregación plaquetaria.

Las condiciones presentes en el torrente circulatorio (estrés mecánico por el arrastre del flujo, 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.

5.1.-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 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 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 (de Groot *et al.*, 2008).

Para que las plaquetas participen en la hemostasia y la trombosis, se necesita un estímulo inicial, que es la lesión del endotelio vascular, es decir, el daño físico con exposición de la membrana basal rica en colágeno o la disfunción endotelial con desbalance de 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 2 (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, que se liberan durante la activación, influyen sobre otras células. Uno de estas sustancias es 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 (Hannink *et al.*, 1989). Otras de estas sustancias son el TxA₂ y la 5-hidroxitriptamina (5HT), potentes vasoconstrictores (Kruithof *et al.*, 1986); y el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1), con acción antifibrinolítica (Alessi *et al.*, 2007).

5.1.1.-Agonistas plaquetarios.

Los agonistas plaquetarios de mayor importancia fisiológica son los siguientes:

-Adenosina bifosfato (ADP): En los años 60, el ADP se identificó como un factor derivado de los eritrocitos, que causaba adhesión plaquetaria, además de agregación, y mediaba los procesos de trombosis y hemostasia (Born, 1962). Posteriores estudios demostraron que el ADP se almacena en los gránulos densos de las plaquetas a concentraciones cercanas a molar, y se libera cuando las plaquetas se estimulan por otros agonistas como la trombina o el colágeno, de forma que se refuerza y se amplifica la agregación (Gachet *et al.*, 2008). El ADP se considera un agonista débil de la PLC y de la agregación, puesto que en los primeros 30 segundos tras la activación de los receptores, se produce la primera fase de la agregación, reversible, y necesita de la síntesis de TxA₂ para empezar la segunda fase de la agregación, la irreversible (Gachet *et al.*, 1997). A pesar de ser un agonista débil, es un co-activador fundamental para que la respuesta del resto de los agonistas plaquetarios sea la adecuada, incluso la de los más débiles, como la serotonina o la epinefrina (Gachet *et al.*, 2008). Este

ADP provoca diversos eventos moleculares, como la movilización de Ca^{2+} muy rápida y transitoria desde los depósitos y la posterior entrada desde el medio extracelular (Lopez *et al.*, 2006a). El ADP también activa a la PLA_2 , de forma que se libera AA, lo cual conduce a la generación de TxA_2 . Por último, el ADP inhibe a la AC y la producción de AMPc, siendo esto fundamental para la activación plaquetaria, aunque sin un papel relevante en la agregación mediada por ADP, debido a que ésta sólo se produce con una previa activación de la AC por prostaglandinas u otros activadores (Haslam, 1973).

-Trombina: Producida a partir de la protrombina, es el segundo de los agonistas fisiológicos de la activación plaquetaria, y un componente esencial en el sistema de coagulación sanguínea. La respuesta de la plaqueta a este agonista está mediada de forma parcial por el complejo GPIb/IX/V y, mayoritariamente, por los PAR (GPCRs activados por proteasas). Estos PAR se activan por la proteólisis producida por la trombina de un fragmento extracelular del extremo amino del receptor, de tal manera que se genera un nuevo extremo amino, con un ligando SFLLRN (en el PAR1) y AYPGKF (en el PAR4), que activará cada receptor (Vu *et al.*, 1991). En el sitio donde se ha producido el daño vascular, tras la unión de la primera monocapa de plaquetas adherentes, la trombina, junto al ADP y el TxA_2 , adquiere un importante papel reclutando otras plaquetas no activadas. La respuesta de las plaquetas a esta trombina produce una reorganización del citoesqueleto, así como la secreción del contenido de los gránulos, la exposición de la GPIIb/IIIa y, por último, la agregación plaquetaria. Todo esto se produce debido a la activación de vías intracelulares, estando la mayor parte de ellas mediadas por proteínas G de membrana, entre las que destaca la activación de la PLC (que está implicada en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular), de la fosfolipasa A_2 (PLA_2) (que moviliza AA y por tanto TxA_2 mediado por COX-I) y la enzima PI3-K. Por otra parte, la trombina activa también miembros de la superfamilia Ras, como son Rac, Rho o Rap1B (importante en la reorganización del citoesqueleto y el cambio de forma de la plaqueta). Asimismo, la trombina inhibe la actividad de la AC, productora del AMPc responsable de mantener a las plaquetas en estado inhibido, de forma que no se activan *per se* o por estrés mecánico en el torrente sanguíneo (Brass *et al.*, 2008).

-Colágeno: Hay 9 tipos de colágeno descritos (I, III, IV, V, VI, VIII, XII, XIII y XIV) en el sistema vascular humano. Entre ellos, el I, el III y el V son las proteínas más abundantes en los vasos sanguíneos (20-40%), y es el IV el

principal componente de la membrana de la base del tejido subendotelial que soporta los vasos (Barnes, 1985). Estos tipos de colágeno presentan una alta reactividad por las plaquetas y proporcionan el primer estímulo para que se produzca la adhesión plaquetaria y la agregación tras el daño vascular (Siljander *et al.*, 2008). Los principales receptores de colágeno son la glicoproteína GPVI y la integrina GPIIb/IIIa. La glicoproteína GPVI funciona como receptor y es imprescindible para que se produzca la activación inducida por colágeno a través de la PLC (Nieswandt *et al.*, 2001; Sixma *et al.*, 1997) y a su vez activa a otros receptores de la adhesión, como la GPIIb/IIIa, que, aunque no es imprescindible, fortalece la adhesión plaquetaria con el colágeno subendotelial (Nieswandt *et al.*, 2001). La susceptibilidad a la aspirina de la agregación inducida por colágeno sugiere lo importante que es la liberación de TxA_2 en su mecanismo de activación plaquetaria. La aspirina es un inhibidor de la ciclooxigenasa I (COX-I) y la ciclooxigenasa II (COX-II), que son enzimas precursoras de la síntesis de PGs y TxA_2 (Ueno *et al.*, 2011).

-Tromboxano A_2 (TxA_2): Se trata de un metabolito resultante del metabolismo del AA. Este AA liberado es un sustrato para COX-I o las vías de las lipooxigenasas, produciéndose TxA_2 , que actúa como un potente agonista plaquetario, induciendo un cambio en su morfología, la secreción de los gránulos y la agregación. Todos estos fenómenos van acompañados de incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, de la activación de PLC con la consecuente producción de IP_3 y DAG, la activación de la proteína cinasa C (PKC) y la fosforilación de la pleckstrina (P47), la estimulación de la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) que fosforila la cadena ligera de la miosina (MLC), la activación de PLA_2 que producirá más AA, y por último la exposición en la membrana de los sitios de unión a la GPIIb/IIIa (Halushka *et al.*, 1995). Aunque los procesos de cambio de morfología e incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ocurren de forma independiente a la acción de otros agonistas, para que la plaqueta se agregue completamente bajo la acción del TxA_2 , éste necesita de la participación del ADP y la epinefrina (Paul *et al.*, 1999).

-Epinefrina: La epinefrina es un agonista débil encargado de amplificar el efecto de otros estímulos. Esta sustancia moviliza Ca^{2+} y permite la agregación en plaquetas preactivadas con trombina, incluso con concentraciones bajas (0,21 nM), mediante los receptores α_{2A} -adrenérgicos. De esta forma, participa en el mantenimiento de la hemostasia y trombosis en los tejidos vasculares (Grenegard *et al.*, 2008). Por otra parte, la epinefrina reduce la

producción de AMPc, de forma que inhibe la actividad de la AC (Jakobs *et al.*, 1976).

5.2.-Mecanismos inhibidores de la función plaquetaria.

Para inhibir la adhesión plaquetaria en un endotelio sano, las células de este endotelio liberan mediadores químicos. Entre ellos destacan la heparina (que actúa previniendo la estimulación de los receptores de trombina) y las PG y la prostaciclina (que regulan negativamente la función de muchas vías de señalización en la plaqueta). La PGE₂ o PGI₂ estimulan la síntesis de AMPc, 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 (Redondo, 2009). Por otra parte, hay que destacar también el papel del óxido nítrico (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 guanosina monofosfato cíclica (GMPc), de forma que actúa de manera similar al AMPc. De hecho, tanto el GMPc como el AMPc 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 (Redondo, 2009; Watson, 2009).

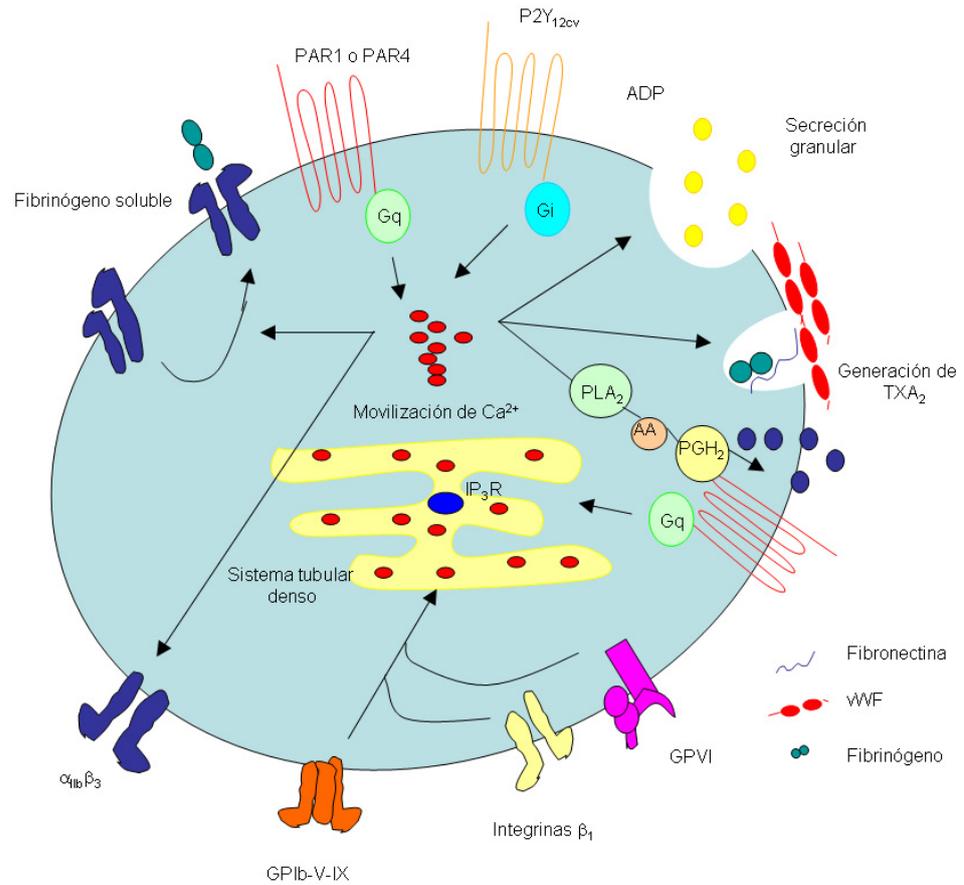


Figura 2. Mecanismos de adhesión y activación plaquetaria (modificada de Jackson, 2011)

6.-Vías de señalización de la activación y agregación plaquetaria.

Una vez que las plaquetas se estimulan por los agonistas, se producirá una serie de eventos intracelulares hasta que las plaquetas respondan. Estos eventos necesitan de la participación de diversas vías de señalización, en las que está involucrada, directa o a través de segundos mensajeros, una compleja maquinaria celular interrelacionada. A continuación se describen las principales moléculas implicadas en las diferentes vías de señalización.

-Fosfolipasa A₂ (PLA₂): Es una enzima de 85 kDa, encargada de la producción de la mayor parte del AA, que deriva de la estimulación plaquetaria por agonistas fisiológicos. El AA es un ácido graso almacenado en posición *sn*-2

en las membranas de fosfolípidos, sobre todo en la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina y el fosfatidilinositol. Cuando se activa la plaqueta, la PLA₂ se encarga de hidrolizar el AA por la región *sn*-2 (aunque también puede hidrolizar otros fosfolípidos con otras cadenas acilos) (Gelb *et al.*, 2008).

En mamíferos, la PLA₂ se transfiere desde el citosol hasta la región perinuclear, donde se sitúan el núcleo, el RE y el aparato de Golgi. No obstante, no hay pruebas de la translocación de PLA₂ hacia los elementos de membrana (STD y SCA) en las plaquetas, aunque puede suponerse esto puesto que tanto COX-I como la tromboxano sintetasa están localizados en el STD (Carey *et al.*, 1982). La activación de la PLA₂ se puede producir tanto por un aumento en la [Ca²⁺]_c como por fosforilación (Gelb *et al.*, 2008).

Con respecto a su regulación por Ca²⁺, la PLA₂ tiene un dominio C2 en su extremo N-terminal, dominio que es el elemento de unión de la fosfolipasa a los ligandos de una forma dependiente de Ca²⁺, respondiendo a incrementos del orden de nM en la [Ca²⁺]_c. De esta forma, la mayor parte de los agonistas que aumentan la [Ca²⁺]_c vía IP₃, vaciando los depósitos intracelulares de Ca²⁺ y provocando la apertura de canales en la membrana que permiten la entrada masiva de Ca²⁺ desde el medio extracelular, activan la PLA₂ aumentando la producción de AA. Hay también otras vías de entrada de Ca²⁺, donde los canales se encuentran regulados por tirosinas cinasas (Pasquet *et al.*, 2000). Varios estudios han concluido que la PLA₂ es fosforilada en los residuos de serina 437, 454, 505 y 727, siendo ser-505 (MAP cinasa) y ser-727 (Mnk1-, PRAK1 cinasa) los más importantes para la actividad catalítica de esta enzima. La actividad de la PLA₂ es tres veces mayor cuando está totalmente fosforilada, pero la fosforilación por sí sola no activa la PLA₂, aunque sí incrementa la respuesta de ésta a los aumentos de la [Ca²⁺]_c (Gelb *et al.*, 2008).

-Fosfolipasa C (PLC): Con una masa molecular de aproximadamente 150 kDa, la familia de las PLC juega un papel fundamental en la activación plaquetaria mediada por receptor. Esta familia tiene numerosas isoformas, de las cuales las subfamilias β y γ son las más importantes en las plaquetas. La PLC es una enzima hidrolítica y dependiente de Ca²⁺, con preferencia por el PIP₂, al cual hidroliza, produciendo IP₃ y DAG, dos mensajeros intracelulares muy importantes (Berridge, 1995). Además de la producción de estos dos mensajeros, la hidrólisis de PIP₂ por la PLC tiene otras consecuencias. PIP₂ es el

sustrato preferido de la enzima PI3-K, que es activada tras ser estimuladas las plaquetas por un agonista y cambia un fósforo del PIP₂ a la tercera posición del anillo, generando el segundo mensajero fosfatidil inositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃). Por lo tanto, la activación de PLC disminuye el sustrato de la PI3-K, afectando a las vías de señalización de esta cinasa (Rittenhouse, 1996). Otra de las consecuencias de la hidrólisis de PIP₂ es la liberación de profilina y gelsolina, proteínas involucradas en la regulación de la polimerización de actina, que se hallan secuestradas en la membrana, unidas al PIP₂, en las plaquetas en reposo. En último lugar, la hidrólisis de PIP₂ mediada por PLC, bien por la activación de las plaquetas o por factores de crecimiento polipeptídicos, como el PDGF, el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento nervioso (NGF), permite el reciclado de los fosfoinositoides (Rhee *et al.*, 1992).

Todas las PLC están formadas por diferentes dominios. En el extremo N tienen un dominio de homología a pleckstrina (PH), seguido de cuatro dominios EF-hand (que unen Ca²⁺). Este dominio PH interactúa con las membranas, por lo que se piensa que puede participar en la translocación de la PLC a las membranas y su interacción con las proteínas de membrana (Torti *et al.*, 2008). El dominio catalítico de la PLC varía según la isoforma, y está constituido por dos regiones, X e Y, separadas por más o menos aminoácidos (50-60 en las isoformas PLC δ y PLC β y 400 en la isoforma PLC γ), con dos dominios de unión a Src (SH-2 y SH-3), todos incluidos en un segundo dominio PH, necesario para la activación de la PLC en plaquetas, puesto que existen pruebas de que otras proteínas con el dominio PH pueden inhibir la hidrólisis de PIP₂ inducida por agonistas (Abrams *et al.*, 1995). La única isoforma de PLC regulada por proteínas G es la PLC β , que es activada por agonistas fisiológicos como la trombina, el ADP y el TxA₂. Las principales isoformas en plaquetas, por su parte, son la PLC β 2 y PLC β 3. La activación de la PLC β 2 por las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G es el principal mecanismo en la hidrólisis de PIP₂ tras la estimulación con trombina, mientras que PLC β 3 media la hidrólisis de PIP₂ tras la estimulación con ADP, y ésta es activada por la subunidad α_q de la proteína G (Torti *et al.*, 2008). La activación de la PLC γ 2 mediada por colágeno en plaquetas requiere la contribución de numerosas moléculas, entre las que se encuentran las tirosina cinasas Fyn, Lyn, Syk y Btk, que mediarían la fosforilación de los residuos de Tyr753 y Tyr759 (Ozdener *et al.*, 2002), la proteína adaptadora LAT y las proteínas SLP-76 y PIP₃ (Torti *et al.*, 2008).

-Inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃): Se trata de un segundo mensajero soluble, que promueve de forma rápida el vaciamiento de los depósitos intracelulares, por la activación de su receptor (IP₃R), que sufre un cambio conformacional que permite la liberación de Ca²⁺. Existe además una ruta alternativa para el IP₃, que podrá ser fosforilado pasando a inositol 1,3,4,5-tetrakisfosfato (IP₄). A pesar de que el IP₄ no es capaz de movilizar Ca²⁺ desde los depósitos intracelulares, sí regula los flujos de Ca²⁺ (Luckhoff *et al.*, 1992).

-D-1,2-diacilglicerol (DAG): El DAG es un segundo mensajero de naturaleza lipídica que está unido a la membrana. Su función es la de mediar la translocación y la activación de la proteína cinasa C (PKC), que fosforila residuos de serina y treonina. El DAG también puede actuar como segundo mensajero para la apertura de canales no capacitivos en la membrana plasmática. Se inactiva de forma rápida mediante fosforilación por la DAG cinasa, que lo convertirá en ácido fosfatídico (PA), precursor de la biosíntesis de los fosfolípidos.

-Proteínas serina/treonina (Ser/Thr) cinasas: Las rutas de transducción de señales usan proteínas cinasas para modificar la función de las proteínas mediante su fosforilación; entre ellas se encuentra la familia de las Ser/Thr cinasas. Recientes investigaciones han revelado los mecanismos usados por esta familia para reconocer su sustrato específico. Las cinasas dependen del anclaje mediante interacciones directas con el sustrato, usando lugares distintos a la secuencia fosfoaceptora, y las interacciones que se producen al anclarse con el sustrato también contribuyen a la especificidad y regulación de la actividad cinasa. Al analizar su estructura, se observa que los lugares usados para el anclaje de los sustratos también pueden unir extensiones N- y C-terminales al centro catalítico de la cinasa y participar en la regulación de su actividad (Biondi *et al.*, 2003). Las proteínas Ser/Thr más importantes son:

-Proteína cinasa A (PKA): Se trata de una proteína heterotetramérica regulada por AMPc, formada por dos subunidades catalíticas y dos subunidades reguladoras que inhiben la acción de las catalíticas. De esta forma, cuando las subunidades reguladoras se unen a AMPc, las catalíticas se liberan, permitiéndoles realizar su función fosforilando residuos de Ser/Thr. Esta cinasa contribuye al estado de reposo de las plaquetas gracias a su papel en la regulación de la homeostasis del Ca²⁺ en las plaquetas humanas y los

megacariocitos. Aumentos en la concentración de AMPc estimulados por PG activarán la PKA, que fosforila por su parte los receptores de IP₃, disminuyendo la liberación de Ca²⁺ desde los depósitos intracelulares mediada por IP₃. La PKA no sólo inhibirá la liberación desde los depósitos, sino que además regulará de forma negativa la actividad de la PLC (reduciendo la formación de IP₃ y DAG) y de PLA₂, e incluso la polimerización de actina (Redondo, 2009). Aparte de su efecto sobre la liberación de Ca²⁺, PKA regula la maquinaria que contribuye a disminuir la [Ca²⁺]_c tanto en el RE como en la membrana plasmática. De esta forma, PKA regula la bomba ATPasa de Ca²⁺ de la membrana plasmática (PMCA) (Strehler *et al.*, 2001) y el intercambiador Na⁺/Ca²⁺ (NCX) (Blaustein *et al.*, 1999) en la membrana, e inhibe a fosfolamban, que reduce la actividad de la ATPasa de Ca²⁺ del RE (SERCA) en el RE (Metcalf *et al.*, 2005). Por último, la PKA tiene un efecto regulador sobre Rap 1b, GP1b- α , VASP, MLCK y sobre proteínas unidas a actina (ABP) (Daniel *et al.*, 2008).

Además de activarse por AMPc, la PKA puede ser activada de manera independiente a éste, a través de su unión a I κ B, que forma parte del complejo NF κ B-I κ B, el cual tiene un importante papel en la diferenciación y maduración de los megacariocitos. En plaquetas, una vez que éstas se han activado por colágeno o trombina, I κ B se va a disociar del complejo NF κ B-I κ B, y se unirá a PKA activándola. A su vez, ésta fosforilará a VASP y otras dianas de la PKA, participando así en un mecanismo inhibitorio que reduce la activación plaquetaria ante un estímulo débil (Gambaryan *et al.*, 2010).

-Proteína cinasa C (PKC): Esta familia de cinasas juega un papel esencial en la transducción de señales una vez que sus agonistas han activado a los receptores. La PKC fosforila un gran número de proteínas en residuos de Ser/Thr esenciales para numerosos procesos fisiológicos en las células, como la diferenciación o proliferación celular. En las plaquetas regulan varias funciones, como la agregación, el vaciamiento del contenido de los gránulos, la movilización de Ca²⁺ intracelular y la regulación de la forma de la célula. Los miembros de la familia de la PKC se activan de forma reversible por el DAG, tras la activación de la PLC mediada por receptores de membrana (Abrams *et al.*, 2008).

La PKC parece estar implicada en un gran número de respuestas inhibitorias en las plaquetas, fosforilando varias proteínas y reduciendo su actividad. Algunas de ellas son: la PLC, la AC, la PLA₂, la PI3-K y la MLCK. La

fosforilación e inhibición de esta batería enzimática produce alteraciones en la liberación de Ca^{2+} , la producción de AMPc y la generación de AA (Abrams *et al.*, 2008; Bushfield *et al.*, 1987; Ryu *et al.*, 1990). Asimismo, es la PKC la que produce la desensibilización de los receptores, vía fosforilación, cuando éstos se activan por sus agonistas. El receptor del TxA_2 (TP), por ejemplo, del que sólo ha sido descrita la isoforma $\text{TP}\alpha$ en las plaquetas, es fosforilado por la PKC tras su activación (Habib *et al.*, 1997).

La PKC es esencial para la agregación plaquetaria, puesto que al inhibirla se previene la agregación en respuesta a la mayor parte de los agonistas. Asimismo, se ha demostrado que la activación de la PKC ocurre en paralelo a la activación de la integrina GPIIb/IIIa para unir fibrinógeno y colaborar en la agregación (Gabbeta *et al.*, 1996). La inhibición de la PKC mediante un inhibidor específico bloquea la activación de GPIIb/IIIa y su capacidad para unir fibrinógeno es otra de las conclusiones obtenidas (Shattil *et al.*, 1992).

La PKC está implicada también en la secreción de los gránulos densos y los gránulos α , de forma independiente a la agregación. Aunque aún no están muy claros los mecanismos sobre los que actúa, al usar inhibidores específicos de la PKC se bloquea la secreción tras el estímulo con agonistas como la trombina (Abrams *et al.*, 2008; Geanacopoulos *et al.*, 1993).

Las plaquetas expresan diferentes isoformas de la familia PKC, incluyendo las isoformas clásicas α y β (dependientes de Ca^{2+} y DAG) y las nuevas isoformas PKD δ , θ y η (dependientes de DAG pero independientes de Ca^{2+}). Asimismo, en plaquetas de ratón, pero no en humanas, se ha encontrado la PKC ϵ .

-Proteína cinasa G (PKG): Se trata de una proteína homodimérica constituida por dos subunidades: una soluble (PKG I) y la otra anclada a la membrana (PKG II). Esta cinasa es el principal efector de las rutas metabólicas de GMPc y NO, pudiendo activarse incluso por AMPc, inhibiendo así la activación plaquetaria (Casteel *et al.*, 2010). Esta PKG actúa en numerosas ocasiones de manera coordinada y sinérgica con PKA, de forma que resulta difícil distinguir su acción de la segunda. La PKG inhibe la PLC, la liberación de Ca^{2+} a través del IP_3R y la VASP (Daniel *et al.*, 2008).

-Cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK): La función de esta MLCK está regulada fundamentalmente por la $[Ca^{2+}]_c$, aunque su activación se produce asimismo por trombina y PAF a concentraciones basales de Ca^{2+} intracelular. Por su parte, la fosforilación de las cadenas ligeras de miosina actúa sobre el aparato contráctil de las plaquetas, organizando así los gránulos de secreción.

-PKB: Directamente relacionada con los 3-fosfoinositoles, la serina/treonina cinasa Akt (PKB) es activada por el PDGF en un proceso que requiere PI3-K unida a sitios específicos del receptor del PDGF (Franke *et al.*, 1995). El IP_3 interacciona con un dominio PH de Akt, estimulando su actividad cinasa.

-Proteínas tirosina cinasas (PTKs): Catalizan la transferencia de un fosfato desde una molécula de ATP a un residuo de tirosina en la molécula seleccionada, constituyendo uno de los procesos más básicos e importantes en el control, la integración y la amplificación de las señales intracelulares de las respuestas fisiológicas. Las PTKs pueden ser divididas en dos grandes familias: las tirosina cinasa receptor (RTKs), que se encuentran en la membrana plasmática; y las tirosina cinasa no receptor (NRTKs), libres en el citoplasma. Las plaquetas humanas contienen un gran número de PTKs, con proporciones muy bajas de RTK en sus membranas, entre las que cabe destacar el receptor de PDGF, siendo la mayor parte de la familia NRTKs, dentro de la que se encuentran las Src, las Syk y las cinasas de adhesión focal (FAK). Importantes miembros de la familia Src son la pp60-src, la pp60fyn, pp54, 58lyn, pp61hck y pp62c-yes (Courtneidge *et al.*, 1993).

La fosforilación en residuos de tirosina está implicada en diversas respuestas funcionales de las plaquetas, como la regulación de la actividad PLC, la agregación y la secreción. Por ejemplo, la translocación y activación de FAK, que se une a las integrinas, puede representar uno de los primeros eventos inducidos por la ocupación de integrinas en la superficie de la célula, debido a las interacciones entre FAK y varias proteínas del citoesqueleto, lo cual produce una agregación irreversible (Levy, 2008).

-Proteínas tirosina fosfatasas (PTP): Las plaquetas poseen una elevada concentración de proteínas con actividad tirosina fosfatasa (Jackson *et al.*, 1996). Debido a que la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina es el

resultado del balance de dos acciones opuestas, tirosina cinasa y tirosina fosfatasa, cuando la actividad fosfatasa es inhibida mediante inhibidores se pone de manifiesto la agregación plaquetaria con una única fosforilación transitoria de proteínas en residuos de tirosina (Inazu *et al.*, 1990). La multiplicidad de señales producidas al aumentar la fosforilación en tirosina en plaquetas humanas, así como la activación de PLC, resulta en la interacción de complejos de señalización con sus dominios SH-1 y SH-2 (Ullrich *et al.*, 1990). Estos dominios son sitios específicos de reconocimiento que están asociados con residuos de fosfotirosina y que permiten señalar enzimas como PLC- γ , PI3-K y NRTKs como los productos génicos para asociarse con proteínas con tirosinas fosforiladas (Vogel *et al.*, 1993). Asimismo, las proteínas tirosina fosfatasas poseen un importante papel en la ECC en plaquetas humanas. Una vez estimuladas estas plaquetas con trombina o habiendo vaciado sus depósitos intracelulares de Ca^{2+} usando TG+Iono, la proteína α -actinina asociada al canal TRPC1, esencial para la ECC en plaquetas, sufre una desfosforilación seguida de una rápida fosforilación necesaria para la activación de la ECC (Redondo *et al.*, 2007a).

-Proteínas Ser/Thr fosfatasas (PP): La PP1 es la fosfatasa más estudiada, y participa en procesos celulares como la adhesión plaquetaria, mediante su interacción con la integrina GPIIb/IIIa. Cuando esta fosfatasa está inactiva, la subunidad catalítica de PP1 se halla unida directamente a la subunidad IIb de la integrina. Una vez producida la activación plaquetaria, la subunidad catalítica de PP1 se disocia de la subunidad anclada a la membrana y desfosforila la MLC, lo que es requerido para despolimerizar y reorganizar el citoesqueleto (Bouaziz *et al.*, 2007; Vijayan *et al.*, 2004). Además, la cofilina es regulada por una Ser/Thr fosfatasa en el residuo Ser3, que se une al citoesqueleto de actina al desfosforilarse, reduciendo así la longitud de los filamentos de actina al retirar monómeros de G-actina, siendo esta despolimerización necesaria para que se produzca la ECC (Redondo *et al.*, 2006).

Podemos concluir que la señalización intracelular plaquetaria es un proceso complejo finamente regulado, en el que cada agonista plaquetario usa una o varias vías de transducción celular, y en el que muchas de estas vías son compartidas por los agonistas. Por ejemplo, el colágeno, la trombina y el TxA_2 activan la PLC, vía proteínas G, y la producción de IP_3 que provocará el cambio conformacional de IP_3R permitiendo la liberación de Ca^{2+} de los depósitos

intracelulares hacia el citoplasma. Este incremento en la $[Ca^{2+}]_c$ activará por su parte otras rutas, como la activación de la miosina cinasa (que produce cambios en el citoesqueleto). Asimismo, la activación de la PLC produce DAG, que activará la PKC, que fosforilará diversas proteínas activando nuevas vías, de forma que se acabará produciendo la agregación plaquetaria. Muchas de estas vías son reguladas por la $[Ca^{2+}]_c$.

7.-Células de cultivo HEK293.

Para los experimentos de esta Tesis, además de las plaquetas, se utilizó también la línea celular HEK293 (*Human Embryonic Kidney 293 cells*), debido a la facilidad de su cultivo y su transferencia (es por ello que se han convertido en una de las líneas celulares más usadas en investigación en biología celular, además de en biotecnología para producir proteínas terapéuticas y virus para terapia génica). Estas células son derivadas de células embrionarias de riñón humano, obtenidas a partir de cultivo celular.

Las células HEK293 se generaron en los años 70 al transformarse cultivos de células embrionarias de riñón normales. La transformación se realizó mediante exposición a fragmentos cortados de ADN del adenovirus de tipo 5 (Ad5) en el laboratorio de Alex van der Eb en Leiden, Holanda (Thomas *et al.*, 2005). Las células embrionarias de riñón humanas se obtuvieron de un feto sano abortado en 1972 y fueron cultivadas al principio por el propio Van der Eb. La transformación por el adenovirus fue llevada a cabo por Frank Graham, el cual publicó sus resultados en los años 70 (Graham *et al.*, 1977). El número 293 proviene de la costumbre de Graham de numerar sus experimentos.

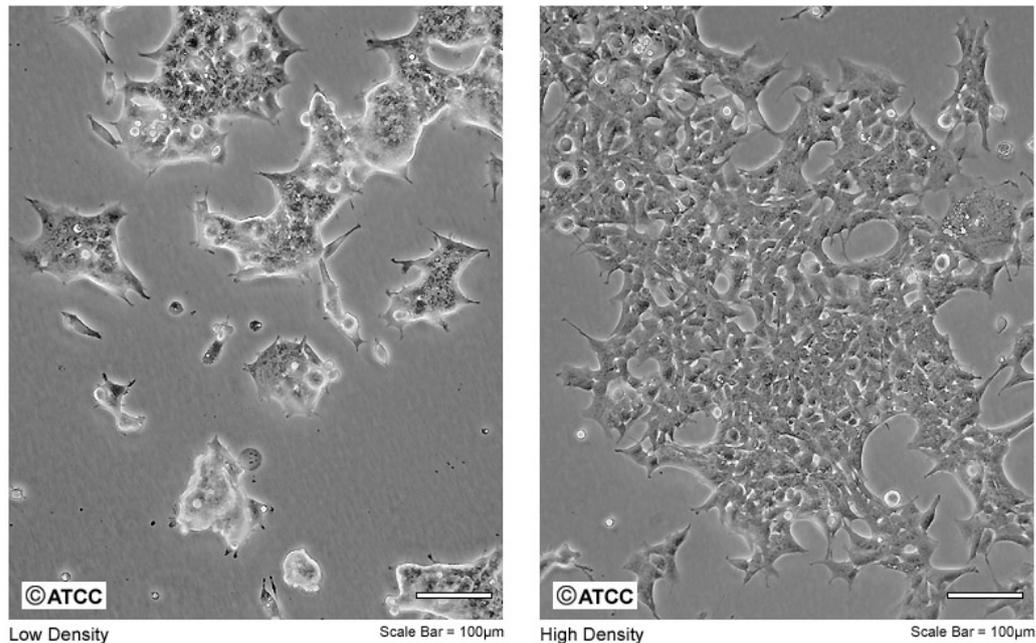


Figura 3. Células HEK293 en cultivo (extraída de www.atcc.org)

La transformación se realizó mediante la inserción de 4,5 kilobases del genoma vírico en el cromosoma 19 humano. Hasta hace poco, las HEK eran las únicas células transformadas por el Ad-5, aunque también existen ya las HER (*Human embryonic retinal cells*), transformadas por la inserción de Ad-5 y Ad-12.

Algunas de las características de este tipo celular son:

-Receptores endógenos:

La principal razón para elegir una línea celular de cultivo en lugar de células nativas para el estudio, por ejemplo, de canales iónicos heterooligoméricos recombinantes con unas subunidades definidas es que sus propiedades pueden ser estudiadas aisladas de otros receptores de las mismas o de diferentes familias. Sin embargo, y dependiendo de la fuente de la línea celular parental, podría haber interferencia con las proteínas endógenas expresadas constitutivamente en la célula hospedadora. En el caso de las células HEK293, una complicación potencial en el estudio de corrientes iónicas puede deberse a la presencia de canales de potasio operados por voltaje. A pesar de que la

mayoría de los estudios de expresión recombinante que usan electrofisiología se realizan con algún tipo de protocolo de *voltage clamp*, la presencia de estos canales es significativa (sobre todo cuando la expresión de la proteína endógena es baja), puesto que generan corrientes del rango de varios cientos de picoamperios tras la despolarización, y muestran conductancias y densidades de corriente comparables a las de los canales operados por voltaje nativos en neuronas del hipocampo y la corteza (Yu *et al.*, 1998). La cantidad de proteínas presentes constitutivamente en las células HEK no se limita a los canales operados por voltaje, como canales de calcio (Berjukow *et al.*, 1996), sino que también se han encontrado proteínas intracelulares reguladoras de origen neuronal. Un extenso estudio realizado por Shaw *et al.* (Shaw *et al.*, 2002) utilizando detección por *microarray* sugiere que existen ARNm para 28 receptores asociados a proteínas G, lo cual implica que las vías de señalización de proteínas G que involucran al diacilglicerol (DAG), IP₃ y calcio funcionan en las células HEK.

-Transfección celular:

Uno de los motivos por los que se usó la línea celular HEK293 en esta Tesis es su facilidad de transfección con plásmidos para silenciar o sobreexpresar ciertos genes. Esta transfección, en esta línea celular, puede llevarse a cabo utilizando diferentes técnicas:

-Electroporación: Las células son sometidas a un intenso campo eléctrico (1 kV/cm), provocando poros transitorios en la membrana a través de los cuales entrará el ácido nucleico a transfectar. Normalmente se usa ADNc, puesto que es más estable que el ARNc, y la eficiencia de la transfección suele ser del 30%, aunque puede llegar a ser del 80%, con técnicas como la nucleofección.

-Precipitación con fosfato cálcico: Éste es un método barato y accesible, para el cual no se necesita equipamiento especial. Sin embargo, la eficiencia de la transfección varía mucho, debido a los cambios de pH del medio.

-Otras técnicas: La lipofectamina 2000 es uno de los agentes más recientemente usados para transfectar ADN a la célula por fusión e incorporación de microsomas lipídicos en la bicapa lipídica de la célula.

-Farmacología:

Como se ha dicho antes, la fidelidad con la que las células HEK pueden expresar receptores exógenos hace que estas células puedan transfectarse por diferentes métodos, permitiendo así la expresión de diferentes proteínas de estudio. Por ejemplo, las células HEK se han utilizado para expresar una amplia variedad de proteínas importantes para la neurofarmacología: canales iónicos sensibles al voltaje (sodio, potasio, calcio), receptores unidos a proteínas G, canales iónicos operados por ligandos... Además, estas células expresan suficientes proteínas como para poder realizar experimentos bioquímicos como Western Blotting o inmunocitoquímica.

Sin embargo, existen también algunos problemas al usar este tipo celular, puesto que existen receptores endógenos y canales constitutivamente expresados en la célula, como se comentó anteriormente, lo cual hace que estas células se utilicen para estudiar determinados tipos de proteínas. Otra de las desventajas del uso de las células HEK293 es que las células se dividen bastante rápido (aproximadamente en un día), lo cual hace que se formen racimos celulares que dificultan su uso para, por ejemplo, electrofisiología o técnicas de *Imaging*.

8.-Homeostasis del Ca²⁺.

El Ca²⁺ es uno de los mensajeros intracelulares más extendidos en el reino animal, puesto que participa en procesos tan importantes como la contracción muscular, la secreción, la proliferación y el crecimiento celular, la expresión de genes, la agregación plaquetaria e incluso la muerte celular programada o apoptosis. Es por ello que los agonistas modulan la [Ca²⁺]_c para regular estas funciones. Cuando es necesario aumentar la [Ca²⁺]_c, las células lo liberan desde los depósitos intracelulares y permiten la entrada de Ca²⁺ desde el medio extracelular, a través de la membrana plasmática. Por otra parte, cuando las células quieren reducir la [Ca²⁺]_c, ponen en marcha mecanismos para reintroducir el Ca²⁺ en los depósitos intracelulares o para bombearlo al medio extracelular a través de la membrana plasmática, mediante transportadores que necesitan ATP para realizar su función (Berridge, 1997).

Una célula, en estado de reposo, mantiene la $[Ca^{2+}]_c$ muy baja (aproximadamente 20 nM), mientras que la concentración de Ca^{2+} tanto en los depósitos (1 mM) como en el medio extracelular (1,2 mM) es mucho más elevada. Esto produce un fuerte gradiente electroquímico que las células tienen que regular, 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. Por otra parte, las células poseen asimismo mecanismos que permiten la liberación del Ca^{2+} almacenado en los almacenes intracelulares o el paso de Ca^{2+} extracelular a través de las membranas, sólo por canales más o menos específicos para Ca^{2+} y otros cationes, que están cerrados cuando las células se encuentran en reposo, evitando de esta forma el incremento de Ca^{2+} en el citoplasma que produciría apoptosis y muerte celular.

8.1.-Mecanismos que aumentan la $[Ca^{2+}]_c$:

Estos mecanismos pueden ser divididos a su vez en dos subgrupos: los que liberan el Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares y los que permiten la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular.

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

En la membrana plasmática, cuando se produce la unión de un agonista a su receptor, se va a activar la PLC, que generará dos segundos mensajeros intracelulares: el IP_3 y el DAG. El IP_3 va a liberar Ca^{2+} desde el RE a través de la unión a su receptor, que cambia su conformación permitiendo la salida masiva de Ca^{2+} al citoplasma (Streb *et al.*, 1983) . Por su parte, el DAG activa la PKC (Berridge, 1997).

-Receptores de IP_3 (IP_3R): Fueron descritos por primera vez por Furuichi (Furuichi *et al.*, 1989). Se encuentran situados en el RE (además de en la membrana nuclear, en el aparato de Golgi y en las vesículas secretoras) y, cuando son activados por el IP_3 , sufren un cambio conformacional, de forma que permiten la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares (Berridge *et al.*, 2003). Presentan tres dominios: un dominio N-terminal, de unión al IP_3 ; un dominio regulador con un lugar de unión para ATP y residuos susceptibles de fosforilación; y un dominio C-terminal con seis regiones transmembrana, responsables de la agregación de las cuatro subunidades necesarias para

formar el canal activo (Chadwick *et al.*, 1990; Taylor *et al.*, 1991). Una elevada concentración de Ca^{2+} en el lumen del RE hace que el IP_3R sea muy sensible a IP_3 , disminuyendo esta sensibilidad tras el vaciamiento de los depósitos (Missiaen *et al.*, 1991). Por otra parte, estos canales están regulados por la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ de forma que, ante incrementos en esta $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (300-600 nM), el IP_3R se abre y permite que se libere Ca^{2+} (Bezprozvanny *et al.*, 1991). Por último, el ATP tiene un efecto dual sobre el IP_3R , actuando como co-activante hasta una concentración de ATP de 4 nM, e inhibiendo la apertura de los mismos a concentraciones de ATP superiores, lo cual se debe posiblemente a competición al sitio de unión del IP_3 (Bezprozvanny *et al.*, 1993).

-Receptores de rianodina (RyR): Se localizan en el RE y, tanto en estructura como en función, son similares al IP_3R . Los RyR se activan por la rianodina (a concentraciones inferiores a 10 μM), la cafeína, la ADP ribosa cíclica y por el Ca^{2+} (a concentraciones menores de 1 mM), produciendo un proceso de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR). La calmodulina actúa como modulador de este canal, anulando incluso el efecto conjunto de la rianodina, ADP y la cafeína (Endo, 2009).

-Receptores del nicotinato de adenina dinucleótido fosfato (NAADP): El NAADP, derivado desaminado del nicotadenín dinucleótido fosfato (NADP) y sintetizado por la propia célula en la mitocondria, es un mensajero capaz de liberar Ca^{2+} de depósitos ácidos (endosomas, lisosomas y vesículas secretoras), liberándolo de forma independiente al IP_3 y al ADP (Lopez *et al.*, 2005), a través de sus receptores, identificados recientemente como los canales de dos dominios de poro (TPC) (Zhu *et al.*, 2010).

-Canal liberador de Ca^{2+} sensible a esfingolípidos (SCaMPER): Este canal libera Ca^{2+} intracitoplasmático, respondiendo a lípidos derivados de la esfingosina, cuya concentración se incrementa ante factores de crecimiento (como el PDGF). No se conocen aún las funciones fisiológicas que producen su apertura (Young *et al.*, 2000).

Además de por estos canales situados en los depósitos intracelulares de Ca^{2+} , la concentración de este ion está regulada por una serie de proteínas existentes en los depósitos que son capaces de unir el Ca^{2+} en su estructura. Algunas de estas proteínas son la calsecuestrina o la calreticulina.

8.1.2.-Entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular:

Al activarse ciertas funciones celulares como las destacadas anteriormente mediante la generación de la señal de Ca^{2+} , las células requieren que se llegue a una $[Ca^{2+}]_c$ sostenida y prolongada, y en muchos casos no es suficiente con el Ca^{2+} acumulado en los depósitos para completar este requerimiento. Es por ello que la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular a través de canales de membrana es esencial. Según el tipo celular, existen distintos mecanismos para la entrada de Ca^{2+} .

-Entrada de Ca^{2+} activada por voltaje (VOCs): Se produce sobre todo en células eléctricamente excitables: neuronas, células musculares y muchas células endocrinas. En estos tipos celulares, la apertura de estos canales se produce tras una despolarización de la membrana que permite la entrada breve de Ca^{2+} desde el medio extracelular. Estos canales están regulados por receptores y mensajeros intracelulares (McDonald *et al.*, 1994). Recientemente, se ha descubierto que el canal activado por voltaje $Ca_v1.2$, es además regulado por la región SOAR de STIM1, que activa la apertura de Orai1, uno de los canales de Ca^{2+} más importantes activados por el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} (Wang *et al.*, 2010).

En células no excitables, la entrada de Ca^{2+} se produce a través de canales iónicos activados por segundos mensajeros (SMOC), por receptor (ROC) o por el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} (SOC).

-Entrada de Ca^{2+} activada por segundos mensajeros (SMOC): Fisiológicamente, algunos segundos mensajeros inducen la apertura de canales sensibles a moléculas producidas tras la activación de un receptor en la membrana, que permiten el flujo de cationes monovalentes o divalentes. Algunas de estas moléculas son el IP_4 en células endoteliales, la PKC en plaquetas o el DAG en diversos tipos celulares (Irvine *et al.*, 1999; Jardin *et al.*, 2008c; Rosado *et al.*, 2000e).

-Entrada de Ca^{2+} activada por receptor (ROC): Estos canales operados por receptor son muy ubicuos, y se sitúan principalmente en células secretoras y en las terminaciones nerviosas. Este tipo de entrada se produce por la unión de un agonista, generalmente neurotransmisores como el glutamato, ATP o ADP, al

dominio extracelular del receptor ionotrópico. Algunos ejemplos de ROC son los receptores del ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), que en respuesta al glutamato se abren (Benarroch, 2011), o los receptores purinérgicos de las plaquetas P2X₁, que se abren tras ser activados por ATP (Gachet *et al.*, 2008).

-Entrada de Ca²⁺ activada por el vaciamiento de los depósitos intracelulares (SOC): Esta entrada se produce tras el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca²⁺ y es uno de los principales mecanismos de entrada de Ca²⁺ en células no excitables, estando regulado por el estado de relleno de los almacenes intracelulares de Ca²⁺. La entrada capacitativa de calcio (ECC) fue descrita por primera vez en 1986 por Putney, el cual observó que, una vez vaciados los reservorios intracelulares de Ca²⁺, se abren los canales de Ca²⁺ en la membrana, los cuales están cerrados en la célula en reposo. Estos canales permitirán una entrada masiva de Ca²⁺ al citoplasma, así como el relleno de los depósitos de Ca²⁺ y el cierre de los canales bloqueando la entrada de calcio (Putney, 1986). Originalmente se propusieron cuatro modelos para explicar la ECC:

1.-Modelo difusible: Sugiere que, al producirse el vaciamiento de los depósitos, una molécula mensajera de naturaleza desconocida hace que se abran los canales de membrana y que se produzca la ECC. Las posibles moléculas difusibles que se propusieron para este modelo fueron: cambios en la concentración citosólica de GMPc, algunas tirosina cinasas o pequeñas proteínas unidas a GTP, algún producto derivado del metabolismo de la mitocondria, algunas vías de Ca²⁺ dependientes de la calmodulina o el llamado factor del influjo de Ca²⁺ (CIF) (Parekh *et al.*, 1997). Sin embargo, y tras la imposibilidad de identificar esta molécula, este modelo fue abandonándose.

2.-Modelo del acoplamiento conformacional constitutivo: Este modelo establece que hay una interacción entre los IP₃R en el RE y los canales de membrana plasmática una vez que se produce el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca²⁺. Para que se produzca esta interacción, el RE debe situarse cerca de la membrana plasmática (Berridge, 1995).

3.-Modelo del acoplamiento conformacional “de novo”: Tomando como base el modelo propuesto por Berridge, Rosado *et al.* propusieron una modificación a éste, en la cual estaba involucrado el tráfico de membranas en las

células. Así, una vez vaciados los depósitos intracelulares, el RE, que no está situado cerca de la membrana plasmática, se acerca a ésta con ayuda del citoesqueleto de actina, de forma que se produce la interacción entre los IP₃R y los canales de Ca²⁺ en la membrana plasmática (Rosado *et al.*, 2000a).

4.-Modelo de secreción: Este modelo sugiere que, una vez producido el vaciamiento de los depósitos de Ca²⁺, se produce la translocación e inserción de canales ya formados desde el RE hasta la membrana plasmática (Fasolato *et al.*, 1993). Esto se apoya en diferentes trabajos que demuestran que la ECC necesita la colaboración de proteínas involucradas en el tráfico y fusión de vesículas con la membrana plasmática (Yao *et al.*, 1999).

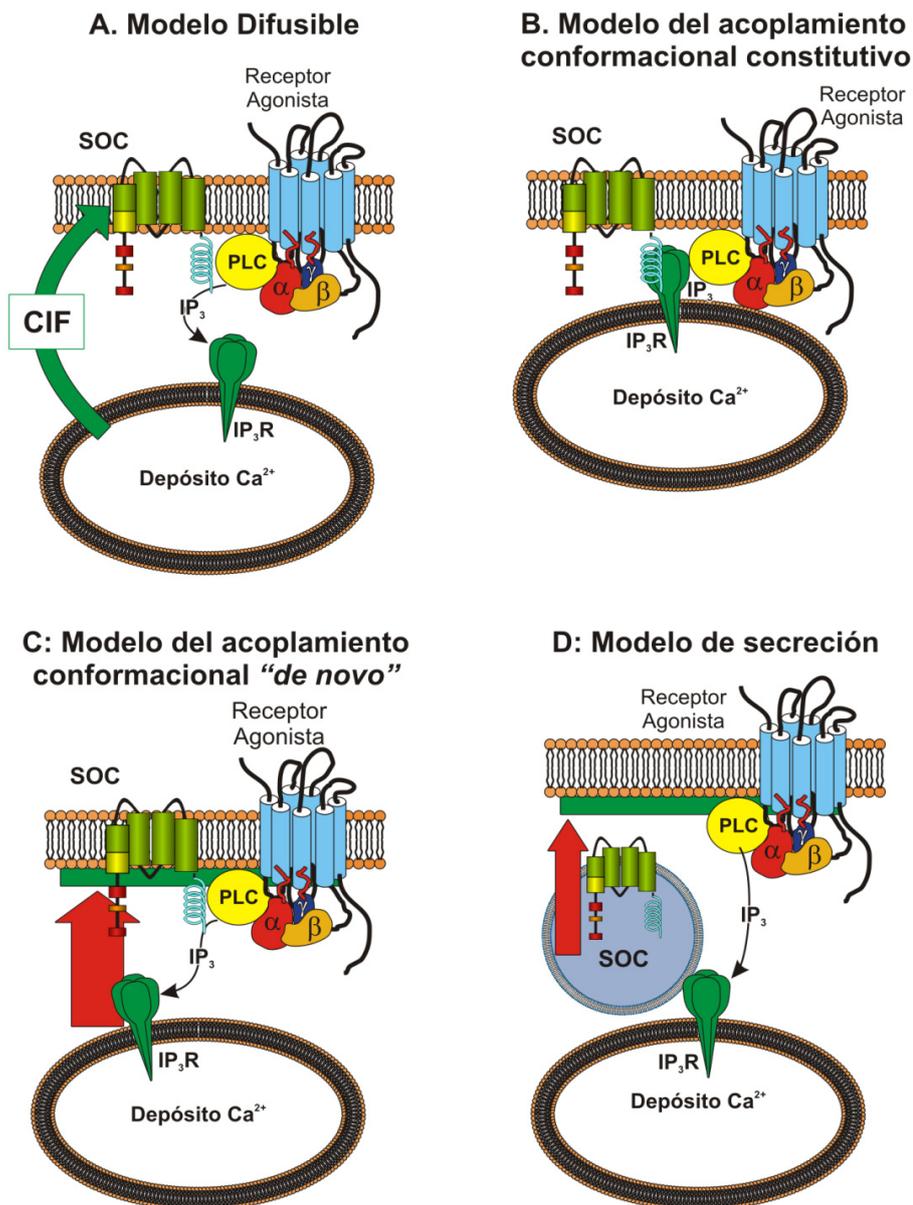


Figura 4. Modelos propuestos para la ECC (extraída de Jardín, 2011)

Las proteínas involucradas en la ECC y el paso de información desde el RE hasta los canales de la membrana plasmática se han ido investigando en los últimos años. Las principales son:

-STIM1 (685 aa): Se identificó como el sensor de Ca²⁺ del RE en 2005 (Roos *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005). Se expresa en la mayoría de las células animales y posee un dominio EF-hand en el lumen del RE, que comprende los

aminoácidos (aa) 76-87, encargado de unir 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 que se produce el vaciamiento de estos depósitos y la concentración de Ca^{2+} disminuye en el RE, queda libre el dominio EF-hand. Cuando esto ocurre, STIM1 sufre un cambio conformacional que le permitirá unirse y activar a los canales en la membrana plasmática (Liou *et al.*, 2005). La mutación del dominio EF-hand (D76A) y su incapacidad para unir Ca^{2+} favorecen una ECC constitutiva que puede ser letal para la célula (Deng *et al.*, 2009). Aparte del dominio EF-hand, STIM1 posee también un dominio alfa estéril (SAM) en el extremo amino (N) localizado en el lumen del RE, por el que STIM1 forma homodímeros u homotetrámeros (Stathopoulos *et al.*, 2006). Esta proteína de unos 75 kDa posee una región transmembrana altamente conservada. En el extremo carboxilo (C), localizado en el citoplasma, STIM1 tiene varios dominios importantes. Hay que destacar los dominios *coiled-coil*, que median la interacción de STIM1 con otros STIMs y canales de la membrana plasmática; además, STIM1 posee una pequeña región, descrita por tres grupos de investigación independientes, con la capacidad de activar la ECC sin tener que vaciar los depósitos. Esta región se denomina SOAR (*STIM1 Orai1-activating region*), que comprende los aa 344-442 (Yuan *et al.*, 2009); OASF (*Orai1-activating small fragment*) entre los aa 233-474 (Muik *et al.*, 2009); y CAD (*CRAC-activating domain*) entre los aa 342-448 (Park *et al.*, 2009). Además, STIM1 posee el dominio CMD (*CRAC-modulatory domain*), que interacciona con un sitio de unión para calmodulina en el extremo N de Orai1 (Mullins *et al.*, 2009) e interacciona asimismo con residuos de glutamato conservados en el extremo C de los tres Orais que regula la inactivación rápida de Orai1 por Ca^{2+} (Lee *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2009). La corriente I_{CRAC} (*Ca²⁺ release activated current*) fue la primera corriente de entrada de Ca^{2+} generada por el vaciamiento de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} que se caracterizó, y la más estudiada por técnicas de electrofisiología (Yuan *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2005). La secuencia rica en Ser/Thr de STIM1 ha sido identificada como un sitio de multimerización e interacción con Orai1 (Srikanth *et al.*, 2010). STIM1 tiene otro dominio importante en su extremo C, el dominio polibásico rico en lisina (K), que facilita la unión de STIM1 a la membrana plasmática (Liou *et al.*, 2007) y activa la apertura de los canales TRPC (Huang *et al.*, 2006). Por último, STIM1 tiene muchos sitios de fosforilación que pueden ser usados por diversas proteínas cinasas para regular las variaciones de Ca^{2+} en distintos estadios celulares como

la mitosis, en la que la fosforilación de STIM1 inhibe la ECC (Smyth *et al.*, 2009). STIM1 también puede ser fosforilada por la cinasa regulada extracelularmente ERK1/2, que puede controlar la interacción entre STIM1 y Orai1 (Pozo-Guisado *et al.*, 2010).

-TRPs: En los años 90 se propuso que los homólogos en mamíferos de los receptores de potencial transitorio (TRP, *transient receptor potencial*) de *Drosophila* eran los posibles mediadores de la ECC (Birnbaumer *et al.*, 1996; Rosado *et al.*, 2001). El nombre de estos canales se debe a que una mutación en ellos producía potenciales transitorios, por la entrada de Na⁺ y Ca²⁺, en lugar de los potenciales sostenidos que se producían en canales no mutados (Hardie *et al.*, 1992). En mamíferos han sido identificadas distintas subfamilias de TRP: TRPC, TRPA, TRPV, TRPM, TRPML, TRPP; y cada subfamilia está constituida por distintas isoformas. Por ejemplo, es el caso de los 7 canales TRPCs (TRPC1-TRPC7), activados una vez producida la hidrólisis de PIP₂ tras la estimulación con diversos agonistas en diferentes tipos celulares y tejidos (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⁺, como la entrada no capacitativa de Ca²⁺ (ENCC). La corriente generada por los canales TRP es un tipo de corriente capacitativa no selectiva para Ca²⁺ llamada *I_{SOC}* (*store-operated Ca²⁺ current*) (Parekh *et al.*, 2005). Los principales canales TRPs son:

-TRPC1 (793 aa): Es el TRP más estudiado. Algunos grupos de investigación sostienen que participa en la ECC como uno de los principales componentes de esta entrada en una gran variedad de células, como las glándulas salivales, queratinocitos, musculares, HEK293 y plaquetas humanas entre otras (Ambudkar *et al.*, 2007; Brough *et al.*, 2001; Rosado *et al.*, 2000c; Rosado *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 1996; Zitt *et al.*, 1996). Sin embargo, otros grupos están en contra de esta hipótesis (Dietrich *et al.*, 2006; Lintschinger *et al.*, 2000; Sinkins *et al.*, 1998; Varga-Szabo *et al.*, 2008). El TRPC1 fue el primer homólogo mamífero del TRP que se identificó en humanos, siendo dos grupos los que lo hicieron (Wes *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 1995). La estructura del TRPC1 es muy parecida a la del resto de la familia de los TRPC. En su extremo N citosólico posee 4 dominios repetidos de ankirina, necesarios para formar la unidad heteromérica con otros TRPCs, y un dominio *coiled-coil*, necesario para la unión entre TRPC1. Asimismo, tiene un sitio de unión para caveolina 1 (Cav1),

que es una proteína adaptadora y reguladora que actúa como nexo entre las interacciones de las proteínas en la membrana plasmática y los lípidos (Cohen *et al.*, 2004). El TRPC1, como el resto de miembros de la familia TRP, atraviesa la membrana 6 veces (6 dominios transmembrana), con el poro para permitir el paso de cationes entre el 5º y el 6º dominio. En su extremo C, citosólico también, el TRPC1 tiene la secuencia característica de los TRP (EWKFAR), además de un dominio rico en prolina altamente conservado, donde se insertan un sitio de unión a la proteína FKBP52, una inmunofilina que modula el plegado y el tráfico de proteínas; y otro sitio de unión para Homer1, una proteína de soporte que facilitará la interacción entre diversas proteínas. Por último, posee también un dominio de unión a CaM e IP₃R llamado CIRB, el cual modulará la activación del TRPC1 en función de la [Ca²⁺]_c (Tang *et al.*, 2001) y dos dominios *coiled-coil*, donde se encuentra insertado un segundo dominio de unión a CaM, involucrado en la inactivación del TRPC1 dependiente de Ca²⁺ (Singh *et al.*, 2002). El TRPC1 presenta selectividad pNa⁺/pCa²⁺ 1:1. Este TRPC1 forma también diferentes canales con distinta selectividad para el Ca²⁺, desde algo selectivo hasta nada selectivo (para ello se mide la permeabilidad del Ca²⁺ frente a la del Na⁺). Esta variación en la selectividad del canal se debe a que los monómeros de TRPC1 forman heterotetrámeros, por lo general dos TRPC1 y dos TRPCs, variando la selectividad en función del heterotetrámero formado (Brough *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2005). Hasta ahora, se ha comprobado que el TRPC1 constituye canales con TRPC4/TRPC5 (Plant *et al.*, 2005) o con TRPC3/TRPC7 (Zagranichnaya *et al.*, 2005). Sin embargo, no existen pruebas concluyentes de que forme un canal homotetramérico.

-TRPC3 (848 aa): Está situado en la membrana plasmática y participa fundamentalmente en la ENCC. Estructuralmente es muy parecido a los demás TRPCs, pero tiene algunas particularidades. Ambos extremos, el N y el C, se sitúan en el citoplasma, y posee los 6 dominios transmembrana, situándose el poro entre el 5º y el 6º. En su extremo N, tiene los 4 dominios repetidos de ankirina, el dominio *coiled-coil* y el sitio de unión a caveolina, pero además tiene un sitio de unión a la PLCγ en el primer dominio de ankirina y una unión para VAMP2 entre los dominios de ankirina 3 y 4. En su extremo C tiene el dominio EWKFAR, rico en prolinas, donde se inserta un sitio de unión para FKBP12 pero no para Homer1, y el dominio CIRB, acabando en un dominio *coiled-coil* (Eder *et al.*, 2007). El TRPC3 presenta selectividad pNa⁺/pCa²⁺ 1:1,5. Al igual que otros TRPCs, el TRPC3 forma heterotetrámeros, e interviene 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. Se ha demostrado que en algunos tipos celulares el TRPC3 puede activarse por el vaciamiento de los depósitos (Birnbaumer *et al.*, 1996; Montell, 2001; Trebak *et al.*, 2003).

-TRPC6 (931 aa): Presenta la típica estructura de los TRPCs, con los extremos N y C en el citoplasma, la estructura EWKFAR y los 6 dominios intermembrana, con el poro entre el 5º y el 6º. En el extremo N presenta los cuatro dominios de ankirina y el dominio *coiled-coil*. Sin embargo, y al contrario que los TRPC1 y 3, no posee sitios de unión para la Cav1. En el extremo C tiene el dominio rico en prolinas con un sitio de unión para FKBP12, el CIRB y un dominio *coiled-coil* final (Eder *et al.*, 2007). El TRPC6 presenta una selectividad pNa⁺/pCa²⁺ 1:5. El canal TRPC6 es regulado por muchas señales, incluyendo el segundo mensajero DAG, la fosforilación en residuos de serina o tirosina, el PIP₂ e incluso el vaciamiento de los almacenes de Ca²⁺ intracelulares (Hofmann *et al.*, 1999; Jardin *et al.*, 2008c).

-Orai1: También se conoce como CRACM1 (301 aa). Este canal se caracterizó al estudiar una mutación en Orai1 (R91W), codificada por el gen FLK14466 del cromosoma 12 humano, que se manifiesta de forma natural y suprime tanto la entrada de Ca²⁺ como las corrientes I_{CRAC} en células T. Esta mutación es la que produce la enfermedad de la inmunodeficiencia severa combinada (Feske *et al.*, 2006). Se ha propuesto que la proteína Orai1 forma parte del poro del canal que media la corriente I_{CRAC} , una corriente no activada por cambios en el voltaje y altamente selectiva para Ca²⁺ (Parekh *et al.*, 2005). Esta proteína forma complejos de canales de iones multiméricos en la membrana plasmática, y se encuentra regulada por el vaciamiento de los depósitos de Ca²⁺ intracelulares y mediada por la participación de STIM1 (Vig *et al.*, 2006). Orai1 es una pequeña proteína de membrana, de un tamaño aproximado de 38 kDa, que posee ambos extremos, N y C, en el citoplasma. Tiene 4 dominios transmembrana y el poro se halla situado entre el 2º y el 3º. En su extremo N 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, la cual produce la inactivación del canal al unirse (Mullins *et al.*, 2009). En su extremo C tiene un dominio *coiled-coil* por el cual se une al extremo C de STIM1 (Muik *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009; Yuan *et al.*,

2009). Orai1 posee dominios estructurales que pueden formar un canal de Ca^{2+} muy selectivo ($\text{pNa}^+/\text{pCa}^{2+}$ aproximadamente de 1000) y pequeñas mutaciones pueden alterar su selectividad por los cationes. Se ha sugerido que la región (106-114 aa), con una composición muy ácida, con un glutamato (106), fundamental para definir la selectividad a Ca^{2+} del canal, una glutamina (108) y tres residuos de aspartato (110, 112 y 114), puede ser la que forme el poro. Según esto, al realizar una mutación puntual E106A o D112A, la ECC se bloquea de forma completa y con las mutaciones Q108A y D110A la ECC se reduce (Vig *et al.*, 2006). Otra mutación que provoca el cambio en la selectividad del poro es la del residuo E190Q (Prakriya *et al.*, 2006; Yeromin *et al.*, 2006). Asimismo, se ha descubierto que ciertos residuos del dominio ETON contribuyen a la unión de Orai1 con STIM1 (Derler *et al.*, 2013).

8.1.2.1.-Mecanismo de la entrada de Ca^{2+} .

Una vez que el agonista se une a su receptor de membrana acoplado a proteínas G, se producirá 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 en el RE, lo cual hace que éste sufra un cambio conformacional que permitirá la salida de Ca^{2+} al citoplasma, desencadenándose así la activación de varias rutas (Berridge, 1995). La liberación de Ca^{2+} en los depósitos provoca que el Ca^{2+} que se encuentra unido al dominio EF-hand de STIM1 se libere, por lo que STIM1 sufrirá un cambio conformacional que activará a los canales de Ca^{2+} 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 el 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 N de las STIMs (Muik *et al.*, 2011). Una vez que se han vaciado los reservorios de Ca^{2+} , ambas proteínas se reorganizan en las balsas lipídicas, zonas de la membrana con un alto contenido en colesterol (Pani *et al.*, 2008). La interacción entre STIM1 y Orai1 se produce en puntos muy concretos y localizados de la célula, donde la separación entre la membrana plasmática y el RE es menor de 100 nm (Baba *et al.*, 2006; Liou *et al.*, 2005). STIM1 se une a Orai1 mediante los dominios *coiled-coil* de los extremos C 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, de forma que estabiliza las uniones con las proteínas de membrana y activa el canal TRPC1 (Yuan *et al.*, 2007). En plaquetas humanas, el vaciamiento de los depósitos intracelulares aumenta la interacción entre STIM1 y hTRPC1 en un 50%, y este incremento es inhibido por la electrotransyección de un anticuerpo anti-STIM1 (Lopez *et al.*, 2006b), bloqueando además la interacción entre hTRPC1 y el IP₃R que se produce tras el vaciamiento de los almacenes de Ca²⁺ (Rosado *et al.*, 2000c). Esta interacción entre el TRPC1 y los IP₃Rs tiene un papel fundamental en la ECC en varias líneas celulares (Adebiyi *et al.*, 2011; Rosado *et al.*, 2000c; Sundivakkam *et al.*, 2009). 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, ha sido demostrado que esta translocación necesita los filamentos de actina (Lopez *et al.*, 2006b). 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).

El vaciamiento de los depósitos por IP₃ y el consiguiente incremento en la [Ca²⁺]_c desencadenan la apertura de otros canales de Ca²⁺ de los depósitos, como los receptores de rianodina, mecanismo que se denomina liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺ (CICR) (Kiselyov *et al.*, 2001).

Por otra parte, el DAG actuará como segundo mensajero, activando canales permeables a Ca²⁺, entre los que destacan TRPC3 y TRPC6, no involucrados en la ECC (canales SMOC), contribuyendo así al incremento de [Ca²⁺]_c necesario para la función celular. Recientemente ha sido identificada una nueva familia de proteínas, llamadas factor de intercambio de nucleótidos de guanina regulado por Ca²⁺ y DAG (CaIDAG-GEF/RasGRP), con dominios estructurales, tipo EF-hand de unión a Ca²⁺ y de unión a DAG, que sugieren que estas proteínas pueden participar en la regulación de las señales mediadas por Ca²⁺ y DAG. Recientes investigaciones han demostrado que la proteína CaIDAG-GEFI activa a Rap1, una GTPasa monomérica que participa en la activación rápida de las plaquetas activadas por Ca²⁺ dentro de un complejo formado por

Ca/DAG-GEFI, la PKC y el receptor purinérgico P2Y₁₂ (Stefanini *et al.*, 2010). Asimismo, el DAG activa la PKC, que inhibe a la PLC, la AC, la PLA₂, la PI3-K y la MLCK (Abrams *et al.*, 2008; Bushfield *et al.*, 1987; Ryu *et al.*, 1990).

8.2.-Mecanismos que disminuyen la [Ca²⁺]_c.

La células, una vez llevada a cabo la función que necesitaba los incrementos de Ca²⁺, necesitan recuperar el estado basal de su [Ca²⁺]_c, puesto que un exceso de Ca²⁺ en el citoplasma puede ser tóxico para la célula, activando mecanismos apoptóticos y produciendo finalmente la muerte celular. Los mecanismos que disminuyen la [Ca²⁺]_c se pueden agrupar en: los que devuelven el Ca²⁺ a los depósitos intracelulares y los que expulsan el Ca²⁺ al exterior. Todo tipo de transporte de Ca²⁺ citoplasmático requiere del uso de bombas e intercambiadores (Berridge, 1995).

-Bomba ATPasa de Ca²⁺ del retículo sarco/endoplásmico (SERCA): La proteína SERCA (con un tamaño aproximado de 100 kDa) se localiza en las membranas de los depósitos intracelulares, y es la encargada de “secuestrar” el Ca²⁺ citosólico y volverlo a introducir en los almacenes. Este proceso se realiza en contra de gradiente, por lo que consume ATP. Esta proteína está codificada por tres genes distintos, produciendo, por *splicing* alternativo, varias isoformas, con diferentes subtipos para cada isoforma (Enouf *et al.*, 1997). La estructura de SERCA es compleja, estando formada por 3 dominios citoplasmáticos (el A o ejecutor, donde se une el Ca²⁺; el N o sitio de unión con los nucleótidos (ATP); y el P o sitio de fosforilación, en los residuos Asp351 y Asp703), 10 dominios de hélices transmembrana y pequeños dominios luminales con forma de lazo. El funcionamiento, sin embargo, es más sencillo: cuando SERCA une dos iones de Ca²⁺ en el lado citosólico, se producirá un cambio estructural que permitirá que el ATP ceda un fósforo al residuo Asp351, el cual induce el cambio conformacional de SERCA, de forma que queda el dominio A en el lumen del almacén de Ca²⁺ y los sitios de unión a Ca²⁺ pierden su afinidad por el ion, liberándolo. La disociación de los iones de Ca²⁺ causará la hidrólisis del fósforo en el residuo de aspartato, de forma que se produce un nuevo cambio en la estructura proteica, en la que el dominio A volverá a situarse en el citoplasma (Toyoshima, 2008). SERCA está regulada por una proteína de membrana denominada fosfolamban, que inhibe su actividad reduciendo así su afinidad por Ca²⁺ (Simmerman *et al.*, 1998). Esta fosfolamban es inhibida por PKA o por proteínas cinasas

dependientes de Ca^{2+} y por la calmodulina (Metcalf *et al.*, 2005). Asimismo, SERCA puede regularse por una pequeña proteína regulada a su vez por una GTPasa (Rap 1b), que al activarse por un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ se une a SERCA3b inhibiéndola, de forma que favorece el aumento de Ca^{2+} en el citoplasma tras el estímulo. Cuando Rap 1b se fosforila por la GTPasa, se desacopla de SERCA3b, la cual aumentará el secuestro de Ca^{2+} (Lacabartz-Porret *et al.*, 1998). En último lugar, SERCA es inhibida por agentes farmacológicos como la taspigargina (TG), que bloqueará SERCA en el estado conformacional E2, en el que el sitio de unión a Ca^{2+} está situado en el lumen del RE (Davidson *et al.*, 1995; Thastrup *et al.*, 1989), el ácido ciclopiazónico y la 2,5-di(ter-butil)-1,4-hidroquinona (TBHQ) (Cavallini *et al.*, 1995).

-Bomba ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA): La PMCA usa la energía procedente de la hidrólisis de ATP con el fin de transportar Ca^{2+} contra el gran gradiente electroquímico que hay en la membrana plasmática (Carafoli *et al.*, 1994). Con una estructura y forma de actuación parecida a SERCA, la PMCA tiene 10 dominios transmembrana y los extremos N y C en el citoplasma. En el C hay una larga cola de aminoácidos (70-200 aa) con distintos dominios tanto de unión a moléculas como de fosforilación, por los que PMCA se regula. Algunos de estos reguladores son la CaM, los fosfolípidos ácidos y las proteínas cinasas como la PKA y la PKC (Strehler *et al.*, 2001).

-Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX): Está situado en la membrana plasmática, y usa la energía almacenada como gradiente electroquímico de Na^+ para sacar 1 ion de Ca^{2+} por cada 3 de Na^+ al medio extracelular. El NCX (de aproximadamente 108 kDa) está constituido por un péptido inicial (M0), seguido de 5 regiones transmembrana (M1-M5), un bucle intracelular muy grande, donde se localizan tanto el sitio de unión a Ca^{2+} como el sitio de inactivación de Na^+ , y 6 regiones transmembrana más (M6-M11) con el extremo C en el citoplasma. El NCX se regula por proteínas cinasas de la familia de la PKA y PKC (Blaustein *et al.*, 1999). Además, este NCX puede actuar inversamente, introduciendo Ca^{2+} al interior celular. Esto ocurre en algunas ocasiones, como en el caso del potencial de acción cardíaco, durante el cual aumenta transitoriamente la concentración de Na^+ cercana a la membrana plasmática, haciendo que el NCX expulse Na^+ reintroduciendo Ca^{2+} (Blaustein *et al.*, 1999).

-Tamponamiento del Ca^{2+} por proteínas citosólicas: En el citoplasma de las células existe una serie de proteínas que unirán el Ca^{2+} que se libera desde los depósitos, actuando así como sensores, efectores y proteínas tampón que modulan diferentes funciones dependientes de Ca^{2+} . Algunas de estas proteínas son la calretinina, la calbindina, la parvalbúmina o la calmodulina. La mayor parte de estas proteínas actúa tamponando la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, de forma que, en condiciones de reposo, se mantiene la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ baja, y mantienen así un equilibrio entre el Ca^{2+} que se encuentra libre y el que se encuentra unido a las 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).

-Calmodulina:

La proteína calmodulina (CaM) se expresa en todas las células eucariotas, constituyendo aproximadamente un 0,1% del total de las proteínas, y en ellas participa en multitud de vías de señalización, regulando procesos tan importantes como el crecimiento y la proliferación celular, así como el movimiento, la inflamación, la apoptosis o la respuesta inmunitaria celular. Se trata de una proteína de pequeño tamaño (148 residuos en vertebrados y peso molecular de aproximadamente 16 kDa), que posee cuatro dominios EF-hand, de forma que cada uno une una molécula de Ca^{2+} . Los dos primeros se combinan y forman un dominio N-terminal de estructura globular, que se separa de un dominio C-terminal formado por las otras dos EF-hands gracias a una estructura corta y flexible. El dominio C-terminal tiene entre tres y cinco veces más afinidad por el Ca^{2+} que el dominio N-terminal (Chin *et al.*, 2000).

Como sensor de Ca^{2+} , la calmodulina es capaz de detectar y responder ante pequeños cambios en la concentración intracelular de este ion, con una K_d de 5×10^{-6} M aproximadamente. En ausencia de Ca^{2+} , el dominio N-terminal adopta una morfología cerrada, en la que las hélices de ambos EF-hands se encuentran juntas. El dominio C-terminal, en condiciones de ausencia de Ca^{2+} , adquiere una forma semiabierta, de forma que expone parcialmente una sección hidrofóbica al disolvente. Esto podría permitir la interacción del dominio C-terminal con algunas proteínas a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ basales (Swindells *et al.*, 1996). Cuando se produce un aumento de Ca^{2+} , éste se unirá a la CaM, produciendo alteraciones en la estructura de esta proteína, permitiendo conformaciones abiertas de la misma y la exposición de grupos hidrofóbicos. Además, la CaM se

redistribuye en el citosol de la célula, llegando a acumularse incluso en el núcleo de algunas células, como las células acinares pancreáticas (Craske *et al.*, 1999). Estos cambios estructurales de la CaM producen la generación de energía, lo cual constituye la base de la capacidad de la CaM para mediar señales de Ca^{2+} .

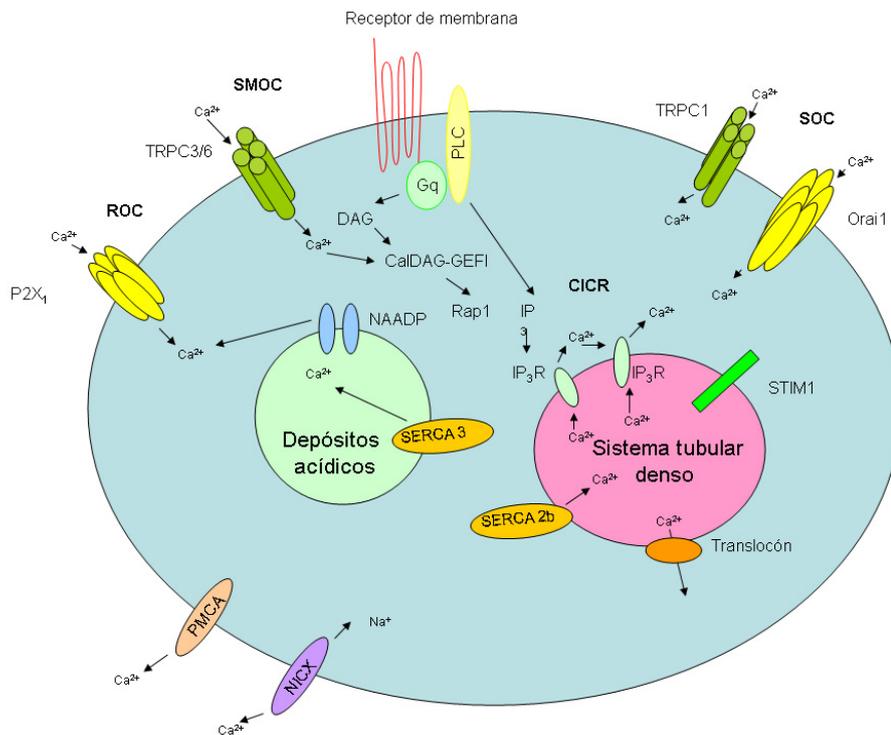


Figura 5. Mecanismos reguladores de la homeostasis del Ca^{2+}

8.3.-Finalización de la señal de Ca^{2+} .

Una vez producido el estímulo, la movilización de Ca^{2+} y la respuesta, la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma debe disminuir (20 nM) y los almacenes de Ca^{2+} deben rellenarse para responder al siguiente estímulo. Asimismo, el exceso de Ca^{2+} debe expulsarse al medio extracelular. Además de estos mecanismos encaminados a reducir la concentración de Ca^{2+} , se debe cortar también la señal que ha causado el vaciamiento de los reservorios y la apertura de los canales. El IP_3 debe ser metabolizado, para lo que la célula utiliza dos

vías. En la primera de ellas el IP_3 es desfosforilado a inositol 1,4-bisfosfato (IP_2) por la acción de una enzima 5-fosfatasa; o bien se fosforila por una enzima 3-cinasa, pasando entonces a IP_4 . El DAG es rápidamente inactivado por fosforilación a través de la DAG cinasa, que lo va a transformar en PA, el cual es un precursor de la biosíntesis de fosfolípidos.

Una vez activada la célula por un agonista y producido el incremento en $[Ca^{2+}]_c$, se producirá la inhibición de la AC y por lo tanto la disminución de AMPc (Adunyah *et al.*, 1987). Una vez finalizado el estímulo y la señal de Ca^{2+} , la AC empieza a sintetizar AMPc de forma rápida, activando la PKA, que inhibirá PLC y PLA_2 , así como la polimerización de actina (Redondo, 2009). De forma conjunta, empieza también la síntesis de GMPc por NO, lo cual activará la PKG que, trabajando sinérgicamente junto a PKA, regulará la función plaquetaria (Moore *et al.*, 2010). Por último, la expresión de la enzima CD39 en las células del endotelio vascular degradará ATP y ADP, reduciendo así la activación de las plaquetas (Redondo, 2009; Watson, 2009).

9.-Homeostasis del Ca^{2+} en la función plaquetaria.

La homeostasis del Ca^{2+} en las plaquetas es parecida a la de la mayoría de las células, aunque tiene algunas particularidades, debido a las características de estas células. Por ejemplo, las plaquetas humanas disponen de varios compartimentos intracelulares que almacenan Ca^{2+} : el STD (que actúa como el RE) y otras organelas. El STD es la organela más estudiada, y funciona como el reservorio de Ca^{2+} principal en la mayoría de las células (Pozzan *et al.*, 1994). Además del STD, las plaquetas también tienen otras organelas, como los lisosomas y los gránulos de secreción, que almacenan y liberan Ca^{2+} una vez activadas por un agonista. Estos almacenes se denominan depósitos ácidos de Ca^{2+} y, en ellos, el Ca^{2+} es introducido mediante un gradiente de protones (H^+) que es generado por la bomba de H^+ vacuolar (H^+ -ATPasa) (Camacho *et al.*, 2008; Camello-Almaraz *et al.*, 2000; Christensen *et al.*, 2002). Por último, aunque numerosos estudios demuestran el importante papel de las mitocondrias en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en diferentes tipos celulares (Camello-Almaraz *et al.*, 2006; de la Fuente *et al.*, 2010), el papel de la mitocondria en la homeostasis del Ca^{2+} en plaquetas no se conoce con exactitud. Asimismo, no parecen tener una función relevante en la ECC en plaquetas (Redondo *et al.*,

2004), lo cual puede ser debido al escaso número de mitocondrias (unas 7) presentes en cada plaqueta (Beutler *et al.*, 2001).

Los almacenes intracelulares de Ca^{2+} en plaquetas presentan distinta sensibilidad al vaciamiento producido por agonistas, de forma que el vaciamiento del STD está mediado principalmente por la activación de receptores de membrana acoplados a proteínas G, que activan la PLC y la síntesis de IP_3 , mientras que en los depósitos ácidos el vaciamiento está mediado por la producción de NAADP y su interacción con su receptor en la membrana de los gránulos, el cual ha sido descrito recientemente y se denomina TPC (Lopez *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2010). La trombina, por ejemplo, activa los receptores PAR1, PAR4 y la GPIb/IX/V, de los cuales PAR1 y PAR4 van a liberar Ca^{2+} del STD y tendrán alguna acción, pero muy pequeña, sobre los reservorios ácidos, y la GPIb/IX/V actuará sobre los gránulos ácidos (Jardin *et al.*, 2007). Por su parte, la respuesta de las plaquetas a los agonistas no es dependiente exclusivamente del vaciamiento de los reservorios. Algunos experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio han demostrado que el vaciamiento de los almacenes de Ca^{2+} , por sí solo y en un medio libre de Ca^{2+} , no producirá agregación, pero el vaciamiento en un medio en presencia de Ca^{2+} sí la producirá, lo cual indica que no es el vaciamiento de los depósitos lo que hace que se produzca la agregación, sino que ésta se producirá al alcanzarse una $[\text{Ca}^{2+}]_c$ determinada (Jardin *et al.*, 2007). Para alcanzar la concentración de Ca^{2+} necesaria para que se active la agregación, las plaquetas disponen de diferentes mecanismos que permiten la entrada de Ca^{2+} en la célula: los canales ROC, SMOC y SOC, aunque no se conocen canales activados por voltaje en este tipo celular. Uno de los canales ROC más estudiados en las plaquetas es el receptor purinérgico de tipo P2X_1 , que es activado por ATP y que permite la entrada de Ca^{2+} y Na^+ (Mahaut-Smith *et al.*, 2000). La activación de canales de Ca^{2+} por segundos mensajeros también existe en las plaquetas. Por ejemplo, el DAG, que es un producto de la hidrólisis del PIP_2 , estaría implicado en la activación de canales TRPs en la membrana (TRPC3 y TRPC6), e interactuaría formando el complejo CalDAG-GEF/RasGRP. Sin embargo, el mecanismo más importante de entrada de Ca^{2+} en las plaquetas es la ECC y los canales SOC. Este mecanismo, que es similar al del resto de las células, necesita la participación de STIM1, el sensor de Ca^{2+} en el RE, que actúa también como sensor de Ca^{2+} en los gránulos ácidos (Zbidi *et al.*, 2011); los canales SOC; Orai y diferentes miembros de la familia de los TRPC, los receptores de IP_3 y SERCA (Lopez *et*

al., 2006b; Redondo *et al.*, 2008; Salido *et al.*, 2011). De igual forma que en otros tipos celulares, este mecanismo está soportado por el citoesqueleto (Morales *et al.*, 2005; Redondo *et al.*, 2007b; Rosado *et al.*, 2000a), y es realizado en lugares específicos de la membrana, en las balsas lipídicas, que favorecen la interacción entre proteínas.

A diferencia de otros tipos celulares, en plaquetas humanas no se produce la activación de la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR), mediada por los RyR (no descritos en plaquetas). Sin embargo, se ha observado que cuando aumenta la concentración de Ca^{2+} cerca de los IP_3R , se puede activar la apertura de los mismos (Bezprozvanny *et al.*, 1991). Además, el Ca^{2+} puede liberarse de los depósitos intracelulares a través de los translocos, que son proteínas de membrana que están involucradas en el transporte de polipéptidos.

En plaquetas, la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular se puede producir a través de los canales ROC, canales SMOC o por los SOC.

En cuanto a la reducción de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, se produce gracias a SERCA (SERCA2b, situada en los gránulos ácidos; y SERCA3) y a la PMCA. Asimismo, el NCX participa también en la expulsión de Ca^{2+} hacia el medio extracelular.

OBJETIVOS

- Determinar el papel de las balsas lipídicas en la asociación entre las proteínas implicadas en la entrada capacitativa de Ca^{2+} , y por lo tanto su posible papel en dicha entrada de Ca^{2+} .
- Establecer el papel del citoesqueleto en la entrada capacitativa de Ca^{2+} y en la asociación de las proteínas STIM1, Orai1 y TRPC1.
- Analizar el papel de la calmodulina en la entrada capacitativa de Ca^{2+} , a través de su asociación con los canales de Ca^{2+} de la membrana.
- Definir el papel del dominio CIRB del TRPC6 de unión a calmodulina o IP_3Rs en la entrada de Ca^{2+} .

OBJECTIVES

- To determine the role of lipid rafts in the association of the proteins involved in the store-operated Ca^{2+} entry, and thus their possible role in this type of Ca^{2+} entry.
- To establish the role of the cytoskeleton in the store-operated Ca^{2+} entry and in the association between the proteins STIM1, Orai1 and TRPC1.
- To analyze the role of calmodulin in the store-operated Ca^{2+} entry, through its interaction with plasma membrane Ca^{2+} channels.
- To define the role of the TRPC6 CIRB site, which binds calmodulin or IP_3Rs , in Ca^{2+} entry.

METODOLOGÍA

Para la consecución de los objetivos anteriormente expuestos, se usaron los siguientes procedimientos experimentales:

1.-Reactivos.

- 2-aminoetil-difenil-borato (2-APB). *Sigma (Madrid, España)*.
- 5,5'-dimetil BAPTA/AM. *Invitrogen (Barcelona, España)*.
- Albúmina de suero bovino (BSA). *Sigma (Madrid, España)*.
- Anticuerpo anti-actina G. *Sigma (Madrid, España)*.
- Anticuerpo anti-calmodulina. *Abcam (Cambridge, Reino Unido)*.
- Anticuerpo anti-hTRPC1 C-terminal. *Abcam (Cambridge, Reino Unido)*.
- Anticuerpo anti-hTRPC6 (S-20) C-terminal. *Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Estados Unidos)*.
- Anticuerpo antiinmunoglobulina G de burro conjugado con peroxidasa de rábano. *Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Estados Unidos)*.
- Anticuerpo antiinmunoglobulina G de cabra conjugado con peroxidasa de rábano. *Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Estados Unidos)*.
- Anticuerpo antiinmunoglobulina G de conejo conjugado con peroxidasa de rábano. *GE Healthcare (Madrid, España)*.
- Anticuerpo antiinmunoglobulina G de oveja conjugado con peroxidasa de rábano. *Amersham (Buckinghamshire, Reino Unido)*.
- Anticuerpo antiinmunoglobulina G de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). *Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Estados Unidos)*.
- Anticuerpo antiinmunoglobulina G de ratón conjugado con peroxidasa de rábano. *GE Healthcare (Madrid, España)*.
- Anticuerpo anti-IP₃Rs I/II/III (H-300). *Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Estados Unidos)*.
- Anticuerpo anti-Orai1 C-terminal. *Sigma (Madrid, España)*.
- Anticuerpo anti-STIM1. *BD Transduction Laboratories (Franklin Lakes, Estados Unidos)*.
- Anticuerpo monoclonal anti-calmodulina (J4D8). *Abcam (Cambridge, Reino Unido)*.

- Anticuerpo monoclonal anti-hTRPC6 contra los residuos 300-400 de TRPC6. *Abcam (Cambridge, Reino Unido)*.
- Anticuerpo policlonal anti-hTRPC1 (557-571). *Alomone (Jerusalén, Israel)*.
- Anticuerpo policlonal anti-Orai1 N-terminal. *ProSci Inc. (Derio, España)*.
- Apirasa (grado VII). *Sigma (Madrid, España)*.
- Aspirina. *Sigma (Madrid, España)*.
- Benzamidina. *Sigma (Madrid, España)*.
- Calmidazolium. *Sigma (Madrid, España)*.
- Citocalasina D (Cyt D). *Calbiochem (Madrid, España)*.
- Cloruro de lantano. *Sigma (Madrid, España)*.
- Colchicina. *Sigma (Madrid, España)*.
- Deoxicolato. *Sigma (Madrid, España)*.
- Detergente iónico Tween 20. *Sigma (Madrid, España)*.
- Dimetil BAPTA-AM (1,2-bis(o-aminofenoxi) etano-N,N,N',N'-ácido tetraacético). *Sigma (Madrid, España)*.
- Dodecilsulfato sódico (SDS). *Sigma (Madrid, España)*.
- EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin. *Pierce (Rockford, Estados Unidos)*.
- Faloidina conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC). *Sigma (Madrid, España)*.
- Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). *Sigma (Madrid, España)*.
- Formaldehído. *Sigma (Madrid, España)*.
- Fura-2-acetilmetil éster (fura-2/AM). *Invitrogen (Madrid, España)*.
- Gel de estreptavidina inmovilizado. *Pierce (Rockford, Estados Unidos)*.
- Hiperfilms ECL. *Amersham (Buckinghamshire, Reino Unido)*.
- Ionomicina. *Sigma (Madrid, España)*.
- Jasplakinolida. *Calbiochem (Madrid, España)*.
- Leupeptina. *Sigma (Madrid, España)*.
- Marcador de peso molecular. *Bio-Rad (Madrid, España)*.
- Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). *Sanex (Badajoz, España)*.
- Metil-β-ciclodextrina (MβCD). *Sigma (Madrid, España)*.
- Nonidet P-40. *Sigma (Madrid, España)*.
- Oregon Green 488 paclitaxel. *Invitrogen (Madrid, España)*.
- Paclitaxel (taxol). *Sigma (Madrid, España)*.
- Papel secante (blotting paper). *GE Healthcare (Madrid, España)*.

- Paraformaldehído. *Sigma (Madrid, España)*.
- Películas fotográficas. *GE Healthcare (Madrid, España)*.
- Péptido de control de antígeno (CAP) para el anticuerpo anti-hTRPC6 (S-20) C-terminal. *Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Estados Unidos)*.
- Probenecid. *Sigma (Madrid, España)*.
- Proteína agarosa A. *Upstate Biotechnology Inc. (Waltham, Estados Unidos)*.
- Reactivos de revelado quimioluminiscente. *Pierce (Rockford, Estados Unidos)*.
- Reactivo de transfección TransPass™ COS/293. *New England BioLabs (Ipswich, Estados Unidos)*.
- Suero fetal bovino inactivado por el calor. *Sanex (Badajoz, España)*.
- Tapsigargina (TG). *Sigma (Madrid, España)*.
- Test *Cholesterol E. Wako Diagnostics (Richmond, Estados Unidos)*.
- Tris. *Sigma (Madrid, España)*.
- Tritón X-100. *Sigma (Madrid, España)*.
- Trombina. *Sigma (Madrid, España)*.
- Valinomicina. *Sigma (Madrid, España)*.

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

2.-Preparación de las plaquetas.

2.1.-Selección de los individuos susceptibles de investigación.

Las muestras de sangre que se usaron en estos estudios provinieron de donantes voluntarios sanos, y la obtención de las mismas para el posterior aislamiento de las plaquetas se realizó mediante punción venosa en la Clínica Juan Manuel Hernández Cruz (San Antón, 10; Cáceres), o bien a partir de concentrados de plaquetas (PRP: Plasma Rico en Plaquetas) donados para la investigación por el servicio de Hematología del Hospital General San Pedro de Alcántara (Avenida Pablo Naranjo Porras, s/n; Cáceres). Todos estos procesos se realizaron de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki, y los Comités de Bioética del Hospital y de la Universidad de Extremadura.

2.2.-Preparación de la suspensión de plaquetas.

La sangre obtenida siguiendo el protocolo mencionado anteriormente se mezcló cuidadosamente con una solución de dextrosa citrato ácida (ACD), en una proporción de 1 a 6 en relación al volumen de sangre extraído. De esta forma, se evita la coagulación de la sangre y la activación de las plaquetas.

REACTIVOS	Concentración (mM)	(g/L)
Ácido cítrico	85	12,5
Citrato sódico	78	7,5
Glucosa	111	10

Tabla I: Solución ACD (pH=7,46 mezclado con la sangre)

Una vez obtenida la sangre, ésta se centrifugó durante 5 minutos a 700×g, tras lo cual se obtuvieron tres fracciones diferenciadas: en el fondo, una de color rojo constituida por los glóbulos rojos o eritrocitos; a continuación un halo blanquecino formado por los glóbulos blancos o leucocitos; y, en la parte superior, una fracción de color amarillento, el PRP. Este PRP se separó y se le añadió ácido acetil salicílico (100 µM), que inhibe la COX-I evitando la liberación plaquetaria de prostaglandinas e impidiendo la agregación plaquetaria espontánea; y apirasa (40 µg/mL), que hidroliza el ADP y ATP secretado por las plaquetas a través de su actividad di-trifosfatasa, impidiendo así la activación plaquetaria mediada por estos agonistas.

Por último, el PRP (tanto procedente de las muestras de sangre como el concentrado del hospital) fue centrifugado a 350×g durante 20 minutos, obteniéndose un pellet de color blanco (las plaquetas), y un sobrenadante llamado plasma pobre en plaquetas (PPP), que fue desechado. Tras retirar el PPP, las plaquetas fueron resuspendidas en un medio tampón HEPES salino (HBS), suplementado con apirasa (40 µg/mL).

REACTIVOS	Concentración (mM)	(g/L)
HEPES	10	1,19
Cloruro sódico	145	4,23
Cloruro potásico	5	0,19
Sulfato de magnesio	1	0,13
Glucosa	20	1,8
BSA	1 mg/mL	1,0

Tabla II: Tampón Hepes Salino (HBS) (pH=7,4)

3.-Cultivo celular.

Las células de riñón embrionario humano (HEK293) se adquirieron de la American Type Culture Collection y se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco, suplementado con un 10% de suero fetal bovino inactivado por el calor, en un incubador a 37 °C con un 5% de CO₂. En el momento de los experimentos, las células se suspendieron en medio (HBS). Cuando se requirió un medio libre de Ca²⁺, se añadió EGTA 1,2 mM.

3.1.-Transfección celular.

La transfección celular con shTRPC1 y shTRPC6 se realizó utilizando el reactivo TransPass. Cuando las células alcanzaron una confluencia aproximada del 80%, fueron transfectadas con 7 µg/mL de shTRPC1 o shTRPC6 amablemente cedidos por la doctora Ambudkar (National Institutes of Health, Bethesda, EEUU). Para ello, se mezclaron en 1 mL de medio DMEM sin reconstituir el plásmido y 25 µL de TransPass, dejando la mezcla durante 20 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se retiraron 3 mL de las placas de siembra de las células y se añadió, gota a gota, la mezcla por toda la placa, que se movió en círculos suavemente y se mantuvo en el incubador durante 24 horas tras la transfección, pasadas las cuales se procedió a los experimentos.

La secuencia del shRNA para el TRPC1 humano fue 5'-CACCGGGTGACTTTATATGGTTCGAAAACCATATAATAGTCACCC-3' y la secuencia antisentido fue 5'-AAAAGGGTGACTATTATATGGTTTTTCGAACCATATAATAGTCACCC-3'. Para el shTRPC6 la secuencia fue 5'-CACCGTTCGAGGACCAGCATAACATGCGAACATGTATGCTGGTCCTCGAC-3' y la secuencia antisentido fue 5'-AAAAGTTCGAGGACCAGCATAACATGTTTCGCATGTATGCTGGTCCTCGAC-3'.

4.-Métodos de determinación de la viabilidad celular.

Para comprobar la viabilidad de las plaquetas tras el aislamiento de las mismas, se utilizaron dos técnicas: azul de tripán y calceína. La supervivencia

obtenida fue del 95%, demostrando así que el aislamiento de las plaquetas es adecuado.

4.1.-Tinción con Azul Tripán.

Este método se basa en la capacidad que poseen las células viables de expulsar del interior de su citoplasma el colorante Azul de Tripán (Baur *et al.*, 1975). Una vez incubadas las células con el colorante, se observan en un microscopio óptico (a aumento de 40x), y se hace el recuento de las células vivas, que son las que conservan su citoplasma transparente; y de las muertas, que tendrán el citoplasma teñido de azul. Por último, se calcula el porcentaje de viables y no viables frente al total de las células contadas.

4.2.-Calceína.

La calceína-AM es una sonda no fluorescente que entra en la célula por difusión pasiva. Una vez introducida, si la célula está viva, es cortada por esterasas, de forma que se transforma en calceína, la cual empieza a emitir en la longitud de onda del verde (535 nm), recogiendo la emisión en un espectrofluorímetro en unidades arbitrarias. En cambio, si la célula está muerta, la sonda no es cortada y no se emite ninguna señal. La calceína-AM se incubaba en el PRP durante 30 minutos a 37 °C, con una concentración de 5 µM. Pasado el tiempo de incubación, las células se centrifugan y se resuspenden en tampón HBS para medir la fluorescencia en un espectrofotómetro Cary Eclipse (Varian Ltd., Madrid, España). Se usaron alícuotas de 2 mL, y las muestras se excitaban a 494 nm, recogiendo la emisión a 535 nm.

Esta técnica tiene una ventaja frente al azul tripán, y es que es necesario que las células tengan actividad enzimática para que la sonda sea fluorescente, y además requiere que la membrana celular esté íntegra para que el fluoróforo se retenga dentro por las ATPasas.

5.-Determinación de la concentración de Ca²⁺ intracelular. Fluorimetría.

5.1.-Fura-2/AM.

El fura-2/AM es un fluoróforo de Ca²⁺ permeable a la membrana plasmática, puesto que presenta en su estructura un grupo acetoximeliéster (AM) que, una vez introducido en el interior celular, es cortado por una serie de esterasas citosólicas que liberan fura-2, incapaz de atravesar la membrana y de penetrar en los compartimentos intracitoplasmáticos. Este fluoróforo presenta una constante de disociación (K_d) para el Ca²⁺ de 120-250 nM, en función de la temperatura, lo cual permite determinar variaciones de Ca²⁺ muy pequeñas, de hasta nanomolar (Grynkiewicz *et al.*, 1985).

La ventaja de esta sonda con respecto a otras en el estudio de los movimientos de Ca²⁺ se debe a su carácter ratiométrico, ya que presenta dos longitudes de onda de excitación (340 y 380 nm), que permiten 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 la concentración de Ca²⁺ libre citosólico, 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, lo cual resulta útil a la hora de monitorizar los cambios en la fluorescencia no dependiente de Ca²⁺, o para apreciar el apagamiento de la fluorescencia cuando la molécula se une a algunos metales pesados como el Mn²⁺ (Sage *et al.*, 1989).

5.2.-Carga del indicador.

En el caso de los estudios realizados en plaquetas, se incubó el PRP en presencia de fura-2/AM a una concentración de 2 µM durante 45 minutos, a 37 °C y en oscuridad. Una vez terminada la incubación, el PRP se centrifugó a 350×g durante 20 minutos. Tras la centrifugación, se eliminó el sobrenadante (que contenía el fura-2 AM sobrante que no se introdujo en la célula) y el pellet de plaquetas se resuspendió en HBS al que se añadió el día del experimento

glucosa (1,80 mg/mL) y BSA (1 mg/mL). A esta suspensión de plaquetas se le adicionó 40 µg/mL de apirasa.

En el caso de los estudios realizados con células HEK293, éstas se incubaron con fura-2/AM a una concentración de 2 µM durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Una vez transcurrida la incubación, las células se centrifugaron a 80×g, resuspendiendo el pellet en HBS al que se añadió el día del experimento glucosa (1,80 mg/mL) y BSA (1 mg/mL).

5.3.-Determinación de la concentración de Ca^{2+} intracelular mediante métodos fluorimétricos.

Los movimientos de Ca^{2+} en las células de estudio se registraron usando un espectrofotómetro Cary Eclipse (Varian Ltd., Madrid, Spain) a partir de alícuotas de suspensión celular depositadas en cubetas de cuarzo. En el caso de las plaquetas, las alícuotas fueron de 1 mL, mientras que fueron de 2 mL cuando se estudiaron las células HEK293. El sistema está provisto de un dispositivo de microagitación y termostatación que permite mantener las células en suspensión y a temperaturas a 37 °C.

Todos los agentes añadidos durante la realización de los experimentos se adicionaron directamente en la cubeta del espectrofluorímetro en función del volumen de la suspensión celular, para poder obtener así la concentración final deseada. 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.

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):

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

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

R = Ratio de la muestra.

R_{\min} = Ratio mínimo.

R_{\max} = Ratio máximo.

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 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 Ca^{2+} de 1 mM. Por su parte, el S_b y el R_{\max} se obtuvieron al romper 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 formada por una alta concentración de EGTA (500 mM) y de Trizma base (3 M), de forma que el Ca^{2+} se separó del fluoróforo.

5.4.-Determinación de la liberación y entrada de Ca^{2+} .

La liberación de Ca^{2+} inducida por TG, por ionomicina o por trombina se estimó calculando el área bajo la curva del incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ durante los 180 segundos posteriores a la adición del agonista, en un medio libre de Ca^{2+} , corregidas con la resta del promedio de la concentración basal de Ca^{2+} pre-estímulo en ausencia de Ca^{2+} extracelular, usando el quelante de Ca^{2+} EGTA a una concentración de 100 μ M (Rosado *et al.*, 2000a). La entrada de Ca^{2+} que se produce tras la adición de $CaCl_2$ se calculó calculando el área bajo la curva del incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ durante los 150 segundos posteriores a la adición de $CaCl_2$ y se expresó como (nM·s), siendo corregida con la resta del promedio de la concentración de Ca^{2+} post-estímulo (Rosado *et al.*, 2000d). Los movimientos de Ca^{2+} inducidos por OAG (un análogo del diacilglicerol) se calcularon mediante el mismo método que las anteriores, en un medio con 2 mM $CaCl_2$ (Hisatsune *et al.*, 2005).

6.-Determinación de la entrada de Mn²⁺.

El Mn²⁺ se utilizó para monitorizar la entrada de cationes divalentes. El flujo de Mn²⁺ fue medido en alícuotas de suspensión de células a 37 °C, utilizando para ello un espectrofotómetro Cary Eclipse (Varian Ltd., Madrid, España), emitiendo a la longitud de onda isoemisiva de 360 nm. El apagamiento de la señal de fluorescencia del fura-2 se representó en una escala linear arbitraria. La fluorescencia del fura-2 bajo la excitación a 360 nm fue insensible al Ca²⁺.

En el caso de las células HEK293, para estimar la ratio de disminución de la fluorescencia del fura-2 tras la adición de Mn²⁺ al medio (o tras la adición de TG en presencia de Mn²⁺), las curvas se ajustaron a la ecuación $y = S \times e^{-kx} + A$, donde k es la pendiente, S es el período y A es la meseta (Ben-Amor *et al.*, 2006). En los estudios llevados a cabo en plaquetas, para comparar la ratio de disminución de la fluorescencia del fura-2 cuando las plaquetas se sometieron a diferentes tratamientos, las curvas se ajustaron a la ecuación $y = Ax+B$, donde A es la pendiente y B es la fluorescencia del fura-2 al inicio del experimento.

7.-Técnicas para el aislamiento y cuantificación de proteínas.

7.1.-Inmunoprecipitación.

La inmunoprecipitación es una técnica gracias a la cual se puede aislar una proteína determinada de un lisado celular, usando para ello un anticuerpo que se une específicamente a la proteína diana.

Las células resuspendidas en HBS (con apirasa en el caso de las plaquetas), se repartieron en viales Eppendorf, con un volumen de 500 µL y una concentración de 1x10⁹ plaquetas/mL o de 2x10⁶ células HEK293/mL. En el caso de los estudios llevados a cabo en plaquetas, la suspensión se dejó reposar durante 30-60 minutos para que las células volvieran a un estado normal y evitar la posible, aunque mínima pre-activación plaquetaria que se hubiera podido producir al centrifugar las células. Pasado este período, las células se trataron a 37 °C, bien con agonistas, tanto fisiológicos como farmacológicos, o bien con activadores o inhibidores de los distintos procesos a estudiar.

Una vez tratadas, las células se lisaron con el detergente RIPA, en una proporción 1:1 (500 µL células: 500 µL RIPA 2x, para que la concentración final de RIPA sea 1x) y se mantuvieron 10 minutos en hielo para evitar proteólisis, desfosforilación y desnaturalización de las proteínas (procesos que comienzan inmediatamente después del lisado, y que se detienen o al menos ralentizan al mantener las muestras a 4 °C a la vez que se añaden los correspondientes inhibidores).

REACTIVOS	Concentración (mM)	(g/L)
Tris	20	2,42
NaCl	316	18,50
Deoxicolato sódico	2 %	20,00
EGTA	2	0,76
SDS	0,2 %	2,00
Tritón X-100	2 %	20 mL

Tabla III: Tampón RIPA (2x) (pH=7,2)

Una vez finalizada la incubación en hielo, las muestras se centrifugaron a 16100×g, a 4 °C durante 15 minutos, con el fin de eliminar restos celulares no deseados, como el citoesqueleto. Se retiró el sobrenadante y se incubó junto con el anticuerpo de 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 cristalizante (Fc) o cadena pesada de las inmunoglobulinas (Ig)) durante toda la noche a 4 °C en un rotor con agitación constante. De esta forma, el anticuerpo se une a la proteína y a la bola de agarosa. Pasado el período de incubación, las muestras se centrifugaron a 9300×g durante un 1 minuto a 4 °C y se retiró el sobrenadante (las bolas de agarosa quedaron depositadas en el fondo con el anticuerpo y la proteína unidas) y se añadió un tampón salino fosfato (PBS) para lavar las bolas, agitando a continuación y volviendo a centrifugar. Este proceso se repitió 2 veces. En el último centrifugado, se retiró el sobrenadante pero no se añadió PBS, y se volvió a centrifugar para conseguir que las bolas quedasen empaquetadas en el fondo, aspirando el poco sobrenadante que quedaba y añadiendo Laemmli Buffer (LB), enriquecido con ditioneitol (DTT) al 5%, para su posterior resolución en un gel SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate – PoliAcrylamide Gel Electrophoresis).

REACTIVOS	Concentración (mM)	(g/L)
NaCl	137	8,00
KCl	2,70	0,20
Na ₂ HPO ₄	5,62	2,01
NaH ₂ PO ₄	1,09	0,17
KH ₂ PO ₄	1,47	0,20
H ₂ O		1 L

Tabla IV: Tampón fosfato salino (PBS) (pH=7,4)

REACTIVOS	Concentración (mM)	(g/100 mL) 4×
Tris	280	3,40
Glicerol	40 %	40 mL
Azul de bromofenol	0,008 %	0,008
SDS	8 %	8

Tabla V: Solución de Laemmli (pH=7,4)

7.2.-Inmunoprecipitación de STIM1 de la membrana.

Para aislar la fracción de STIM1 localizada en la membrana plasmática y poder medir así su interacción con otras proteínas (como Orai), se inmunoprecipitó la STIM1 de la membrana utilizando el protocolo descrito a continuación.

Las plaquetas se alicuotaron en 500 μ L, se estimularon y se fijaron al tiempo requerido por incubación en hielo durante 10 minutos con PBS con un 3% de paraformaldehído (m/v) y suplementado con un 0,5% de BSA (m/v). Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las plaquetas fijadas se lavaron dos veces con PBS para retirar el medio, y se resuspendieron de nuevo en HBS, donde se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo anti-STIM1, que reconoce la región N-terminal de la proteína, situada en el exterior de la membrana plasmática.

Una vez terminada la incubación, las muestras se lavaron otra vez con PBS para retirar el anticuerpo del medio y fueron lisadas con RIPA tras este lavado, incubadas en hielo durante 10 minutos y centrifugadas a 16100 \times g a 4 °C durante 15 minutos, como se describió en el apartado anterior. Finalmente, el sobrenadante se incubó con 25 μ L de bolas de agarosa recubiertas por proteína

A durante toda la noche a 4 °C, para al día siguiente lavar las muestras y proceder como se describió con anterioridad.

7.3.-Cuantificación de la concentración de proteínas.

Para determinar el contenido en proteína total se empleó el método de Bradford (Bradford, 1976). Este método 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, de forma que este cambio puede ser detectado mediante el empleo de un espectrofotómetro.

REACTIVOS	Concentración (mM)	50 mL
Coomasie brilliant blue G-250	117	5 mg
Etanol	95%	2,5 mL
Ácido fosfórico	85%	5 mL
H₂O	8%	42,5 mL

Tabla VI: Reactivo de Bradford

En una microplaca se mezclaron 10 µL de las muestras y 190 µL del reactivo de Bradford. Una vez agitadas para obtener una suspensión homogénea, las muestras se incubaron a temperatura ambiente y en oscuridad durante 10 minutos, transcurridos los cuales se llevó a cabo la lectura de la concentración de las proteínas mediante un lector de microplacas Infinite M200 (Tecan, Männedorf, Suiza). Los datos obtenidos se compararon con una curva estándar realizada con BSA disolviendo 2 mg en 1 mL de agua bidestilada. Los resultados se expresaron en mg/mL.

7.4.-Western blotting.

La técnica de Western blotting, una de las técnicas de biología molecular más extendidas, sirve para separar y analizar proteínas. Fue desarrollada por Burnette (Burnette, 1981), utilizando y adaptando la tecnología de Southern para la detección de ADN. El principio del Western blotting 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). Según esto, la velocidad de migración de las proteínas viene relacionada con estas variables según la siguiente fórmula:

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

Un factor esencial a tener en cuenta en una electroforesis es el pH del tampón donde se encuentran las proteínas. El punto isoeléctrico de una proteína es aquel en el que la carga neta de la proteína es cero. Si esto sucede, la proteína no se mueve, ya que el campo eléctrico no la afectaría. Para evitar esto, usamos el método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970), en el que las muestras se desnaturalizan por calor en presencia de agentes desnaturalizantes, como beta-mercaptoetanol, que destruye 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 netas negativas, permitiendo que las proteínas se muevan solamente en función de su tamaño, siendo las más pequeñas las que se desplacen más en el gel. Además, el Laemmli Buffer es un medio reductor que hará que los anticuerpos se separen de las bolas de agarosa cuando se ha realizado la técnica de inmunoprecipitación. Para asegurar la completa desnaturalización de la proteína, se calentaron las muestras durante 10 minutos a 70 °C en un termobloque y se centrifugaron 1 minuto a 9300×g a temperatura ambiente antes de cargar las muestras en el gel de electroforesis (Bonifacino *et al.*, 2001; Redondo *et al.*, 2008).

7.4.1.-Electroforesis.

Una vez obtenidas las muestras se procedió a separar las proteínas en función de su tamaño, usando para ello un gel separador SDS-PAGE (de diferente porcentaje de acrilamida dependiendo de la proteína de estudio) y un gel de carga del 4%.

REACTIVOS	30 mL (10%)	10 mL (4%)
Solución A	10 mL	1,32 mL
Solución B	7,5 mL	
Solución C	0,30 mL	0,1 mL
Solución D		2,5 mL
AMPS	15 mg	10 mg
H ₂ O	12,20 mL	6,07 mL
Temed	15 µL	10 µL

Solución A: 30% de acrilamida/bis-acrilamida (Ratio 37,5:1).

Solución B: Tris 1,5 M (72,6 g en 400 mL de H₂O). pH: 8,8.

Solución C: SDS 10% (10 g en 100 mL de H₂O).

Solución D: Tris 0,5 M (24,24 g en 400 mL de H₂O). pH: 6,8.

AMPS: Persulfato de Amonio

Temed: Catalizador que comienza la reacción de polimerización.

Tabla VII: Gel SDS-PAGE

Estos dos tipos de geles pertenecen al sistema de Tampón Discontinuo:

-Gel de carga: asegura la migración de todas las proteínas en el frente de migración, de forma que se acumulan todas las que se han cargado en el pocillo. Su concentración de acrilamida y bisacrilamida es muy 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 que forma una matriz cuya concentración variará en función del tamaño de la proteína buscada. Así, a mayor concentración de acrilamida/bisacrilamida el poro formado disminuye, por lo que una concentración alta (15%) se utilizará para separar proteínas de pequeño peso molecular, mientras que para separar proteínas de gran tamaño se usarán bajas concentraciones de acrilamida y bisacrilamida (8%).

Una vez cargadas las muestras de proteínas a los pocillos (añadiendo un volumen apropiado para que exista la misma cantidad de proteína en cada pocillo, calculado a partir de los resultados obtenidos con la técnica de Bradford). Para su separación, las proteínas se sometieron a un campo eléctrico de 30 mA durante 2 horas. Además, con el fin de que la corriente recorra de forma

homogénea todo el gel desde un polo a otro, se usó un tampón de electroforesis o *running buffer*.

REACTIVOS	Concentración (mM)	(g/L) 5x
Tris	124	15
Glicina	126	77
SDS	0,5%	5

Tabla VIII: Tampón de electroforesis (pH=8,3)

7.4.2.-Transferencia.

Este proceso consiste en transferir las proteínas separadas en el gel de poliacrilamida a un soporte más estable y manejable, como es una membrana de nitrocelulosa, donde las proteínas conservan su antigenicidad y son sensibles a sondas. Para ello, se usó el sistema de transferencia semiseca. Con un voltaje de 0,8 mA/cm² durante 2 horas, se transfirieron las proteínas a la membrana de nitrocelulosa (con un tamaño de poro de 0,2 micras (GE Healthcare)). El paso de la corriente se produjo a través del tampón de transferencia.

REACTIVOS	Concentración (mM)	(g/L)
Tris	25	3,03
Glicina	150	8,5
MeOH	20%	200 mL

Tabla IX: Tampón de transferencia (pH=8,3)

7.4.3.-Bloqueo.

Una vez que las proteínas han sido transferidas a la membrana, es necesario evitar las interacciones inespecíficas que pueda ocasionar la incubación con anticuerpos. Para ello, la membrana de nitrocelulosa se bloqueó con una solución de bloqueo, encargada de cubrir las zonas conocidas como sitios de unión inespecíficos. Esta solución de bloqueo contiene alta cantidad de BSA, una proteína frente a la que no reaccionarán los anticuerpos que usaremos a continuación. El bloqueo se puede realizar de dos formas: bien se deja la solución 1 hora en agitación a temperatura ambiente o bien podemos dejarla una noche completa (un mínimo de 8 horas) a 4 °C y sin agitación.

REACTIVOS	Concentración (mM)	(g/250 mL)
TBST		250 mL
BSA	10%	25
Acida sódica	0,02%	0,05

Tabla X: Solución de bloqueo (pH=8,0)

7.4.4.-Incubación con anticuerpos.

En primer lugar, la membrana se incubó con un anticuerpo primario, que reconoce de forma específica una secuencia de la proteína diana a detectar. Dependiendo del anticuerpo, los tiempos de incubación pueden variar desde 1 hora a temperatura ambiente hasta toda la noche a 4 °C. Asimismo, la concentración del mismo también varía en función de la especificidad del anticuerpo (según la casa comercial).

Una vez terminada la incubación con el anticuerpo primario, éste se retiró y la membrana se lavó para retirar el exceso de anticuerpo primario que no hubiera quedado unido específicamente a la proteína. Para ello, se lavó la membrana 6 veces durante 5 minutos cada vez, con una solución salina de trizma (TBS) con detergente (Tween), (TBST).

REACTIVOS	Concentración (mM)	(g/L) 10x
Tris	200	24,2
NaCl	137	80

TBST: Añadir 0,1% Tween 20.

Tabla XI: Solución de lavado (Solución salina de trizma (TBS)) (pH=7,6)

A continuación, la membrana se incubó con una inmunoglobulina G (IgG) específica del tipo animal del que se obtiene el anticuerpo primario; es decir, si el anticuerpo primario que usamos se obtiene en conejo, la IgG que debemos utilizar debe ser específica de conejo, puesto que reconocerá la fracción constante del anticuerpo primario y se unirá a ella. El tiempo de incubación de todos los anticuerpos secundarios fue de 1 hora a temperatura ambiente. La concentración de anticuerpo secundario que se empleó fue de 1:10000.

Una vez finalizada la incubación del secundario, la membrana se lavó para retirar el exceso de anticuerpo secundario que no se ha unido, siguiendo el protocolo de lavado descrito anteriormente.

7.4.5.-Revelado.

Puesto que el anticuerpo secundario está conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP), ésta, al combinarse con un reactivo comercializado por Pierce (Solución ECL), generará una reacción quimioluminiscente que será detectada por una película fotográfica con una alta sensibilidad. Al exponer la película fotográfica a esta reacción lumínica, se obtuvieron unas manchas (blot) que eran la proteína buscada. Estas manchas fueron analizadas con un densitómetro óptico (Sun Microsystem, Inc, Mountain View, CA) y con el programa informático Image J (N.I.H), expresando los resultados como diferencias en los porcentajes de densidad óptica entre las manchas de los diferentes tratamientos.

8.-Técnica para la introducción de péptidos y anticuerpos en las células. Electroporación reversible.

La electroporación es una técnica basada en la aplicación de un campo eléctrico sobre las células, de forma que se abren poros transitorios en la membrana plasmática de las mismas, permitiendo la introducción de ácidos nucleicos y complejos macromoleculares (Neumann *et al.*, 1982).

En estos estudios, las plaquetas se electroporaron y se les electrotransyectó el anticuerpo anti-TRPC6 para bloquear la acción de la proteína diana o su interacción con otras proteínas. Para ello, las células (a una concentración de 4×10^8 plaquetas/mL) fueron resuspendidas en un tampón de electroporación, de composición similar a la del medio celular interno, y se pasaron a una cubeta de electroporación de 4 mm de distancia entre los electrodos (Sigma). Se añadió al medio el anticuerpo anti-TRPC6 a una concentración final de 1 $\mu\text{g/mL}$ y las células fueron electroporadas usando un sistema de electroporación de Bio-Rad (Bio-Rad Gene Pulser Xcell Electroporation System), sometándose a 7 pulsos de 25 milisegundos, con un voltaje de 4 kV/cm y 25 $\mu\text{Faradios}$ de capacitancia.

REACTIVOS	Concentración (mM)	(g/L)
Glutamato Potásico	15	30,50
HEPES	2	4,766
Diacetato Magnésico	0,7	1,50
EGTA	0,1	0,38

Glucosa: El día del experimento se suplementa con 0,9 mg/ mL

Tabla XII: Tampón de electroporación (pH=7,4)

Una vez realizada la electroporación, las células se incubaron durante a 37 °C durante 1 hora (el tiempo estimado para el cierre de los poros realizados en la membrana plasmática). Transcurrido ese tiempo, el tampón de electroporación se suplementó con un nuevo tampón de post electroporación, con el cual se alcanzan las condiciones del tampón HBS descrito con anterioridad. Por último, las células se centrifugaron durante 20 minutos a 350×g (para quitar el exceso de anticuerpo que no haya entrado en la célula) y se resuspendieron en HBS suplementado con apirasa, para llevar a cabo los experimentos (Lopez *et al.*, 2006b).

REACTIVOS	Concentración (mM)	(g/L) 10x
HEPES	6,7	1,59
NaCl	190	11,10

Glucosa: El día del experimento se suplementa con 2,1 mg/ mL

BSA: El día del experimento se suplementa con 1,33 mg/ mL

Tabla XIII: Tampón de post electroporación (pH=7,4)

9.-Técnica de inmunofluorescencia.

La técnica de inmunofluorescencia se basa en la especificidad de los anticuerpos frente a sus antígenos, y consiste en el marcaje de biomoléculas de una célula con una sonda fluorescente, que permitirá ver la distribución de las moléculas en dicha célula. En estos estudios, se utilizó para determinar la cantidad de STIM1 localizado en la membrana plasmática de plaquetas.

Para ello, las muestras de plaquetas se trataron con TG 200 nM en presencia de 1 mM de Ca²⁺, fijándolas con un volumen igual de PBS con un 3% de formaldehído (m/v) a los 10 segundos de la estimulación con el agonista, e incubando posteriormente en hielo durante 10 minutos. Tras la fijación, las

plaquetas se lavaron dos veces con PBS, para retirar el agente fijador, y se resuspendieron en HBS, incubando a continuación durante 2 horas con el anticuerpo primario (anti-STIM1) a una concentración de 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Una vez transcurrida la incubación, las muestras se lavaron otra vez dos veces con PBS y se incubaron durante 1 hora con 0,02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), tras lo cual se lavaron de nuevo dos veces con PBS y se llevó a cabo la medición de la fluorescencia. Dicha fluorescencia fue registrada usando un espectrofluorímetro (Varian Ltd., Madrid, España). Las muestras se excitaron a 496 nm y la emisión se registró a 595 nm.

10.-Determinación de las concentraciones de colesterol.

La determinación cuantitativa del colesterol total se realizó de la siguiente forma: las células HEK293 (10^7 células/200 μL de PBS) o las plaquetas (10^8 plaquetas/200 μL de PBS) se lisaron y el colesterol se extrajo de los lisados añadiendo cloroformo (400 μL) y metanol (400 μL) al lisado celular sonificado (100 μL). La capa inferior (con cloroformo), se recogió y evaporó en vacío. El colesterol fue entonces disuelto en etanol y analizado utilizando el test colorimétrico *Cholesterol E*, registrando los resultados a 600 nm en un espectrofotómetro.

11.-Preparación de M β CD cargada de colesterol (CLCD):

La CLCD se preparó disolviendo 100 μmol de M β CD en 600 μL de metanol, mezclándolos con 30,8 μmol de colesterol. Esta mezcla se secó con nitrógeno, seguido de vacío durante una hora, y después se dispersó en 2 mL de PBS. La solución resultante se sonicó durante 3 minutos, se incubó en un agitador a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche y se filtró con un filtro de poros de 0,22 μm .

12.-Biotinilación de proteínas de la superficie celular.

La biotinilación es una técnica que permite el aislamiento y la determinación de las proteínas situadas en la membrana plasmática.

Para llevar a cabo esta técnica, se partió de alícuotas de 1 mL de suspensión celular, que se estimularon con los diferentes agonistas, terminando la reacción

al tiempo requerido con Söercen's buffer (SB), a 4 °C. Las células se recogieron a continuación por centrifugación a 900×g durante 13 minutos a 4 °C. Las proteínas de la superficie celular se marcaron resuspendiendo en EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin (2,5 mg/3 mL de SB a 4 °C) y se incubaron con agitación a 4 °C durante 1 hora. La reacción de biotilación se terminó añadiendo 100 µL de Tris base 1 M, y el agente biotinizante sobrante se retiró lavando las células dos veces en SB a 4 °C. Las células marcadas se resuspendieron a continuación en PBS y se lisaron con RIPA. Las proteínas marcadas se recogieron rotando el lisado durante toda la noche con bolas recubiertas de streptavidina y se sometieron a la técnica de Western Blotting, descrita anteriormente.

REACTIVOS	Concentración (mM)	(g/L)
di-sodio hidrógeno ortofosfato	16	2,84
sodio di-hidrógeno ortofosfato	114	17,78

Tabla XIV: Söercen's Buffer (SB) (pH=8)

13.-Medida del contenido de F-actina.

El contenido en filamentos de actina de las células HEK293 se midió partiendo de una suspensión celular de 2×10^6 células/mL. Se tomaron 200 µL de esta suspensión y se les añadió 200 µL de PBS con un 3% (m/v) de formaldehído, a 4 °C. A continuación, se realizó una incubación en hielo de las muestras durante 10 minutos, transcurridos los cuales las células fijadas se permeabilizaron por incubación durante 10 minutos con 10 µL de detergente Nonidet P-40 al 0,025% (v/v) disuelto en PBS. Tras este tiempo, las células se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con 1 µM de faloidina conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) en PBS suplementado con 0,5% (m/v) de BSA. Por último, las células se recogieron por centrifugación durante 1 minuto a 3000×g y se resuspendieron en PBS. La tinción celular se midió usando un espectrofotómetro de fluorescencia Perkin-Elmer (Perkin-Elmer, Norwalk, CT), excitando las muestras a 496 nm y registrando la emisión a 516 nm.

14.-Medida del contenido en microtúbulos.

El contenido en microtúbulos de las células HEK293 se determinó a partir de una suspensión de 2×10^6 células/mL. Se tomaron 200 μ L de esta suspensión y se les añadió 200 μ L de PBS con un 3% (m/v) de formaldehído, a 4 °C. A continuación, se realizó una incubación en hielo de las muestras durante 10 minutos, transcurridos los cuales las células fijadas se permeabilizaron por incubación durante 10 minutos con 10 μ L de detergente Nonidet P-40 al 0,025% (v/v) disuelto en PBS. Tras este tiempo, las células se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con 1 μ M de Oregon Green 488 paclitaxel en PBS suplementado con 0,5% (m/v) de BSA. Por último, las células se recogieron por centrifugación durante 1 minuto a $3000 \times g$ y se resuspendieron en PBS. La tinción celular se midió usando un espectrofotómetro de fluorescencia Perkin-Elmer (Perkin-Elmer, Norwalk, CT), excitando las muestras a 488 nm y registrando la emisión a 522 nm.

15.-Agregación plaquetaria.

En estos estudios se midió también la agregación plaquetaria tras someter a la suspensión plaquetaria a la acción de diversos agonistas.

Para ello, se obtuvieron las plaquetas como se ha descrito anteriormente, pero sin añadir aspirina al PRP, por ser esta sustancia un inhibidor de la agregación. Para la medición de la agregación, se utilizó un agregómetro Chronolog (Havertown, Pa, EEUU), usando cubetas de cristal con 300 μ L de suspensión plaquetaria (2×10^8 plaquetas/mL), a 37 °C y en agitación a 1200 rpm.

Durante la medición, los agonistas utilizados se añadieron directamente a la cubeta del agregómetro. Este aparato mide el tiempo de reacción, el porcentaje de plaquetas que se agregan y la velocidad y el grado en que las plaquetas dispersas en una muestra forman los agregados plaquetarios durante la estimulación con estos agonistas, basándose en la observación de las variaciones de la densidad óptica de la muestra, de forma que, cuando se produce la agregación, la turbidez que se origina por la presencia de plaquetas en suspensión disminuye por la fuerte interacción entre las mismas, incrementándose la luz que pasa a través de la muestra y provocando así un aumento de la transmitancia. Para determinar esto, se utilizó un control (cubeta

con HBS), de forma que el porcentaje de agregación (o amplitud) se estimó como el porcentaje de la diferencia en la transmisión de la luz entre la suspensión plaquetaria y el HBS. La ratio (o pendiente) de la agregación obtenida es, por tanto, el cambio en el porcentaje de agregación por minuto.

16.-Tratamiento estadístico.

Los datos obtenidos en estos estudios se expresan como media \pm el error estándar de la media (E.E.M.). Las curvas representativas de la movilidad de Ca^{2+} intracelular se presentan como cambios en concentración intracelular expresados en nM·s.

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos se utiliza el análisis de la varianza o ANOVA de una vía, cuando los grupos experimentales a comparar son más de dos, o el test t-Student para comparar sólo dos grupos. En los experimentos en los que el análisis de la varianza resultaba significativo, se realizaron además comparaciones de los grupos dos a dos empleando para ello el test de Dunnett.

Los resultados obtenidos se consideraron estadísticamente significativos cuando la $p < 0.05$.

Los resultados que se han obtenido durante el período de realización de esta Tesis Doctoral, y que completan los objetivos anteriormente expuestos, han sido publicados en las siguientes revistas internacionales:

1. Lipid rafts modulate the activation but not the maintenance of store-operated Ca^{2+} entry. Galan C., Woodard G.E., Dionisio N., Salido G.M., Rosado J.A. *Biochimica et Biophysica Acta* 2010; 1803 (9): 1083-1093.
2. Lipid rafts are essential for the regulation of SOCE by plasma membrane resident STIM1 in human platelets. Dionisio N., Galán C., Jardín I., Salido G.M., Rosado J.A. *Biochimica et Biophysica Acta* 2011; 1813 (3): 431-437.
3. The cytoskeleton plays a modulatory role in the association between STIM1 and the Ca^{2+} channel subunits Orai1 and TRPC1. Galán C., Dionisio N., Smani T., Salido G.M., Rosado J.A. *Biochemical Pharmacology* 2011; 82 (4): 400-410.
4. Functional role in the calmodulin- and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-binding (CIRB) site of TRPC6 in human platelet activation. Dionisio N., Albarran L., Berna-Erro A., Hernandez-Cruz J.M., Salido G.M., Rosado J.A. *Cellular Signalling* 2011; 23 (11): 1850-1856.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

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

Lipid rafts modulate the activation but not the maintenance of store-operated Ca^{2+} entry

Carmen Galan^a, Geoffrey E. Woodard^b, Natalia Dionisio^a, Gines M. Salido^a, Juan A. Rosado^{a,*}^a Department of Physiology (Cell Physiology Research Group), University of Extremadura, 10071 Cáceres, Spain^b NIDDK, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892-2560, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 April 2010

Received in revised form 2 June 2010

Accepted 11 June 2010

Available online 22 June 2010

Keywords:

Orai1
TRPC1
TRPC6
STIM1
Lipid rafts
Lanthanum

ABSTRACT

Different studies have reported that proteins involved in Ca^{2+} entry are localized in discrete plasma membrane domains known as lipid rafts, which have been suggested to support store-operated Ca^{2+} entry by facilitating STIM1 clustering in endoplasmic reticulum–plasma membrane junctions as well as the interaction of STIM1 with TRPC1. Here we report that treatment of HEK293 cells with thapsigargin (TG) results in the activation of Ca^{2+} entry with two components, an early, La^{3+} -sensitive, component and a late component that shows both La^{3+} -sensitive and -insensitive constituents. Preincubation with methyl- β -cyclodextrin (M β CD) prevented TG-induced activation of Ca^{2+} entry but, in contrast, enhanced this process after its activation. Addition of M β CD after store depletion did not modify the La^{3+} -sensitive store-operated divalent cation entry but increased La^{3+} -insensitive non-capacitative Ca^{2+} entry. Cell stimulation with TG results in a transient increase in Orai1 co-immunoprecipitation with STIM1, TRPC1 and TRPC6. TG-induced association of these proteins was significantly attenuated by preincubation for 30 min with M β CD, without altering surface expression of Orai1 or TRPCs. In contrast, the association of Orai1 with STIM1 or TRPC1 was unaffected when M β CD was added after store depletion with TG. Addition of M β CD to TG-treated cells promoted dissociation between Orai1 and TRPC6, as well as non-capacitative Ca^{2+} entry. TRPC6 expression silencing indicates that M β CD-enhanced non-capacitative Ca^{2+} entry was mediated by TRPC6. In conclusion, lipid raft domains are necessary for the activation but not the maintenance of SOCE probably due to the support of the formation of Ca^{2+} signalling complexes involving Orai1, TRPCs and STIM1.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Store-operated or capacitative Ca^{2+} entry is a major mechanism for Ca^{2+} influx in non-electrically excitable cells [1], where it has been reported to play an important role in Ca^{2+} signalling and intracellular homeostasis under physiological conditions, including the support of Ca^{2+} oscillations [2]. Store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) is a mechanism regulated by the filling state of the intracellular Ca^{2+} stores, which gates Ca^{2+} permeable channels in the plasma membrane. As previously mentioned [3], SOCE can be temporally divided into three components: an early component, which corre-

sponds to its activation, the maintenance of Ca^{2+} influx and a late component leading to the inactivation of the process once the Ca^{2+} stores had been refilled. Recent studies have provided evidence supporting a role for the stromal interaction molecule (STIM) 1 as the transmembrane endoplasmic reticulum (ER) Ca^{2+} sensor [4–7]. However, the nature of the plasma membrane Ca^{2+} permeable channels involved in SOCE, as well as the mechanism of activation is still unclear, with studies presenting Orai1 as a putative Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} current (CRAC) channel [8–13] and transient receptor potential (TRP) proteins as candidates to mediate both SOCE and non-capacitative Ca^{2+} entry [14–19]. Both Orai1 and TRP proteins have been shown to participate in signalling complexes, including STIM1, that play a relevant role in the activation of SOCE [18,20–22].

The reason of the current discrepancies concerning SOCE might reside in the manoeuvres used to deplete the intracellular Ca^{2+} stores. The most widely used means to induce Ca^{2+} store depletion is the use of SERCA blockers, such as thapsigargin (TG), which induce a passive discharge of the stores that is variable depending on the Ca^{2+} leakage rate of the Ca^{2+} compartment and the amount of Ca^{2+} accumulated [23,24]. However, SERCA inhibitors cause a rise in cytosolic Ca^{2+}

Abbreviations: $[\text{Ca}^{2+}]_i$, intracellular free calcium concentration; BSA, bovine serum albumin; CLM, cholesterol-loaded methyl- β -cyclodextrin; ER, endoplasmic reticulum; HEK293 cells, Human embryonic kidney 293 cells; HBS, HEPES-buffered saline; M β CD, methyl- β -cyclodextrin; PBS, phosphate-buffered saline; PM, plasma membrane; SOCE, store-operated calcium entry; STIM1, stromal interaction molecule 1; TBST, tris-buffered saline with 0.1% Tween 20; TG, thapsigargin; TRP, transient receptor potential

* Corresponding author. Department of Physiology, University of Extremadura, Cáceres 10071, Spain. Tel.: +34 927257139; fax: +34 927257110.

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

concentration ($[Ca^{2+}]_c$) as a consequence of store depletion, and this $[Ca^{2+}]_c$ elevation might be able to open Ca^{2+} -activated cation permeable channels leading to secondary, non-capacitative in nature, Ca^{2+} influx [25].

Store-operated Ca^{2+} entry has been shown to be modulated by plasma membrane microdomains known as lipid rafts, plasma membrane domains enriched in cholesterol and sphingolipids that facilitate the recruitment of a number of signalling molecules [26]. Disruption of lipid rafts by sequestration of membrane cholesterol has been reported to reduce clustering of STIM1 into ER–plasma membrane junctions, the association between STIM1, Orai1 and TRPC1 proteins, and the activation stage of SOCE [27,28]. However, whether lipid rafts are important for the maintenance of SOCE has not been investigated.

In the present study we sought to shed new light on the understanding of the role of lipid rafts in SOCE. We describe for the first time that sequestration of cholesterol in store-depleted cells results in enhancement of Ca^{2+} entry, most likely due to an increase in non-capacitative Ca^{2+} entry, and results in dissociation of TRPC6 from the Orai1 protein, which strongly suggest that lipid rafts are important for the regulation of TRPC6 function. In addition, we have found that lipid rafts are important for the activation but not for the maintenance of SOCE.

2. Materials and methods

2.1. Materials

TG, leupeptine, benzamidine, phenyl methyl sulphonyl fluoride, bovine serum albumin (BSA), lanthanum chloride, methyl- β -cyclodextrin (M β CD), anti-G actin antibody and anti-Orai1 antibody (C-terminal) were from Sigma (St. Louis, MO, USA). Anti-hTRPC1 (C-terminal) antibody was from Abcam (Cambridge, UK). Anti-hTRPC6 (C-terminal) antibody and horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Anti-STIM1 antibody was from BD (San Jose, CA, USA). Horseradish peroxidase-conjugated ovine anti-mouse IgG antibody (NA931) and ECL were from Amersham (Buckinghamshire, UK). Fura 2-AM was from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Enhanced chemiluminescence detection reagents, immobilized streptavidin gel, and EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin were from Pierce (Rockford, IL, USA). Cholesterol E test was from Wako Diagnostics (Richmond, VA, USA). All other reagents were of analytical grade.

2.2. Cell culture and transfection

Human embryonic kidney 293 (HEK293) cells were obtained from the American Type Culture Collection and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium, supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, in a 37 °C incubator with 5% CO₂. At the time of the experiments cells were suspended in HEPES-buffered saline (HBS) containing (in mM): 145 NaCl, 10 HEPES, 10 D-glucose, 5 KCl, 1 MgSO₄, 1 mM CaCl₂, pH 7.45. When a Ca^{2+} -free medium was required 1.2 mM EGTA was added.

Cell transfection with shTRPC1 and shTRPC6 was performed as described previously [29,30] using shTRPC1 and shTRPC6 kindly provided by Dr. Ambudkar. For the shRNA targeting human TRPC1 the sense sequence was 5'-CACCGGGTGACTTTATATGGTTTCGAAAACCATATAATAGTCACCC-3' and the antisense sequence was 5'-AAAAGGGTGACTATTATATGGTTTTCGAACCATATAATAGTCACCC-3'. For the shTRPC6 the sense sequence was 5'-CACCGTCGAGGACCAGCAGCAGCATGCGAACATGTATGCTGCTCCTCGAC-3' and the antisense sequence was 5'-AAAAGTCGAGGACCAGCAGCAGCAGCATGCTGCTCCTCGAC-3'. These sequences were synthesised and hybridized as previously described [29,31]. Plasmids were used for silencing experiments at the concentration 1 μ g/ μ L.

2.3. Immunoprecipitation

Cell suspension aliquots (500 μ L) were treated as described and lysed with lysis buffer, pH 7.2, containing 316 mM NaCl, 20 mM Tris, 2 mM EGTA, 0.2% SDS, 2% sodium deoxycholate, 2% triton X-100, 2 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride, 100 μ g/mL leupeptin and 10 mM benzamidine. Protein immunoprecipitation was achieved by incubating samples with 1 μ g anti-STIM1 or anti-TRPC6 antibody or 2 μ g anti-TRPC1 or anti-Orai1 antibody and protein A–agarose overnight at 4 °C.

2.4. Western blotting

Western blotting was performed as described previously [32]. Briefly, proteins were separated by 10% SDS-PAGE and electrophoretically transferred, for 2 h at 0.8 mA/cm², in a semi-dry blotter (Hoefer Scientific, Newcastle, Staffs, UK) onto nitrocellulose membranes for subsequent probing. Blots were incubated overnight with 10% (w/v) BSA in Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 (TBST) to block residual protein binding sites. Immunodetection of Orai1, hTRPC1, hTRPC6 and STIM1 was achieved using the anti-Orai1 or anti-STIM1 antibody diluted 1:250 in TBST for 2 h or the anti-hTRPC1 or anti-TRPC6 antibody diluted 1:200 in TBST for 2 h. To detect the primary antibody, blots were incubated for 1 h with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated anti-IgG 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 a scanning densitometry.

2.5. Measurement of intracellular free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_c$)

Cells were loaded with fura-2 by incubation with 2 μ M fura-2/AM for 30 min at room temperature. Fluorescence was recorded from 2 mL aliquots of magnetically stirred cellular suspension (2×10^6 cells/mL) at 37 °C using a Cary Eclipse Spectrophotometer (Varian Ltd, Madrid, Spain) with excitation wavelengths of 340 and 380 nm and emission at 505 nm. Changes in $[Ca^{2+}]_c$ were monitored using the fura-2 340/380 fluorescence ratio and calibrated as previously described [33].

Ca^{2+} release by TG was estimated using the integral of the rise in $[Ca^{2+}]_c$ for 180 s after the addition of the agonist [24]. Ca^{2+} entry was estimated using the integral of the rise in $[Ca^{2+}]_c$ for 150 s after addition of CaCl₂ and expressed as (nM·s) [34]. Ca^{2+} entry was corrected by subtraction of the $[Ca^{2+}]_c$ elevation due to leakage of the indicator.

Mn²⁺ influx was monitored as a quenching of fura-2 fluorescence at the isoemissive wavelength of 360 nm. To estimate the rate of fura-2 fluorescence quenching after the addition of Mn²⁺ to the medium (or after addition of TG in the presence of Mn²⁺) the traces were fitted to the equation $y = S \times e^{-Kx} + A$, where K is the slope, S is the span and A is the plateau [35].

2.6. Measurement of cholesterol levels

Quantitative determination of total cholesterol was performed using a previously described procedure [36]. HEK 293 cells (10^7 cells/200 μ L of phosphate-buffered saline (PBS) containing 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 5.62 mM Na₂HPO₄, 1.09 mM NaH₂PO₄, 1.47 mM KH₂PO₄, pH 7.2, and supplemented with 0.5% (w/v) BSA) were lysed and cholesterol was extracted from cell lysates by adding chloroform (400 μ L) and methanol (400 μ L) to the sonicated cell lysate (100 μ L). The bottom (chloroform) layer was collected and evaporated under vacuum and cholesterol was dissolved in ethanol and assayed using the colorimetric assay Cholesterol E test (Wako Diagnostics), with absorbance determined at 600 nm in a spectrophotometer.

2.7. Cholesterol-loaded M β CD (CLM) preparation

CLM was prepared as described previously [37,38]. Briefly, 100 μ mol of M β CD were dissolved in 600 μ L of methanol and mixed with 30.8 μ mol of cholesterol. The mixture was dried by nitrogen followed by high vacuum for at least 1 h and then dispersed in 2 mL of PBS. The resulting solution was sonicated for 3 min, incubated in a shaker at 37 °C overnight and filtered with a 0.22- μ m-pore size syringe filter.

2.8. Biotinylation of cell surface proteins

Aliquots of cell suspensions (1 mL) were treated in the absence or presence of M β CD following the indicated protocols. The reaction was terminated with ice-cold Söerscen's buffer (SB) containing 16 mM Na₂HPO₄, 114 mM NaH₂PO₄, pH 8.0. Cells were collected by centrifugation at 900 \times g for 13 min at 4 °C. Cell surface proteins were labeled by resuspending in EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin (2.5 mg/12 mL of ice-cold SB) and incubated under mixing for 1 h at 4 °C. The biotinylation reaction was terminated by the addition of 100 μ L of 1 M Tris base, and remaining biotinylation agent was removed by washing the cells in ice-cold SB. Labeled cells were resuspended in PBS and then lysed. Labeled proteins were collected by rotating the lysate overnight with streptavidin-coated agarose beads and subjected to Western blotting as described previously.

2.9. Statistical analysis

Analysis of statistical significance was performed using Student's *t* test. The difference was considered statistically significant when at least $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Disruption of lipid rafts inhibits TG-induced activation of cation entry

We have investigated the role of lipid rafts in the activation and maintenance of TG-evoked Ca²⁺ entry by using two previously described experimental manoeuvres [3,39]. The activation of Ca²⁺ entry was investigated by preincubation with M β CD, a compound widely utilized to remove cholesterol from cells, thus disrupting the lipid raft domains [26,27], prior to stimulation with TG. On the other hand, M β CD was added after stimulation with TG when the role of lipid rafts on the maintenance of Ca²⁺ entry was investigated.

In the absence of extracellular Ca²⁺, addition of TG (1 μ M) to fura 2-loaded HEK293 cells in stirred cuvettes at 37 °C evoked a biphasic elevation in [Ca²⁺]_c due to release of Ca²⁺ from internal stores consisting of an initial rapid and transient increase in [Ca²⁺]_c, followed by a sustained elevation in [Ca²⁺]_c (Fig. 1A and B). We have recently found that this response might be attributed to the existence of at least two different Ca²⁺ pools in these cells, with different Ca²⁺ leakage rates (Aulestia F, personal communication). Subsequent addition of Ca²⁺ (final concentration 2 mM) to the external medium induced a sustained increase in [Ca²⁺]_c indicative of Ca²⁺ entry (Fig. 1A).

Cell treatment with 10 mM M β CD reduced the levels of cellular cholesterol by 82% compared to levels found in control untreated cells (Fig. 1E; $n = 4$). Pretreatment of HEK293 cells at 37 °C with M β CD (10 mM) for 30 min reduced TG-evoked Ca²⁺ entry to 80% of control. M β CD-treated cells showed a similar release of Ca²⁺ from the intracellular stores upon treatment with TG for 180 s as compared to untreated cells, indicating that accumulation of Ca²⁺ in the internal stores was not significantly affected by disruption of lipid rafts (Fig. 1A).

The effect of M β CD on TG-induced store-operated divalent cation entry was confirmed by monitoring the influx of Mn²⁺, which can be

used as a surrogate for Ca²⁺ entry given its quenching effect on fura-2 fluorescence [40].

Fura-2 was excited at the isoemissive wavelength, 360 nm, to allow monitoring of quenching of fluorescence by Mn²⁺. In the presence of Mn²⁺, treatment with TG resulted in a sustained quenching of fura-2 fluorescence compared with non-stimulated cells (Table 1). Pretreatment with M β CD had no effect on Mn²⁺ entry per se and reduced TG-evoked Mn²⁺ influx to 68% (Table 1).

3.2. Effect of M β CD on pre-activated store-operated Ca²⁺ entry

We have further investigated whether the integrity of the lipid raft domains is required for the maintenance of Ca²⁺ entry. To explore this issue we investigated the effect of M β CD on Ca²⁺ influx in HEK293 cells once SOCE had been stimulated by treatment with TG, as described above. Fig. 1B shows the effect of addition of M β CD to TG-treated HEK293 cells. M β CD (10 mM) or the vehicle (DMSO) was added 180 s after TG. As shown in Fig. 1A, Ca²⁺ entry was clearly stimulated at this point in time. Subsequent addition of M β CD for 30 min enhanced SOCE to 197% of control, without altering the release of Ca²⁺ from the stores (Fig. 1B; $n = 6$). These findings suggest that lipid rafts disruption in store-depleted cells alters the maintenance of TG-evoked Ca²⁺ entry.

In order to investigate whether the effects of M β CD were specific for cholesterol depletion, we performed a series of experiments where cells were treated with CLM. As shown in Fig. 1C and D, treatment of HEK 293 cells with CLM did not significantly modify TG-induced Ca²⁺ mobilization in these cells, thus suggesting that the effect of M β CD was specific at removing cholesterol from the cells.

3.3. Effect of M β CD on SOCE and non-capacitative Ca²⁺ entry

Cell treatment with TG results in passive Ca²⁺ efflux from the intracellular stores, which results in: 1) depletion of the Ca²⁺ stores, and thus, activation of SOCE, and 2) elevation in [Ca²⁺]_c, which, in turn, might result in the activation of Ca²⁺-dependent signalling pathways. In support of this, a recent study has reported that, in addition to SOCE, treatment with TG results in autocrine stimulation of non-capacitative Ca²⁺ entry in human platelets [41]. In order to investigate whether TG-evoked Ca²⁺ entry in HEK293 cells is entirely capacitative we have investigated the effect of lanthanum, a well known SOCE blocker [35,42], on the activation and maintenance of TG-induced Ca²⁺ entry. As shown in Fig. 2A, addition of 100 μ M La³⁺, 30 min prior stimulation with TG, abolished the entry of Ca²⁺ ($p < 0.05$; $n = 6$). Interestingly, when La³⁺ was added after treatment with TG, Ca²⁺ entry observed 30 min after the addition of La³⁺ was significantly reduced as compared to control (Fig. 2B; $p < 0.05$; $n = 6$) but still 63% of Ca²⁺ influx remained (Fig. 2B). These findings indicate that Ca²⁺ influx induced by brief stimulation with TG is entirely capacitative while Ca²⁺ influx observed after prolonged stimulation with TG has both capacitative and non-capacitative components.

Next we have investigated whether the effect of M β CD on TG-induced activation and maintenance of Ca²⁺ entry was through SOCE or through non-capacitative Ca²⁺ entry pathways. As expected, preincubation of HEK293 cells for 30 min at 37 °C with 10 mM M β CD in combination with 100 μ M La³⁺ resulted in complete inhibition of TG-evoked Ca²⁺ entry when Ca²⁺ was reintroduced in the extracellular medium 180 s after TG (Fig. 3A). Fig. 3B shows the effect of adding M β CD in combination with La³⁺ to store-depleted HEK293 cells. Either agents or the vehicles were added 180 s after TG. Addition of M β CD plus La³⁺ for 30 min reduced TG-evoked Ca²⁺ entry by 25% as compared to treatment with M β CD alone, although Ca²⁺ entry in the presence of both agents was still found to be significantly greater than Ca²⁺ influx observed in vehicle-treated cells (TG-evoked Ca²⁺ entry in the presence of M β CD and La³⁺ was 150% of control; $p < 0.05$; $n = 6$).

Fig. 3C summarizes the effects of M β CD, La³⁺ or a combination of both agents on TG-induced activation and maintenance of Ca²⁺ entry.

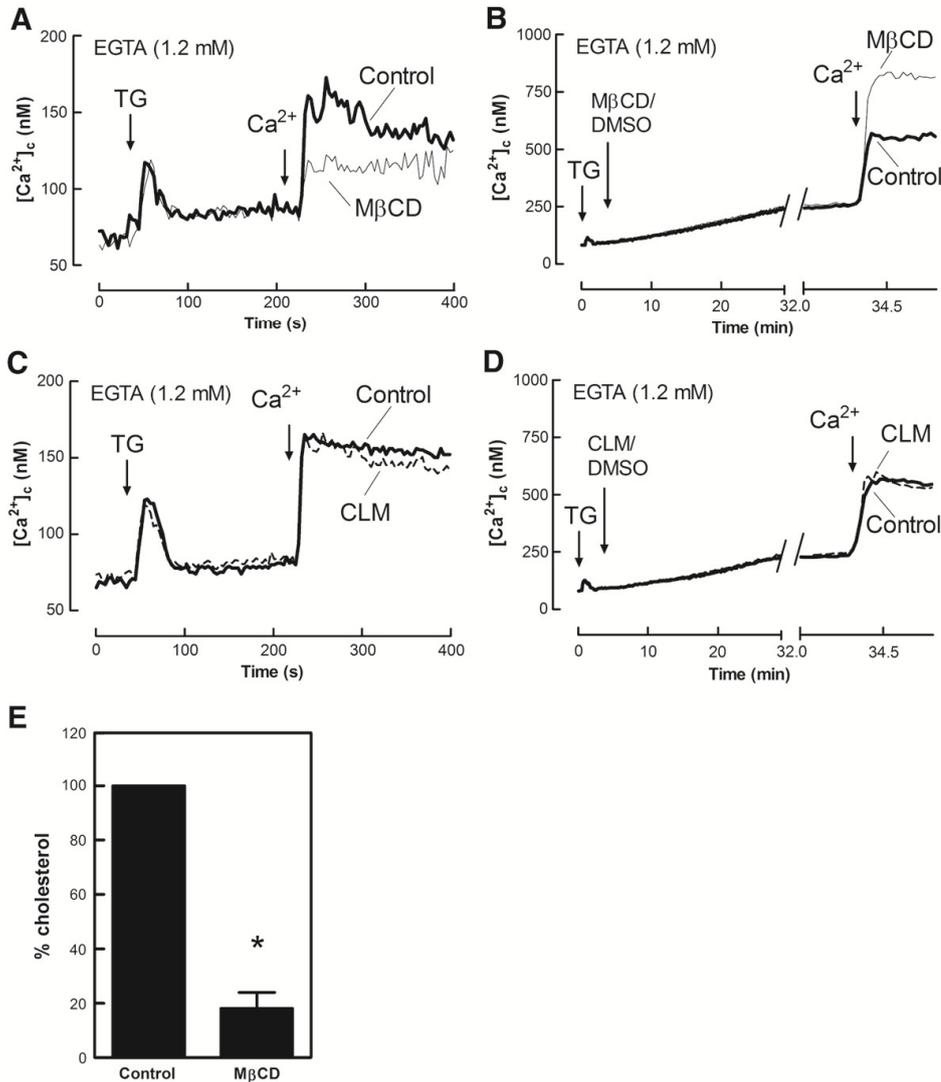


Fig. 1. Effect of MβCD on the activation and maintenance of TG-induced Ca²⁺ entry in HEK293 cells. (A and C) fura-2-loaded cells were preincubated for 30 min at 37 °C in the presence of 10 mM MβCD (A) or 10 mM cholesterol-loaded MβCD (CLM; C) or the vehicle (DMSO; Control). At the time of experiment, 1.2 mM EGTA was added. Cells were then stimulated with 1 μM TG, and 180 s later 2 mM CaCl₂ was added to the medium. (B and D) fura-2-loaded cells were suspended in a Ca²⁺-free medium (1.2 mM EGTA was added) and were then stimulated with 1 μM TG. Three minutes later 10 mM MβCD, 10 mM cholesterol-loaded MβCD (CLM; D) or the vehicle was added as indicated. CaCl₂ (final concentration 2 mM) was added to the medium 30 min after MβCD or CLM to initiate Ca²⁺ entry. Traces shown are representative of six independent experiments. (E) Total cholesterol levels were measured from equal numbers of untreated HEK 293 cells or HEK 293 cells after treatment for 30 min with 10 mM MβCD (n=4). *p<0.05 compared to control.

The activation of Ca²⁺ entry by TG was abolished in the presence of La³⁺ and significantly reduced by MβCD. In contrast, the maintenance of Ca²⁺ entry induced by TG was only partially sensitive to La³⁺ and was facilitated by MβCD. The reduction of Ca²⁺ entry determined 30 min after TG induced by La³⁺ in the absence and presence of MβCD was found to be similar, which strongly suggest that disruption of lipid rafts by MβCD facilitates exclusively non-capacitative Ca²⁺ entry and has no effect on the maintenance of SOCE. To further explore this issue we investigated the effect of MβCD on the maintenance of TG-evoked store-operated Mn²⁺ entry. As shown in Table 1, treatment with MβCD once store-operated cation entry has been activated by TG had no significant

effect on the influx of Mn²⁺, which further confirms that lipid rafts are not necessary for the maintenance of this process.

3.4. Role of TRPC1 and TRPC6 in the activation and maintenance of Ca²⁺ entry in HEK293 cells

We have now investigated the role of TRPC1 and TRPC6 in TG-induced Ca²⁺ entry by using TRPC1 and TRPC6 expression silencing. As shown in Fig. 4B and C, shTRPC1 and shTRPC6 reduced significantly the amount of TRPC1 and TRPC6, respectively, detected in HEK293 cells as compared to controls. Western blotting with anti-actin

Table 1
Effect of M β CD on the activation and maintenance of TG-induced Mn $^{2+}$ entry.

Treatment	Slope	
	Activation	Maintenance
Control	-0.0035 \pm 0.0004	-0.0026 \pm 0.0003
TG	-0.0325 \pm 0.0025	-0.0278 \pm 0.0031
M β CD	-0.0027 \pm 0.0002	-0.0028 \pm 0.0005
M β CD + TG	-0.0229 \pm 0.0015*	-0.0296 \pm 0.0033

HEK293 cells were loaded with fura-2 and resuspended in a medium containing 1 mM Ca $^{2+}$ as described in Materials and methods. Fura-2 fluorescence was measured at an excitation wavelength of 360 nm, the isoemissive wavelength. Activation: Cells were pretreated with 10 mM M β CD or the vehicle for 30 min at 37 °C. At the time of experiment 1.2 mM EGTA was added followed by 2 mM MnCl $_2$ and then cells were stimulated with TG (1 μ M; TG and M β CD + TG) or the vehicle (Control and M β CD). Maintenance: At the time of experiment 1.2 mM EGTA was added and then cells were stimulated with TG (1 μ M; TG and M β CD + TG) or the vehicle (Control and M β CD). Three minutes later 10 mM M β CD or the vehicle was added and 30 min later 2 mM MnCl $_2$ was added to monitor Mn $^{2+}$ entry, following the protocol described in the legend to Fig. 1. The slopes were calculated as described under Materials and methods (n = 6). *p < 0.05 compared to TG-treated cells in the absence of M β CD.

antibody revealed a similar amount of protein in all lanes (Fig. 4B and C, bottom panels). We have found that shTRPC1 and shTRPC6 reduce TG-induced Ca $^{2+}$ entry by 38 \pm 5% and 16 \pm 4% of control, respectively (Fig. 4A; p < 0.05; n = 4). A combination of shTRPC1 and shTRPC6 reduced TG-evoked Ca $^{2+}$ influx by 46 \pm 7% (Fig. 4A; p < 0.05; n = 4). As shown in Fig. 4A, shTRPC1 and shTRPC6 did not alter TG-induced Ca $^{2+}$

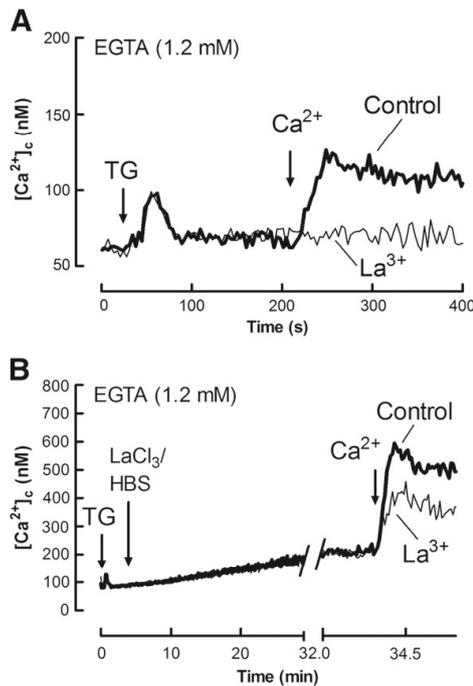


Fig. 2. Effect of lanthanum on the activation and maintenance of TG-induced Ca $^{2+}$ entry in HEK293 cells. (A) Fura-2-loaded cells were preincubated for 30 min at 37 °C in the presence of 100 μ M LaCl $_3$ or the vehicle (HBS; Control) following the protocol described in the legend to Fig. 1. At the time of experiment, 1.2 mM EGTA was added. Cells were then stimulated with 1 μ M TG, and 180 s later 2 mM CaCl $_2$ was added to the medium. (B) Fura-2-loaded cells were suspended in a Ca $^{2+}$ -free medium (1.2 mM EGTA was added) and were then stimulated with 1 μ M TG. Three minutes later 100 μ M LaCl $_3$ or the vehicle was added as indicated. CaCl $_2$ (final concentration 2 mM) was added to the medium 30 min after La $^{3+}$ to initiate Ca $^{2+}$ entry. Traces shown are representative of six independent experiments.

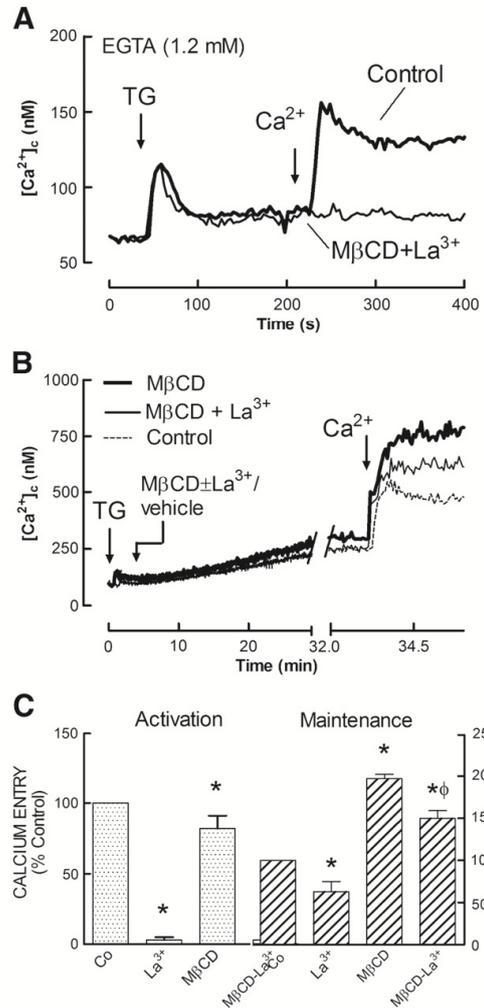


Fig. 3. Role of lipid rafts in the activation and maintenance of TG-induced Ca $^{2+}$ entry in HEK293 cells. (A) Fura-2-loaded cells were preincubated for 30 min at 37 °C in the presence of 100 μ M LaCl $_3$ and 10 mM M β CD or the vehicles (Control) following the protocol described in the legend to Fig. 1. At the time of experiment, 1.2 mM EGTA was added. Cells were then stimulated with 1 μ M TG, and 180 s later 2 mM CaCl $_2$ was added to the medium. (B) Fura-2-loaded cells were suspended in a Ca $^{2+}$ -free medium (1.2 mM EGTA was added) and were then stimulated with 1 μ M TG. Three minutes later 100 μ M LaCl $_3$ in combination with 10 mM M β CD or the vehicles were added as indicated. CaCl $_2$ (final concentration 2 mM) was added to the medium 30 min after La $^{3+}$ + M β CD to initiate Ca $^{2+}$ entry. Traces shown are representative of six independent experiments. (C) Histograms summarizing the percentage of Ca $^{2+}$ entry in the presence of M β CD, La $^{3+}$ or both relative to their control (vehicle was added). Ca $^{2+}$ entry was determined as described in Materials and methods. Left panel shows the effect of preincubation with M β CD and/or La $^{3+}$ prior TG stimulation on the activation of Ca $^{2+}$ entry. Right panel shows the effect of addition of M β CD and/or La $^{3+}$ to cells that had been stimulated with TG, on the maintenance of Ca $^{2+}$ entry. Values are means \pm SEM; * indicates differences compared with TG-treated cells in the absence of M β CD and La $^{3+}$. ° indicates differences compared with TG-treated cells in the presence of M β CD alone.

release from the intracellular stores, which indicates that this treatment did not alter either the ability to accumulate Ca $^{2+}$ in the stores or the Ca $^{2+}$ leakage rate in these cells.

We have further explored the effect of M β CD and/or La $^{3+}$ on Ca $^{2+}$ entry in TG-stimulated cells treated with shTRPC1 and shTRPC6 following the protocol depicted in Figs. 1B–3B. As shown in Table 2,

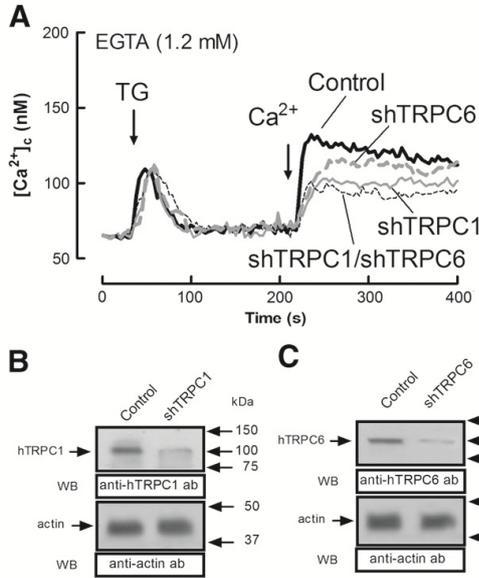


Fig. 4. Role of TRPC1 and TRPC6 in TG-induced Ca^{2+} entry. (A) HEK293 cells were transfected with shTRPC1, shTRPC6, both or control vector (black traces) and used after 48 h for Ca^{2+} measurements. Cells were loaded with fura-2 and stimulated with $1 \mu\text{M}$ TG, in a Ca^{2+} -free medium (1.2 mM EGTA was added), followed by addition of CaCl_2 (final concentration 2 mM) to initiate Ca^{2+} entry. Traces are representative of four independent experiments. (B and C) HEK293 cells were transfected with shTRPC1, shTRPC6 or control vector, as indicated, and used after 48 h for protein detection. Western blotting showing the expression levels of TRPC1 (B) or TRPC6 (C), which was significantly reduced in lysates from cells transfected with shTRPC1 or shTRPC6, respectively. Bottom panel: Western blotting with anti-G actin antibody for protein loading control.

both shTRPC1 and shTRPC6 significantly reduced the Ca^{2+} entry evoked by TG ($p < 0.05$; $n = 3-4$). shTRPC1 did not alter the La^{3+} -insensitive component of Ca^{2+} entry, while shTRPC6 attenuated this component, thus suggesting that TRPC6, but not TRPC1, is involved in non-capacitative Ca^{2+} entry in these cells (Table 2, $p < 0.05$; $n = 3-4$). Interestingly, in the presence of M β CD, shTRPC1 significantly reduced TG-evoked Ca^{2+} entry in the absence but not in the presence of La^{3+} , which suggests that TRPC1 is involved solely in SOCE even after lipid raft

Table 2
Role of TRPC1 and TRPC6 on the maintenance of TG-induced Ca^{2+} entry.

Treatment	Integral (nM·s)	Treatment	Integral (nM·s)
Control	15,623 ± 785	Control	14,923 ± 619
shTRPC1	12,185 ± 691*	shTRPC6	11,322 ± 544*
M β CD	24,110 ± 785*	M β CD	25,041 ± 885*
shTRPC1: M β CD	20,973 ± 705*†	shTRPC6: M β CD	14,009 ± 515†
La^{3+}	9845 ± 771*	La^{3+}	10,178 ± 585*
shTRPC1: La^{3+}	9789 ± 685*	shTRPC6: La^{3+}	6833 ± 321*†
M β CD + La^{3+}	19,058 ± 744*	M β CD + La^{3+}	18,551 ± 618*
shTRPC1: M β CD + La^{3+}	18,145 ± 518*	shTRPC6: M β CD + La^{3+}	8925 ± 402*†

HEK293 cells were transfected with shTRPC1, shTRPC6, as indicated, or control vector and used after 48 h for Ca^{2+} measurements. Fura-2-loaded cells were suspended in a Ca^{2+} -free medium (1.2 mM EGTA was added) and were then stimulated with $1 \mu\text{M}$ TG. Three minutes later $100 \mu\text{M}$ LaCl_3 , 10 mM M β CD, both or the vehicles were added following the protocol described in the legend to Fig. 3. CaCl_2 (final concentration 2 mM) was added to the medium 30 min after La^{3+} and/or M β CD to initiate Ca^{2+} entry. Ca^{2+} entry was estimated using the integral of the rise in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ for 150 s after addition of CaCl_2 and corrected by subtraction of the $[\text{Ca}^{2+}]_c$ elevation due to leakage of the indicator ($n = 3-4$).

* $P < 0.05$ compared to TG-treated cells in the absence of La^{3+} and M β CD.

† $P < 0.05$ compared to cells transfected with control vector.

disruption. In contrast, in the presence of M β CD, shTRPC6 significantly reduced TG-evoked Ca^{2+} entry in the absence and presence of La^{3+} . The contribution of TRPC6 to the La^{3+} -insensitive component was found to be greater in the presence of M β CD than in its absence (shTRPC6 reduced La^{3+} -insensitive Ca^{2+} entry by 33% and 52% in the absence and presence of M β CD, respectively; Table 2). These findings suggest that M β CD enhances the La^{3+} -insensitive component of Ca^{2+} entry by recruiting further TRPC6 channel units in the non-capacitative Ca^{2+} entry pathway (Table 2, $p < 0.05$; $n = 4$). To confirm this possibility we have investigated the effect of M β CD on OAG-stimulated Ca^{2+} entry. OAG is a diacylglycerol analogue that induces non-capacitative Ca^{2+} entry [43]. As shown in Fig. 5, M β CD enhanced OAG-induced Ca^{2+} entry by 27%. This effect was abolished by shTRPC6 treatment, which reduced OAG-mediated Ca^{2+} entry per se by 34% in agreement with previous studies reporting a role of TRPC6 in non-capacitative Ca^{2+} entry [43,44]. These findings indicate that M β CD-enhanced non-capacitative Ca^{2+} entry was mediated by TRPC6.

3.5. Effect of M β CD on TG-induced activation and maintenance of the association of Orai1 with STIM1, TRPC1 and TRPC6 in HEK293 cells

We have investigated the association between the plasma membrane (PM) protein Orai1 and the ER Ca^{2+} sensor STIM1 or the Ca^{2+} channel subunits TRPC1 and TRPC6 by looking for co-immunoprecipitation from cell lysates. Immunoprecipitation and subsequent SDS-PAGE and Western blotting were conducted using resting cells and cells treated with TG, in a Ca^{2+} -free medium, to induce passive depletion of the intracellular Ca^{2+} stores. As depicted in Fig. 6, upper panels, our results show detectable association between Orai1 and either STIM1 (Fig. 6A), TRPC1 (Fig. 6B) and TRPC6 (Fig. 6C) in resting HEK293 cells. Co-immunoprecipitation between Orai1 and STIM1, TRPC1 and TRPC6 was significantly enhanced by treatment for 180 s with TG by 301, 142 and 291% of control, respectively (Fig. 6, upper panels and histograms; $p < 0.05$; $n = 6$). Western blotting with anti-Orai1 antibody confirmed a similar content of this protein in all lanes (Fig. 6, middle panels).

In order to investigate the role of lipid rafts on the activation of the interaction between Orai1 and the mentioned proteins we have tested the effect of treatment with M β CD prior stimulation with TG in a Ca^{2+} -free medium. As shown in Fig. 6, pretreatment for 30 min at 37°C with 10 mM M β CD reduced TG-evoked enhanced co-immunoprecipitation between Orai1 and STIM1, TRPC1 and TRPC6 stimulated by TG to 156, 122 and 145%, respectively, without having any significant effect in the association between these proteins in resting HEK293 cells. These findings suggest that the association between Orai1 and the proteins STIM1, TRPC1

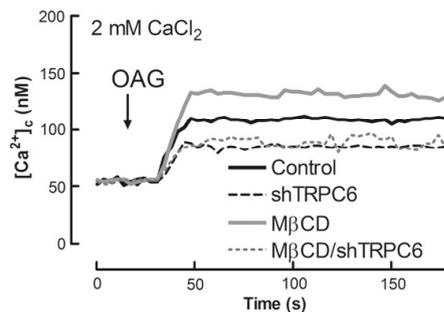


Fig. 5. Role of TRPC6 in OAG-induced Ca^{2+} entry. HEK293 cells were transfected with shTRPC6 or control vector and used after 48 h for Ca^{2+} measurements. Fura-2-loaded cells were preincubated for 30 min at 37°C in the presence of 10 mM M β CD or the vehicle (DMSO). At the time of experiment, 2 mM CaCl_2 was added. Cells were then stimulated with $100 \mu\text{M}$ OAG. Changes in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ were monitored as described in Materials and methods. Traces are representative of four separate experiments.

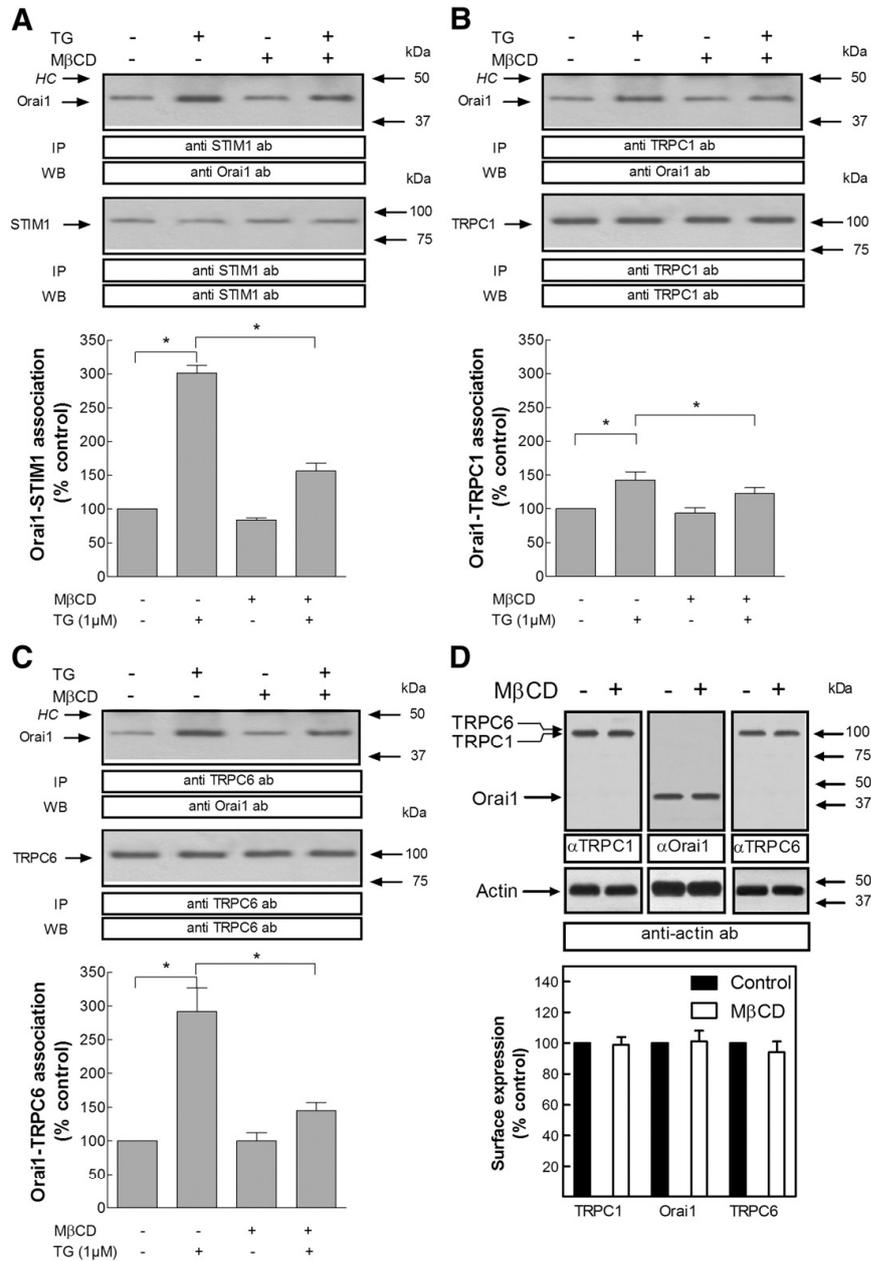


Fig. 6. Effect of MβCD on TG-induced activation of the association of Orai1 with STIM1, TRPC1 and TRPC6 in HEK293 cells. HEK cells were preincubated for 30 min with 10 mM MβCD or the vehicle (DMSO) in a medium containing 1 mM Ca²⁺. At the time of experiment, 1.2 mM EGTA was added. Cells were then stimulated with TG (1 μM) for 180 s or left untreated and lysed. Whole cell lysates were immunoprecipitated (IP) with anti-STIM1 (A), anti-TRPC1 (B) or anti-TRPC6 (C) antibody and immunoprecipitates were subjected to 10% SDS-PAGE and subsequent Western blotting with a specific anti-Orai1 antibody. Membranes were reprobbed with the antibody used for immunoprecipitation for protein loading control. The panel shows results from one experiment representative of 5 others. Molecular masses indicated on the right were determined using molecular mass markers run in the same gel. Histograms represent the quantification of the association of Orai1 with STIM1, TRPC1 and TRPC6 under different experimental conditions. Results are expressed as mean ± SEM and presented as percentage of control (non-stimulated cells not treated with MβCD). *p < 0.05. HC, heavy chain of the immunoglobulin used for immunoprecipitation. (D) HEK cells were preincubated for 30 min with 10 mM MβCD or the vehicle (DMSO) in a medium containing 1 mM Ca²⁺. Before cell stimulation 1.2 mM EGTA was added. Cells were then stimulated with TG (1 μM), stimulation was terminated after 180 s in ice-cold Söercken's buffer, and cell surface proteins were labeled by biotinylation, as described under Materials and methods. Labeled proteins were extracted with streptavidin-coated agarose beads and analyzed by SDS-PAGE and Western blotting (WB) using the anti-TRPC1, anti-Orai1 or anti-TRPC6 antibody. Western blotting of the samples using anti-actin antibody was performed for sample protein controls. Positions of molecular mass markers are shown on the right. Histograms indicate quantification of cell surface proteins. Values are mean ± SEM of four independent experiments.

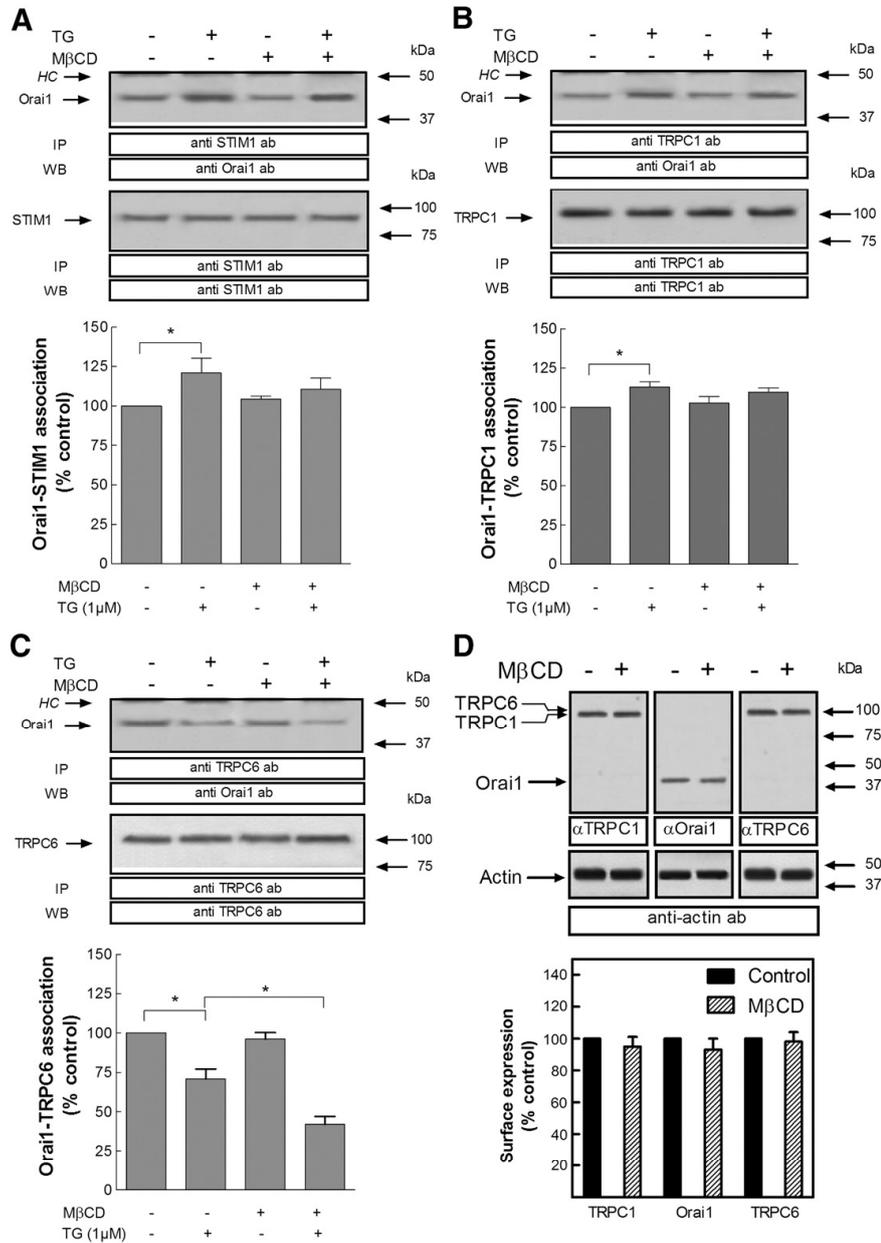


Fig. 7. Effect of MβCD on the maintenance of the association of Orai1 with STIM1, TRPC1 and TRPC6 induced by TG in HEK293 cells. HEK cells were stimulated with TG (1 μM) in a Ca²⁺-free medium (1.2 mM EGTA was added). Three minutes later cells were treated with 10 mM MβCD or the vehicle (DMSO) for a further 30 min and lysed. Whole cell lysates were immunoprecipitated (IP) with anti-STIM1 (A), anti-TRPC1 (B) or anti-TRPC6 (C) antibody and immunoprecipitates were subjected to 10% SDS-PAGE and subsequent Western blotting with a specific anti-Orai1 antibody. Membranes were reprobbed with the antibody used for immunoprecipitation for protein loading control. The panel shows results from one experiment representative of 5 others. Molecular masses indicated on the right were determined using molecular mass markers run in the same gel. Histograms represent the quantification of the association of Orai1 with STIM1, TRPC1 and TRPC6 under different experimental conditions. Results are expressed as mean ± SEM and presented as percentage of control (non-stimulated cells not treated with MβCD). **p* < 0.05. HC, heavy chain of the immunoglobulin used for immunoprecipitation. (D) HEK cells were stimulated with TG (1 μM) in a Ca²⁺-free medium (1.2 mM EGTA was added). Three minutes later cells were treated with 10 mM MβCD or the vehicle (DMSO) for a further 30 min and stimulation was terminated in ice-cold 500 μM streptozocin buffer, and cell surface proteins were labeled by biotinylation, as described under Materials and methods. Labeled proteins were extracted with streptavidin-coated agarose beads and analyzed by SDS-PAGE and Western blotting (WB) using the anti-TRPC1, anti-Orai1 or anti-TRPC6 antibody. Western blotting of the samples using anti-actin antibody was performed for sample protein controls. Positions of molecular mass markers are shown on the right. Histograms indicate quantification of cell surface proteins. Values are mean ± SEM of four independent experiments.

and TRPC6 stimulated by short treatment with TG requires the integrity of the lipid raft domains.

We have further investigated whether the changes in Ca^{2+} entry or the association between Ca^{2+} channel proteins might be attributed to changes in surface expression of these proteins. As shown in Fig. 6D, analysis of biotinylated proteins shows that treatment with M β CD did not modify surface expression of TRPC1, Orai1 or TRPC6.

Next, we have explored the co-immunoprecipitation between Orai1 and either STIM1 or the TRPC proteins TRPC1 and TRPC6 upon prolonged stimulation with TG (30 min treatment in a Ca^{2+} -free medium) to investigate the maintenance of the association between these proteins. As shown in Fig. 7, Western blotting with anti-STIM1, anti-TRPC1 or anti-TRPC6 antibody of anti-Orai1 immunoprecipitates revealed association of Orai1 with STIM1, TRPC1 and TRPC6 in resting cells. Treatment with TG (1 μM) for 30 min resulted in a small but significant increase in the association between Orai1 and both STIM1 and TRPC1 (after 30 min treatment with TG the association between Orai1 and STIM1 or TRPC1 was 121 and 113% of control, respectively; Fig. 7A and B; upper panels and histograms; $p < 0.05$; $n = 6$). Interestingly, co-immunoprecipitation between Orai1 and TRPC6 was significantly reduced after treatment for 30 min with TG to 71% of control (Fig. 7C; upper panel and histograms; $p < 0.05$; $n = 6$). To investigate the relevance of lipid raft domains on the maintenance of the interaction between Orai1 and the mentioned proteins we have tested the effect of treatment with M β CD on HEK293 cells that had been stimulated with TG. As shown in Fig. 7, addition of 10 mM M β CD, 180 s after stimulation with TG, for a further 30 min did not significantly reduce TG-evoked co-immunoprecipitation between Orai1 and STIM1 or TRPC1 (co-immunoprecipitation between Orai1 and STIM1 or TRPC1 was 110 and 109% of control, respectively), but further decreased co-immunoprecipitation between Orai1 and TRPC6 stimulated by this agent to 42% of control. M β CD had no significant effect in the association between these proteins in resting HEK293 cells. As shown in Fig. 7D, treatment with M β CD did not modify surface expression of TRPC1, Orai1 or TRPC6, thus suggesting that the changes observed are not due to changes in the membrane location of these proteins.

4. Discussion

A number of studies have revealed that lipid raft domains are important for the activation of a number of cellular functions, including cell adhesion and migration, apoptosis, organization of the cytoskeleton, exocytosis and endocytosis [45,46]. These cellular events are dependent on rises in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ and lipid rafts have been shown to regulate the mechanism of activation of SOCE [47].

We have recently reported that activation and maintenance of SOCE are differentially regulated in different cell types. For instance, the activation of SOCE is sensitive to the actin cytoskeleton stabilizer jasplakinolide, while the maintenance of Ca^{2+} entry is insensitive to actin network stabilization both in human platelets and mouse pancreatic acinar cells [3,39]. Interestingly, we now report for the first time that cholesterol sequestration in cells that had been pretreated with TG enhances TG-evoked Ca^{2+} influx.

Lipid rafts are plasma membrane domains, resistant to mild detergents, rich in cholesterol and sphingolipids, that organize the assembly of signalling molecules [48]. As previously demonstrated [26] M β CD is a cholesterol-reducing agent that selectively reduces lipid raft stability and is the most widely used mean to test the role of lipid rafts. Since M β CD does not affect other lipid raft constituents, experimental evidence suggests that, although M β CD significantly impair lipid rafts, it does not remove them completely. Keeping this limitation in mind, we have investigated the role of lipid rafts in the activation and maintenance of Ca^{2+} entry by addition of M β CD either before (for the activation) or after TG stimulation (to investigate the maintenance of SOCE), respectively. Since incuba-

tion with M β CD was maintained for 30 min, in order to be consistent with the treatment with M β CD we necessarily explored the activation and maintenance of TG-evoked Ca^{2+} entry at different times after TG addition, i.e. 180 s after TG when cells were preincubated with M β CD prior TG (for the study of the activation process) and 30 min after TG when cells were treated with M β CD after TG (for the study of the maintenance). We have investigated the sensitivity of Ca^{2+} entry to the SOCE blocker La^{3+} at these time periods and found that while Ca^{2+} entry after 180 s stimulation with TG is entirely sensitive to La^{3+} , the influx of Ca^{2+} after 30 min of treatment with TG was partially insensitive to trivalent cations. The La^{3+} -insensitive TG-stimulated Ca^{2+} entry might be attributed to the activation of cation currents through Ca^{2+} -dependent channels or transporters, such as the reported reverse $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange activation secondary to store depletion [25]. We have found that shTRPC6 reduces the La^{3+} -insensitive component in these cells. A major finding of this study is that the increase in Ca^{2+} entry by addition of M β CD to TG-treated cells is mostly due to enhancement of the La^{3+} -insensitive component, without altering SOCE (see Fig. 3C), thus suggesting that lipid rafts are not required for the maintenance of SOCE once it has been activated but enhances non-capacitative Ca^{2+} entry stimulated by 30 min treatment with TG, an effect that might be attributed to the recruitment of further TRPC6 units to the non-capacitative Ca^{2+} entry mechanism as demonstrated using shRNAs. Our results indicate that TRPC1 proteins support both the activation and maintenance of SOCE stimulated by TG and do not participate in non-capacitative Ca^{2+} entry upon lipid rafts disruption in these cells. In support of the lack of effect of M β CD on the maintenance of SOCE we have found that incubation for 30 min with this agent after cell treatment with TG had a negligible effect, if any, on the maintenance of Mn^{2+} entry. We assume that all Mn^{2+} enters only through the store-operated pathway. The use of Mn^{2+} to explore store-operated cation entry is widely accepted [49]. Mn^{2+} avoids interferences in the study of store-operated cation entry arising from the stimulation of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase, since Mn^{2+} is transported by this pump with lower affinity than Ca^{2+} [50,51], is a known inhibitor of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger [52] and the permeability for Mn^{2+} of non-capacitative Ca^{2+} -selective channels, such as TRPV6, is significantly smaller than for Ca^{2+} [53].

Lipid raft domains have been reported to provide an adequate environment for the interaction of different SOCE-associated proteins, including STIM1, Orai1 and TRPC proteins [27,28,47], although the role of lipid rafts in the activation of SOCE and the association of STIM1 and Orai1 with lipid rafts has been recently challenged by a recent report suggesting that I_{CRAC} is not dependent on lipid raft domains [54]. Our results indicate that lipid rafts play a relevant role in the activation but not the maintenance of the association of Orai1 with the ER Ca^{2+} sensor STIM1 and the channel subunit TRPC1 stimulated by TG. We noticed that TG-evoked association between these proteins was transient and 30 min after TG addition the interaction between these proteins was close to the resting level. Interestingly, we found that TG promotes and initial association between Orai1 and TRPC6 but prolonged stimulation with TG results in dissociation of these proteins. We have recently reported that TRPC6 participates both in SOCE and non-capacitative Ca^{2+} entry through its interaction with the Orai1-STIM1 complex or hTRPC3 respectively [22]. Although we have not investigated the association of TRPC6 with TRPC3 in this study, dissociation of TRPC6 from Orai1 might underlie the activation of non-capacitative Ca^{2+} entry. This would provide an explanation to the effects of M β CD both enhancing non-capacitative Ca^{2+} entry and reducing co-immunoprecipitation of Orai1 with TRPC6.

In conclusion, our results indicate that lipid rafts play an important role in TG-induced divalent cation entry, which is likely mediated by a role of lipid rafts in the association between Orai1, the ER Ca^{2+} sensor STIM1 and the channel subunits TRPC1 and TRPC6. Lipid rafts disruption before the activation of SOCE results in attenuation of

store-operated association between these proteins and cation entry; however, when disruption of lipid rafts occurs after store depletion the association of Orai1 with STIM1 or TRPC1 was not significantly reduced, as well as Mn^{2+} entry, but dissociation between Orai1 and TRPC6 was clearly enhanced, thus explaining the increased non-capacitative Ca^{2+} entry.

Acknowledgements

Supported by MEC grant BFU2007-60104. G.E.W. hold a visit grant from Junta de Extremadura-FEDER (GRU090). C.G. and N.D. are supported by Spanish Ministry of Science and Innovation (PTA2008-0870-P) and Junta de Extremadura (PRE09020), respectively. We are grateful to Dr. Indu Ambudkar for generously providing plasmids.

References

- [1] J.W. Putney Jr., A model for receptor-regulated calcium entry, *Cell Calcium* 7 (1986) 1–12.
- [2] B. Wedel, R.R. Boyles, J.W. Putney Jr., G.S. Bird, Role of the store-operated calcium entry proteins Stim1 and Orai1 in muscarinic cholinergic receptor-stimulated calcium oscillations in human embryonic kidney cells, *J. Physiol.* 579 (2007) 679–689.
- [3] P.C. Redondo, A.I. Lajas, G.M. Salido, A. Gonzalez, J.A. Rosado, J.A. Pariente, Evidence for secretion-like coupling involving pp60src in the activation and maintenance of store-mediated Ca^{2+} entry in mouse pancreatic acinar cells, *Biochem. J.* 370 (2003) 255–263.
- [4] J. Ijou, M.L. Kim, W.D. Heo, J.T. Jones, J.W. Myers, J.E. Ferrell Jr., T. Meyer, STIM is a Ca^{2+} sensor essential for Ca^{2+} -store-depletion-triggered Ca^{2+} influx, *Curr. Biol.* 15 (2005) 1235–1241.
- [5] J. Roos, 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.
- [6] 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.
- [7] M.A. Spassova, J. Soboloff, L.P. He, W. Xu, M.A. Dziadek, D.L. Gill, STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca^{2+} channels, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006) 4040–4045.
- [8] S. Feske, Y. Gwack, M. Prakriya, S. Srikanth, S.H. Puppel, B. Tanasa, P.G. Hogan, R.S. Lewis, M. Daly, A. Rao, A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function, *Nature* 441 (2006) 179–185.
- [9] G.N. Huang, W. Zeng, J.Y. Kim, J.P. Yuan, L. Han, S. Muallem, P.F. Worley, STIM1 carboxyl terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels, *Nat. Cell Biol.* 8 (2006) 1003–1010.
- [10] J.C. Mercer, W.L. Dehaven, J.T. Smyth, B. Wedel, R.R. Boyles, G.S. Bird, J.W. Putney Jr., Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 24979–24990.
- [11] 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.
- [12] M. Vig, A. Beck, J.M. Billingsley, A. Lis, S. Parvez, C. Peinelt, D.L. Koormo, J. Soboloff, D.L. Gill, A. Fleig, J.P. Kinet, R. Penner, CRACM1 multimers form the ion-selective pore of the CRAC channel, *Curr. Biol.* 16 (2006) 2073–2079.
- [13] Y. Maruyama, T. Ogura, K. Mio, K. Kato, T. Kaneko, S. Kiyonaka, Y. Mori, C. Sato, Tetrameric Orai1 is a teardrop-shaped molecule with a long, tapered cytoplasmic domain, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 13676–13685.
- [14] X. Liu, B.B. Singh, I.S. Ambudkar, TRPC1 is required for functional store-operated Ca^{2+} channels. Role of acidic amino acid residues in the S5-S6 region, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 11337–11343.
- [15] J. Soboloff, M. Spassova, W. Xu, L.P. He, N. Cuesta, D.L. Gill, Role of endogenous TRPC6 channels in Ca^{2+} signal generation in A7r5 smooth muscle cells, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 39786–39794.
- [16] S. Thebaud, A. Zholos, A. Enfissi, C. Slomianny, E. Dewailly, M. Roudbaraki, J. Parys, N. Prevarskaya, Receptor-operated Ca^{2+} entry mediated by TRPC3/TRPC6 proteins in rat prostate smooth muscle (PS1) cell line, *J. Cell. Physiol.* 204 (2005) 320–328.
- [17] I.S. Ambudkar, H.L. Ong, X. Liu, B. Bandyopadhyay, K.T. Cheng, TRPC1: the link between functionally distinct store-operated calcium channels, *Cell Calcium* 42 (2007) 213–223.
- [18] 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.
- [19] G.M. Salido, S.O. Sage, J.A. Rosado, TRPC channels and store-operated Ca^{2+} entry, *Biochim. Biophys. Acta* 1793 (2009) 223–230.
- [20] Y. Liao, C. Erdelben, J. Abramowitz, V. Flockerkzi, M.X. Zhu, D.L. Armstrong, L. Birnbaumer, Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM1-regulated heteromeric Orai1/TRPC model for SOCE/Icrac channels, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 (2008) 2895–2900.
- [21] Y. Liao, N.W. Plummer, M.D. George, J. Abramowitz, M.X. Zhu, L. Birnbaumer, A role for Orai1 in TRPC-mediated Ca^{2+} entry suggests that a TRPC:Orai complex may mediate store and receptor operated Ca^{2+} entry, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106 (2009) 3202–3206.
- [22] I. Jardin, J.J. Lopez, 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.
- [23] J.J. Lopez, C. Camello-Almaraz, J.A. Pariente, G.M. Salido, J.A. Rosado, Ca^{2+} accumulation into acidic organelles mediated by Ca^{2+} - and vacuolar H^{+} -ATPases in human platelets, *Biochem. J.* 390 (2005) 243–252.
- [24] J.J. Lopez, P.C. Redondo, G.M. Salido, J.A. Pariente, J.A. Rosado, Two distinct Ca^{2+} compartments show differential sensitivity to thrombin, ADP and vasopressin in human platelets, *Cell. Signal.* 18 (2006) 373–381.
- [25] A.G. Harper, S.O. Sage, A key role for reverse Na^{+}/Ca^{2+} exchange influenced by the actin cytoskeleton in store-operated Ca^{2+} entry in human platelets: evidence against the de novo conformational coupling hypothesis, *Cell Calcium* 42 (2007) 606–617.
- [26] L. Vaca, SOCE: the store-operated calcium influx complex, *Cell Calcium* 47 (2010) 199–209.
- [27] 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.
- [28] B. Pant, H.L. Ong, X. Liu, K. Rausser, I.S. Ambudkar, B.B. Singh, Lipid rafts determine clustering of STIM1 in endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions and regulation of store-operated Ca^{2+} entry (SOCE), *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 17333–17340.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] H.L. Ong, K.T. Cheng, X. Liu, B.C. Bandyopadhyay, B.C. Paria, J. Soboloff, B. Pani, Y. Gwack, S. Srikanth, B.B. Singh, D.L. Gill, I.S. Ambudkar, Dynamic assembly of TRPC1-STIM1-Orai1 ternary complex is involved in store-operated calcium influx. Evidence for similarities in store-operated and calcium release-activated calcium channel components, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 9105–9116.
- [32] G.E. Woodard, G.M. Salido, J.A. Rosado, Enhanced exocytotic-like insertion of Orai1 into the plasma membrane upon intracellular Ca^{2+} store depletion, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 294 (2008) C1323–C1331.
- [33] P.C. Redondo, M.T. Harper, J.A. Rosado, S.O. Sage, A role for cofilin in the activation of store-operated calcium entry by de novo conformational coupling in human platelets, *Blood* 107 (2006) 973–979.
- [34] J.A. Rosado, J.J. Lopez, E. Gomez-Arteta, P.C. Redondo, G.M. Salido, J.A. Pariente, Early caspase-3 activation independent of apoptosis is required for cellular function, *J. Cell. Physiol.* 209 (2006) 142–152.
- [35] N. Ben-Amor, P.C. Redondo, A. Bartegi, J.A. Pariente, G.M. Salido, J.A. Rosado, A role for 5, 6-epoxyeicosatrienoic acid in calcium entry by de novo conformational coupling in human platelets, *J. Physiol.* 570 (2006) 309–323.
- [36] P. Danthi, M. Chow, Cholesterol removal by methyl-beta-cyclodextrin inhibits poliovirus entry, *J. Virol.* 78 (2004) 33–41.
- [37] H.T. Cheng, B.D. Megha, E. London, Preparation and properties of asymmetric vesicles that mimic cell membranes: effect upon lipid raft formation and transmembrane helix orientation, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 6079–6092.
- [38] P.H. Purdy, J.K. Graham, Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm, *Cryobiology* 48 (2004) 36–45.
- [39] J.A. Rosado, S. Jenner, S.O. Sage, 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 (2000) 7527–7533.
- [40] J.A. Rosado, S.O. Sage, Farnesylcysteine analogues inhibit store-regulated Ca^{2+} entry in human platelets: evidence for involvement of small GTP-binding proteins and actin cytoskeleton, *Biochem. J.* 347 (Pt 1) (2000) 183–192.
- [41] A.G. Harper, M.J. Mason, S.O. Sage, A key role for dense granule secretion in potentiation of the Ca^{2+} signal arising from store-operated calcium entry in human platelets, *Cell Calcium* 45 (2009) 413–420.
- [42] W. Wang, L.A. Shimoda, J.T. Sylvester, Capacitative calcium entry and TRPC channel proteins are expressed in rat distal pulmonary arterial smooth muscle, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 286 (2004) 848–858.
- [43] 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.
- [44] 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.
- [45] K. Simons, D. Toomre, Lipid rafts and signal transduction, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1 (2000) 31–39.
- [46] B. Pani, B.B. Singh, Lipid rafts/caveolae as microdomains of calcium signaling, *Cell Calcium* 45 (2009) 625–633.
- [47] A. Sampieri, A. Zepeda, C. Saldaña, A. Salgado, L. Vaca, STIM1 converts TRPC1 from a receptor-operated to a store-operated channel: moving TRPC1 in and out of lipid rafts, *Cell Calcium* 44 (2008) 479–491.
- [48] E.E. Prieschl, T. Baumrucker, Sphingolipids: second messengers, mediators and raft constituents in signaling, *Immunol. Today* 21 (2000) 555–560.
- [49] A.B. Parekh, J.W. Putney Jr., Store-operated calcium channels, *Physiol. Rev.* 85 (2005) 757–810.
- [50] T.J. Rink, S.O. Sage, Calcium signaling in human platelets, *Annu. Rev. Physiol.* 52 (1990) 431–449.

- [51] E. Graf, A.K. Verma, J.P. Gorski, G. Lopaschuk, V. Niggli, M. Zurini, E. Carafoli, J.T. Penniston, Molecular properties of calcium-pumping ATPase from human erythrocytes, *Biochemistry* 21 (1982) 4511–4516.
- [52] M.P. Blaustein, E.M. Santiago, Effects of internal and external cations and of ATP on sodium-calcium and calcium-calcium exchange in squid axons, *Biophys. J.* 20 (1977) 79–111.
- [53] R. Vennekens, J.G. Hoenderop, J. Prener, M. Staiver, P.H. Willems, G. Droogmans, B. Nilius, R.J. Bindels, Permeation and gating properties of the novel epithelial Ca^{2+} channel, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 3963–3969.
- [54] W.I. DeHaven, B.F. Jones, J.G. Petranks, J.T. Smyth, T. Tomita, G.S. Bird, J.W. Putney Jr., TRPC channels function independently of STIM1 and Orai1, *J. Physiol.* 587 (2009) 2275–2298.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

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

Lipid rafts are essential for the regulation of SOCE by plasma membrane resident STIM1 in human platelets

Natalia Dionisio¹, Carmen Galán¹, Isaac Jardín, Ginés M. Salido, Juan. A. Rosado^{*}

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 October 2010

Received in revised form 26 December 2010

Accepted 10 January 2011

Available online 19 January 2011

Keywords:

STIM1

Orai1

Lipid raft

Platelet

Methyl- β -cyclodextrin

Calcium

ABSTRACT

STIM1 is a transmembrane protein essential for the activation of store-operated Ca^{2+} entry (SOCE), a major Ca^{2+} influx mechanism. STIM1 is either located in the endoplasmic reticulum, communicating the Ca^{2+} concentration in the stores to plasma membrane channels or in the plasma membrane, where it might sense the extracellular Ca^{2+} concentration. Plasma membrane-located STIM1 has been reported to mediate the SOCE sensitivity to extracellular Ca^{2+} through its interaction with Orai1. Here we show that plasma membrane lipid raft domains are essential for the regulation of SOCE by extracellular Ca^{2+} . Treatment of platelets with the SERCA inhibitor thapsigargin (TG) induced Mn^{2+} entry, which was inhibited by increasing concentrations of extracellular Ca^{2+} . Platelet treatment with methyl- β -cyclodextrin, which removes cholesterol and disrupts the lipid raft domains, impaired the inactivation of Ca^{2+} entry induced by extracellular Ca^{2+} . Methyl- β -cyclodextrin also abolished translocation of STIM1 to the plasma membrane stimulated by treatment with TG and prevented TG-evoked co-immunoprecipitation between plasma membrane-located STIM1 and the Ca^{2+} permeable channel Orai1. These findings suggest that lipid raft domains are essential for the inactivation of SOCE by extracellular Ca^{2+} mediated by the interaction between plasma membrane-located STIM1 and Orai1.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) is a major mechanism for Ca^{2+} influx that regulates a number of critical cell functions. SOCE is regulated by the filling state of the intracellular Ca^{2+} stores, although the precise mechanism regulating its activation/deactivation is not fully understood. There is a large body of evidence supporting that the stromal interaction molecule 1 (STIM1), a transmembrane protein located in the Ca^{2+} stores, acts as the intraluminal Ca^{2+} sensor [1,2] that communicates the amount of stored Ca^{2+} to plasma membrane (PM) channels, including Orai, especially Orai1 protein [3,4], and TRP family members [5–7]. STIM1 has a single transmembrane region with a N-terminal EF-hand Ca^{2+} binding domain that is located in the lumen of the ER. Ca^{2+} store discharge has been reported to induce rapid translocation of STIM1 from a diffuse location in the ER membrane into puncta that accumulated near the PM store-operated channels [8].

In addition to its placement in the ER, STIM1 has been found to be located in the PM in different cell types [9–11]. This is the case of human platelets, where STIM1 has been reported to migrate from ER sites to the PM upon depletion of the Ca^{2+} store [12], although the PM-resident pool remains as a minor fraction of the cellular STIM1

(Jardín I, personal communication). The role of the PM-spanning STIM1 is rather unknown; however, the Ca^{2+} binding EF-hand domain of PM-resident STIM1 faces the extracellular medium, thus suggesting that, as for the ER, STIM1 might play a role sensing the extracellular Ca^{2+} concentration. In human platelets, we have recently reported that PM-located STIM1 plays an essential role in the mechanism of inactivation of SOCE by extracellular Ca^{2+} [13]. According to this, store-operated divalent cation entry is reduced by extracellular Ca^{2+} in a concentration-dependent manner [13], probably as a mechanism to protect the cell against Ca^{2+} overload, which might lead to the development of apoptotic events [14–17]. In these cells, external application of an antibody that recognizes the EF-hand domain impairs the sensitivity of SOCE to the extracellular Ca^{2+} concentration, thus supporting a role for PM-resident STIM1 in SOCE regulation by extracellular Ca^{2+} , probably through its association with Orai1 [13].

Cell signaling complexes have been reported to associate to microdomains that facilitate the interaction between proteins of a signaling cascade. Lipid rafts are detergent-resistant PM microdomains, enriched in cholesterol and sphingolipids, which serve as platforms for the recruitment of signaling complexes. Lipid rafts have been reported to modulate SOCE in different manners, including clustering STIM1 in ER-PM junctions [18] or facilitating the association between STIM1 and TRPC1 [19]. In human platelets, lipid rafts recruit TRPC1, TRPC4 and TRPC5 in signaling complexes [20,21] and facilitate the association between STIM1, Orai1 and TRPC1 [22].

^{*} Corresponding author at: Department of Physiology, University of Extremadura, Cáceres, 10071, Spain. Tel.: +34 927257139; fax: +34 927257110.

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

¹ These authors contributed equally to this work.

Furthermore, we have recently demonstrated that lipid rafts are essential for the activation but not the maintenance of SOCE in HEK-293 cells. Disruption of lipid rafts by M β CD before store depletion results in attenuation of SOCE and the association between STIM1, Orai1, TRPC1 and TRPC6; in contrast, when lipid rafts were disrupted in cells with depleted stores, SOCE, as well as the association between STIM1, Orai1 and TRPC1 was unaltered, but the association between Orai1 and TRPC6 was attenuated, leading to the activation of a non-capacitative Ca²⁺ entry mechanism [23]. In the present study we have investigated the role of lipid rafts in the regulation of SOCE by extracellular Ca²⁺ through the association between PM-resident STIM1 and Orai1 in human platelets, which might shed new light on the molecular basis underlying SOCE.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Fura-2 acetoxymethyl ester (fura-2/AM) was from Molecular Probes (Leiden, the Netherlands). Apyrase (grade VII), aspirin, bovine serum albumin (BSA), methyl- β -cyclodextrin (M β CD), thapsigargin (TG), valinomycin, dimethyl BAPTA-AM and paraformaldehyde were from Sigma (Madrid, Spain). Anti STIM1 (25–139) antibody was from BD Transduction Laboratories (Franklin Lakes, NJ). Fluorescein-isothiocyanate (FITC)-conjugated donkey anti-mouse IgG antibody was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Cholesterol E test was from Wako Diagnostics (Richmon, VA). All other reagents were of analytical grade.

2.2. Platelet preparation

Platelets samples were prepared as described previously [24] in accordance with the Declaration of Helsinki. Briefly, blood was obtained from drug-free healthy 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 was then prepared by centrifugation for 5 min at 700 \times g and aspirin (100 μ M) and apyrase (40 μ g/ml) added. Platelets were collected by centrifugation at 350 \times g for 20 min and resuspended in HEPES-buffered saline (HBS) containing (in mM): 145 NaCl, 10 HEPES, 10 D-glucose, 5 KCl, 1 MgSO₄, pH 7.45 and supplemented with 0.1% w/v BSA and 40 μ g/ml apyrase.

2.3. Cell viability

Cell viability was assessed using calcein and trypan blue. For calcein loading, cells were incubated for 30 min with 5 μ M calcein-AM at 37 °C and centrifuged and the pellet was resuspended in fresh HBS. Fluorescence was recorded from 2 ml aliquots using a Cary Eclipse Spectrophotometer (Varian Ltd., Madrid, Spain). Samples were excited at 494 nm, and the resulting fluorescence was measured at 535 nm. The results obtained with calcein were confirmed using the trypan blue exclusion technique. Ninety-five percent of cells were viable in our platelet preparations, at least during the performance of the experiments.

2.4. Determination of Mn²⁺ entry

Mn²⁺ was used to monitor divalent cation entry. Mn²⁺ influx was monitored in 1 ml aliquots of magnetically stirred cellular suspension (2 \times 10⁸ cells/ml) at 37 °C using a Cary Eclipse Spectrophotometer (Varian Ltd., Madrid, Spain) as a quenching of fura-2 fluorescence at the isoemissive wavelength of 360 nm and presented on an arbitrary linear scale. As previously shown [13], fura-2 fluorescence upon excitation at 360 nm was Ca²⁺ insensitive in our platelet preparations. To compare the rate of decay (slope) of fura-2 fluorescence

when platelets were subjected to different experimental procedures traces were fitted to the equation $y = Ax + B$, where A is the slope and B is the fura-2 fluorescence at the initiation of the experiment.

2.5. Immunofluorescence

The amount of PM-STIM1 was determined in samples by immunofluorescence. Briefly, fixed platelets were washed in PBS to remove the fixative and incubated for 2 h with 1 μ g/ml anti-STIM1 (25–139) antibody. The platelets were then collected by centrifugation and washed twice in PBS. To detect the primary antibody, samples were incubated with 0.02 μ g/ml FITC-conjugated donkey anti-mouse IgG antibody for 1 h and washed twice in PBS. Fluorescence was measured using a spectrofluorimeter (Varian Ltd., Madrid, Spain). Samples were excited at 496 nm, and emission was at 595 nm.

2.6. Immunoprecipitation and Western blotting

The interaction between plasma membrane-located STIM1 and Orai1 were determined using a previously established procedure [25]. Briefly, cells were stimulated and fixed by incubation with 3% (w/v) paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) containing (in mM) 137 NaCl, 2.7 KCl, 5.62 Na₂HPO₄, 1.09 NaH₂PO₄, 1.47 KH₂PO₄, pH 7.2 and supplemented with 0.5% (w/v) BSA, on ice for 10 min. Fixed platelets were washed in PBS to remove the fixative, incubated for 1 h with anti-STIM1 (25–139) antibody and then washed again to remove the antibody. Cells were then lysed by incubation with RIPA buffer, pH 7.2, containing 474 mM NaCl, 30 mM Tris, 3 mM EGTA, 0.3 % SDS, 3% sodium deoxycholate, 3% triton X-100, 3 mM Na₃VO₄, 3 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 150 μ g/ml leupeptin and 15 mM benzamide. Anti-STIM1 (25–139) antibody-bound PM-STIM1 was immunoprecipitated by addition of 25 μ l of protein A-agarose overnight at 4 °C on a rocking platform. Immunoprecipitation of STIM1 from whole cell lysates was performed as described previously [6,26]. The immunoprecipitates were resolved by 10% SDS-PAGE and separated proteins were electrophoretically transferred onto nitrocellulose membranes for subsequent probing. Blots were incubated overnight with 10% (w/v) BSA in Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 (TBST) to block residual protein binding sites. Immunodetection of Orai1 and STIM1 was achieved using the anti-Orai1 antibody diluted 1:1000 in TBST for 2 h or the anti-STIM1 (25–139) antibody diluted 1:250 in TBST for 2 h. 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 horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit IgG antibody or horseradish peroxidase-conjugated ovine anti-mouse IgG antibody, respectively, diluted 1:10,000 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 a scanning densitometry and ImageJ software.

2.7. Measurement of cholesterol levels

Quantitative determination of total cholesterol was performed using a previously described procedure [23]. Platelets (10⁸ cells/200 μ l PBS) were lysed, and cholesterol was extracted from cell lysates by adding chloroform (400 μ l) and methanol (400 μ l) to the sonicated cell lysate (100 μ l). The bottom (chloroform) layer was collected and evaporated under vacuum, and cholesterol was dissolved in ethanol and assayed using the colorimetric assay Cholesterol E test, with absorbance determined at 600 nm in a spectrophotometer.

2.8. Cholesterol-loaded M β CD (CLCD) preparation

CLCD was prepared as described previously [27,28]. Briefly, 100 μ mol of M β CD were dissolved in 600 μ l of methanol and mixed

with 30.8 μmol of cholesterol. The mixture was dried by nitrogen followed by high vacuum for at least 1 h and then dispersed in 2 ml of PBS. The resulting solution was sonicated for 3 min, incubated in a shaker at 37 °C overnight and filtered with a 0.22- μm pore size syringe filter.

2.9. Statistical analysis

Analysis of statistical significance was performed using Student's unpaired *t*-test for parametric variables. For multiple comparisons, one-way analysis of variance (ANOVA) combined with the Dunnett tests was used. $p < 0.05$ was considered to be significant.

3. Results

3.1. Role of lipid rafts in TG-evoked Mn^{2+} entry in the presence of different extracellular concentrations of Ca^{2+}

We have recently described the effect of increasing concentrations of extracellular Ca^{2+} on store-operated divalent cation entry by measuring Mn^{2+} influx [13]. Mn^{2+} can be used as a surrogate for Ca^{2+} given its quenching effect on fura-2 fluorescence [29]. In addition, Mn^{2+} avoids complications arising from the activation of Ca^{2+} transport mechanisms, such as the PM Ca^{2+} -ATPase (PMCA) or the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, since Mn^{2+} is transported by PMCA with lower affinity than Ca^{2+} [30] and inhibits $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange [31]. To prevent interferences in Mn^{2+} entry attributed to distinct membrane depolarization due to cells exposure to increasing extracellular Ca^{2+} concentrations, the experiments were performed in the presence of the K^+ ionophore valinomycin (3 μM), in order to stabilize the

platelet membrane potential close to the K^+ equilibrium potential [32]. As shown in Fig. 1A, in the absence of extracellular Ca^{2+} (100 μM EGTA added) treatment of platelets with the specific inhibitor of the Ca^{2+} -ATPases of internal stores (SERCAs), TG (200 nM), in the presence of 500 μM external Mn^{2+} , resulted in a sustained quenching of fura-2 fluorescence compared with non-stimulated cells. The rate of decay (slope) of fura-2 fluorescence at 360 nm observed in a medium containing 500 μM Mn^{2+} in the presence of TG, was significantly reduced in the presence of increasing concentrations of extracellular Ca^{2+} (0.3–3 mM) with no detectable effects on fura-2 fluorescence in the absence of TG (Figs. 1B–D and 3).

We have investigated the role of lipid rafts in TG-evoked Mn^{2+} entry by preincubation with M β CD, a compound widely used to remove cholesterol from cells, thus disrupting the lipid raft domains [22,33]. Treatment of human platelets for 30 min with 10 mM M β CD reduced the cholesterol content by 83 \pm 5% as detected by using the colorimetric assay Cholesterol E test. As shown in Figs. 2 and 3, the quenching of fura-2 fluorescence at 360 nm after stimulation of TG in the presence of 500 μM Mn^{2+} was insensitive to extracellular Ca^{2+} when platelets were preincubated for 30 min with 10 mM M β CD. TG-induced Mn^{2+} entry in M β CD-treated cells was significantly attenuated at extracellular Ca^{2+} concentrations of 0 and 0.3 mM as compared to control (not treated with M β CD) but was significantly enhanced in the presence of 3 mM extracellular Ca^{2+} (Fig. 3), thus suggesting that lipid raft disruption impairs the regulation of store-operated divalent cation entry dependent on extracellular Ca^{2+} . M β CD treatment did not affect Mn^{2+} leak in the absence of TG (Fig. 2), suggesting that this agent does not affect plasma membrane permeability to cations.

In order to investigate whether the effects induced by M β CD were specific of cholesterol depletion, we repeated the experiments with

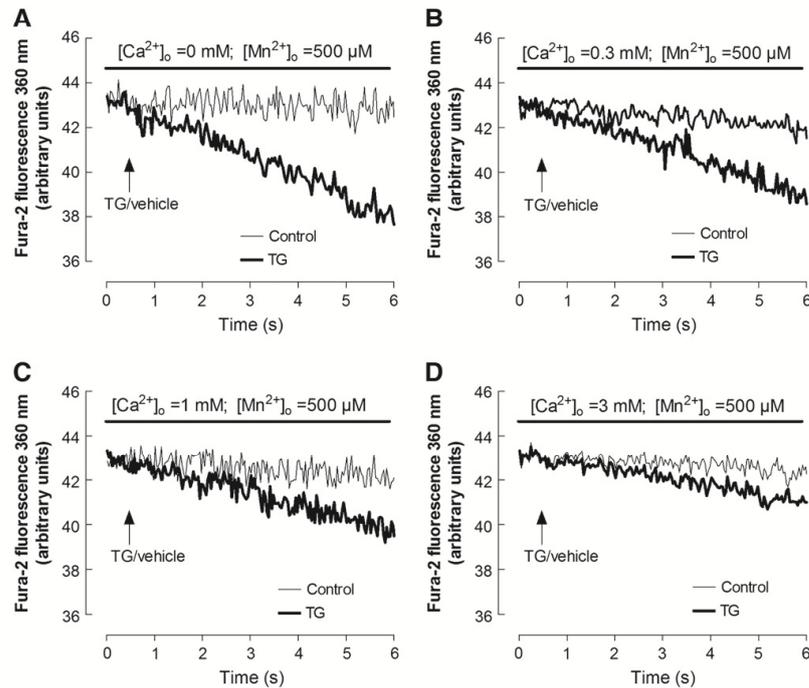


Fig. 1. TG-evoked Mn^{2+} entry in the presence of different extracellular concentrations of Ca^{2+} . Human platelets were loaded with fura-2 and resuspended in HBS. Cells were incubated for 30 min at 37 °C with DMSO (the vehicle of M β CD). Valinomycin (3 μM) was added 5 min before the onset of the experiment. At the time of experiment CaCl_2 (0–3 mM), as indicated, and 500 μM Mn^{2+} were added. Fura-2 fluorescence was measured at the isoemissive excitation wavelength of 360 nm. Platelets were either left untreated (Control) or stimulated with TG (200 nM). For Ca^{2+} -free conditions 100 μM EGTA was added to the medium. Traces are representative of six separate experiments.

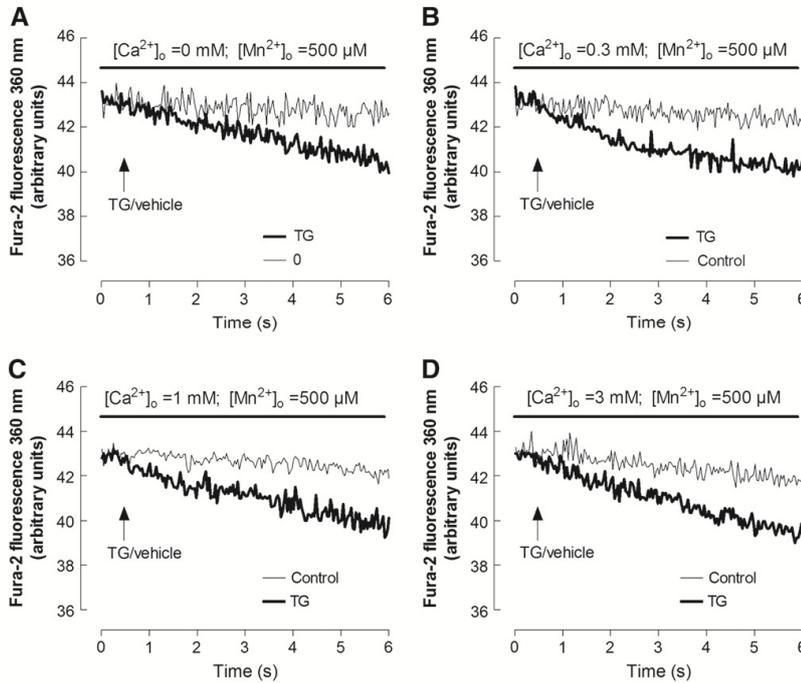


Fig. 2. Effect of MβCD on TG-evoked Mn^{2+} entry in the presence of different extracellular concentrations of Ca^{2+} . Human platelets were loaded with fura-2 and resuspended in HBS. Cells were incubated for 30 min at 37 °C with 10 mM MβCD. Valinomycin (3 μM) was added 5 min before the onset of the experiment. At the time of experiment $CaCl_2$ (0–3 mM), as indicated, and 500 μM Mn^{2+} were added. Fura-2 fluorescence was measured at the isoemissive excitation wavelength of 360 nm. Platelets were either left untreated (Control) or stimulated with TG (200 nM). For Ca^{2+} -free conditions 100 μM EGTA was added to the medium. Traces are representative of six separate experiments.

cholesterol-loaded MβCD (CLCD). Loading MβCD with cholesterol abolished the effect of MβCD on TG-evoked Mn^{2+} entry in the presence of increasing extracellular concentrations of Ca^{2+} (Fig. 3),

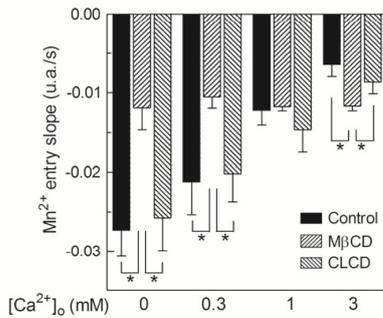


Fig. 3. Effect of MβCD on the slope of TG-evoked Mn^{2+} entry in the presence of different extracellular concentrations of Ca^{2+} . Human platelets were loaded with fura-2 and resuspended in HBS. Cells were incubated for 30 min at 37 °C with 10 mM MβCD or with 10 mM cholesterol-loaded MβCD (CLCD), as indicated. Valinomycin (3 μM) was added 5 min before the onset of the experiment. At the time of experiment $CaCl_2$ (0–3 mM), as indicated, and 500 μM Mn^{2+} were added. Fura-2 fluorescence was measured at the isoemissive excitation wavelength of 360 nm. Platelets were either left untreated (Control) or stimulated with TG (200 nM). Data indicate the slope of Mn^{2+} entry traces in TG-stimulated platelets in the presence of different concentrations of extracellular Ca^{2+} expressed as means ± SEM ($[Ca^{2+}]_o = 0$ mM; 100 μM EGTA added). The rate of decay (slope) of fura-2 fluorescence due to Mn^{2+} entry was determined as described in Materials and methods. Significance values indicate differences compared with TG-treated cells in the absence of MβCD. * $p < 0.05$.

which indicates that the effect observed with MβCD was specific of cholesterol removal.

3.2. Role of lipid rafts in TG-induced surface expression of STIM1

After Ca^{2+} store depletion, STIM1 has been reported to migrate to the PM, where the EF-hand domain faces the extracellular medium and might act as an extracellular Ca^{2+} sensor [2,9]. We have previously reported that treatment with TG results in Ca^{2+} -dependent translocation of STIM1 to the PM [13]. Hence, we have now investigated the role of lipid rafts in TG-induced surface expression of STIM1 by immunofluorescence. Human platelets were incubated with 10 mM MβCD for 30 min, and immunofluorescence in resting and TG-stimulated cells was determined using the anti-STIM1 (25–139) antibody on the basis of the N-terminal extracellular location of the STIM1 (25–139) sequence of PM-resident STIM1. As shown in Fig. 4, incubation of fixed, non-permeabilized resting platelets in suspension with 1 μg/ml anti-STIM1 (25–139) antibody followed by detection using an FITC-conjugated secondary antibody revealed the presence of STIM1 proteins in the cellular surface. Data presented in Fig. 4 were corrected by subtraction of the fluorescence due to non-specific binding of the secondary antibody alone, which was less than 20% of the fluorescence detected in the presence of the anti-STIM1 (25–139) antibody (data not shown). In the presence of 1 mM extracellular Ca^{2+} , platelet stimulation with TG for 10 s enhanced surface expression of STIM1 by 18% (Fig. 4). After 30 min preincubation with 10 mM MβCD the effect of TG was abolished without altering detection of STIM1 in the PM in resting cells (Fig. 4; $p < 0.05$; $n = 5$). Treatment with CLCD was without effect on the surface expression of STIM1 both at resting conditions and upon stimulation with TG, thus suggesting that lipid rafts are necessary for TG-evoked translocation of STIM1 to the PM.

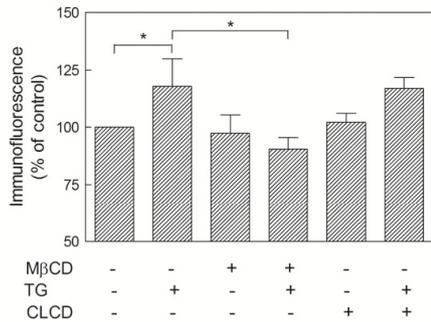


Fig. 4. Effect of MβCD on TG-induced surface expression of STIM1. Platelets were incubated for 30 min at 37 °C with 10 mM MβCD or with 10 mM cholesterol-loaded MβCD (CLCD), as indicated, and then stimulated in the presence of 1 mM Ca²⁺ with 200 nM TG for 10 s before mixing with an equal volume of ice-cold formaldehyde 3% (w/v) in PBS for 10 min. Cells were then incubated with 1 μg/ml anti-STIM1 (25–139) antibody for 2 h followed by incubation with FITC-conjugated anti-mouse IgG for a further 1 h. Histograms indicate the immunofluorescence values under different experimental conditions. Values are means ± SEM of five independent experiments. * *p* < 0.05.

3.3. Role of lipid rafts in the association between plasma membrane STIM1 and Orai1

Since our previous studies have reported that regulation of SOCE by extracellular Ca²⁺ is likely mediated by association of PM-located STIM1 and Orai1 in human platelets [13], we have now investigated whether lipid raft domains disruption impairs this regulatory mechanism by preventing association between these proteins. The association between PM-resident STIM1 and Orai1 was found capacitative in nature since it exists in cells heavily loaded with the intracellular Ca²⁺ chelator dimethyl BAPTA where the stores were depleted using TG [13]. We have tested for the association between PM-STIM1 and Orai1 by looking for co-immunoprecipitation. Platelets loaded with dimethyl BAPTA were preincubated for 30 min in the absence and presence of 10 mM MβCD and then stimulated with 200 nM TG for 10 s before mixing with paraformaldehyde (1.5% in PBS). We have recently reported that fixing with glutaraldehyde provides similar results [13]. Fixed cells were washed and incubated with anti-STIM1 (25–139) antibody for 2 h further, washed, and lysed. Immunoprecipitation in the presence of agarose beads was performed overnight without further addition of antibodies and subsequent SDS-PAGE and Western blotting were conducted. As shown in Fig. 5, treatment for 10 s with TG enhanced the association between PM-resident STIM1 and Orai1 by 86%. Treatment with 10 mM MβCD for 30 min reduced TG-evoked response by 85% (Fig. 5, top panel and histogram; *p* < 0.05; *n* = 4), while preincubation, for the same time and with the same concentration of CLCD did not significantly alter the association between PM-spanning STIM1 and Orai1 (Fig. 5, top panel and histogram; *p* < 0.05; *n* = 4). Western blotting of the same membranes with anti-STIM1 (25–139) antibody confirmed a similar content of this protein in all lanes (Fig. 5, bottom panel).

We have further investigated the role of lipid rafts on the association of Orai1 with STIM1 immunoprecipitated from platelet whole cell lysates, including both PM-located and intracellular STIM1. Treatment of dimethyl BAPTA-loaded human platelets for 10 s with 200 nM TG enhances the association of STIM1 with Orai1 by 267 ± 39% of control (resting cells). Preincubation of platelets for 30 min with 10 mM MβCD reduced the association of STIM1 with Orai1 stimulated by TG to 122 ± 14% of control, without having any effect on the resting association between these proteins.

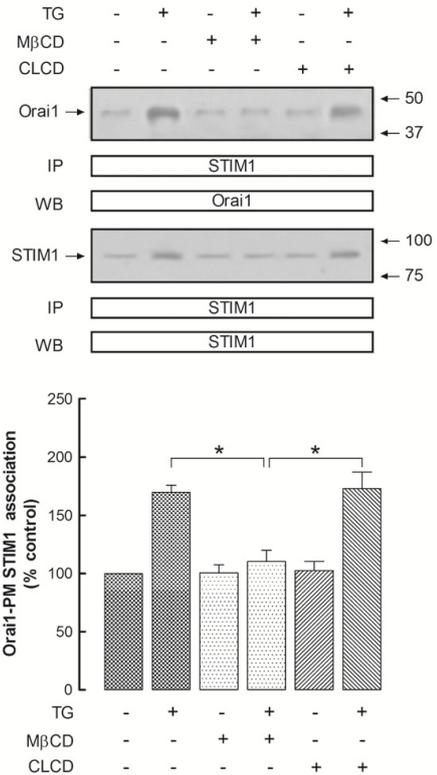


Fig. 5. Effect of MβCD on TG-induced association of plasma membrane STIM1 and Orai1 in human platelets. Platelets were incubated for 30 min at 37 °C with 10 mM MβCD or with 10 mM cholesterol-loaded MβCD (CLCD), as indicated, and then stimulated with 200 nM TG for 10 s before mixing with an equal volume of ice-cold formaldehyde 3% (w/v) in PBS for 10 min. Cells were then incubated with 1 μg/ml anti-STIM1 (25–139) antibody for 2 h, washed twice in PBS and lysed. Whole cell lysates were incubated overnight with 25 μg/ml agarose beads and immunoprecipitates were subjected to 10% SDS-PAGE and subsequent Western blotting with a specific anti-Orai1 antibody. Membranes were reblotted with the anti-STIM1 (25–139) antibody for protein loading control. The panel shows results from one experiment representative of five others. Molecular masses indicated on the right were determined using molecular-mass markers run in the same gel. Histograms represent the quantification of plasma membrane STIM1 (PM-STIM1)-Orai1 association in resting (control) and TG-treated cells. Results are presented as arbitrary optical density units and expressed as means ± S.E.M. **p* < 0.05 compared to control (cells not stimulated with TG).

4. Discussion

SOCE is a mechanism regulated by the filling state of the intracellular Ca²⁺ stores that is fully inactivated by Ca²⁺ store replenishment [34]. Although the activation of SOCE has been extensively investigated, the mechanisms of SOCE inactivation remain unclear. One of the mechanisms of SOCE inactivation is the fast inactivation of CRAC/Orai channels, with millisecond time constants, that arises from feedback inhibition of I_{CRAC} mediated by the cytosolic Ca²⁺ concentration around individual CRAC channels [35,36]. In addition, a role for PM-resident STIM1, sensing the extracellular Ca²⁺, in the inactivation of SOCE has also been reported in different cell types [11], including human platelets [13]. Inactivation of SOCE by PM-spanning STIM1 has been suggested to be mediated by interaction with Orai1 [13]. A recent study has revealed that the CRAC modulatory domain, within the amino acids 474 and 485 in the cytosolic region of STIM1, provides a negative feedback signal to Ca²⁺ entry by inducing fast Ca²⁺-dependent inactivation of CRAC/Orai channels [37]; however, whether the observed SOCE inactivation by

extracellular Ca^{2+} mediated by PM-resident STIM1 contributes to fast inactivation of CRAC/Orai channels remains unclear.

Lipid rafts are sphingolipids and cholesterol enriched plasma membrane domains that function as platforms for membrane proteins [38]. Lipid rafts recruit specific set of proteins including those associated to G protein-coupled receptor signaling or proteins of the Src family [39]. Lipid rafts have also been shown to contain proteins of the SOCE pathway, including the TRPC members TRPC1, TRPC4 and TRPC5 [20,21], Orai1 [40] and STIM1 [18,19] and regulate the mode of activation of certain Ca^{2+} permeable channels [19,40]. M β CD has been extensively used to remove cholesterol from cells and disrupt lipid rafts [21,41], an experimental maneuver that significantly attenuates SOCE in different cell types [22,42,43], which might be attributed to impairment of the association between SOCE proteins. Our results indicate that disruption of lipid rafts by M β CD attenuates SOCE, as previously published by us and others, and impairs the sensitivity of SOCE to extracellular Ca^{2+} , which, to our knowledge, is the first description of a role of lipid rafts in the regulation of SOCE by the extracellular Ca^{2+} concentration mediated by STIM1. As a consequence, at Ca^{2+} concentrations in the medium as high as 3 mM divalent cation entry induced by TG was significantly greater in the presence of M β CD than in its absence, thus limiting the cellular ability to protect against cell toxicity. The effect of lipid raft disruption might be attributed to the impairment of STIM1 localization in the PM upon treatment with TG and, subsequently, association with the Ca^{2+} channel Orai1. Although, since the store depletion-induced association of PM-spanning STIM1 with Orai1 is much greater than PM association of STIM1, we cannot rule out the possibility that impairment of the association between PM-STIM1 and Orai1 is due to changes in the lipid environment rather than to impairment of PM association of STIM1. Nevertheless, lipid raft disruption did not alter the resting level of either expression of STIM1 in the plasma membrane or co-immunoprecipitation of PM-spanning STIM1 with Orai1. Although the reason of this phenomenon has not been further investigated, it might be explained either by the presence of both lipid raft-dependent and -independent STIM1 pools in the PM or to a reduced turnover of both events.

Our results indicate that lipid raft domains are necessary for the association of Orai1, not only with PM-resident STIM1, but also with the intracellular pool of STIM1, as detected by immunoprecipitation of whole cell lysates with anti-STIM1 antibody followed by Western blotting with the anti-Orai1 antibody. STIM1 immunoprecipitated

from whole platelet lysates includes both ER- and PM-located STIM1. Our results indicate that the results obtained after STIM1 immunoprecipitation from whole cell lysates are not solely attributed to PM-STIM1 since the basal association with Orai1 was found to be significantly greater in whole cell lysates (data not shown), as well as TG-evoked association between STIM1 and Orai1.

Despite M β CD is the most widely used means to investigate the role of lipid rafts, it should be used with caution since a number of problems have been arisen associated to treatment with M β CD, including cholesterol depletion of internal membranes, although internal membranes have a lower cholesterol level than the PM, or inability to induce complete disruption of lipid rafts due to the presence of sphingolipids in these membrane domains [33]. We have found that the inhibitory effect of M β CD on the regulation of SOCE mediated by PM-resident STIM1 was not observed when we used CLCD, thus suggesting that the effect of M β CD was specifically mediated by cholesterol removal. Other cholesterol scavengers, such as nystatin or filipin, as well as depletion of sphingolipids, have been reported to induce a number of side effects that might interfere with SOCE [44,45].

We believe that the inhibition of TG-evoked translocation of STIM1 to the PM by disruption of lipid rafts might be attributed to the location and recruitment of STIM1 into the PM rather than to impairment of the intracellular trafficking. This is based on the lack of effect of M β CD in the PM level of STIM1 in unstimulated cells, which suggests that the turnover of PM-STIM1 is not altered, although we cannot rule out the possibility of a reduced turnover. However, it has been reported that while the recruitment of membrane proteins in phospholipid-rich membrane regions occurs through protein-protein interactions, proteins that associate with rafts domains require interactions between the lipids within the rafts and the transmembrane domain of the proteins or the lipid moiety of proteins attached to the membrane by a lipid modification [46]. Therefore, the expression of raft-associated proteins in the PM requires the presence of lipid rafts, and disruption of the raft domains might prevent *de novo* PM association of raft-associated proteins.

In summary, here we report for the first time that lipid raft domains are PM platforms required to support the interaction between Orai1 and PM-resident STIM1. The latter, probably acting as a sensor of extracellular Ca^{2+} concentration, is essential for the mechanism of SOCE inactivation by extracellular Ca^{2+} (Fig. 6), which might be a protective cellular mechanism to prevent Ca^{2+} overload and cell toxicity and death.

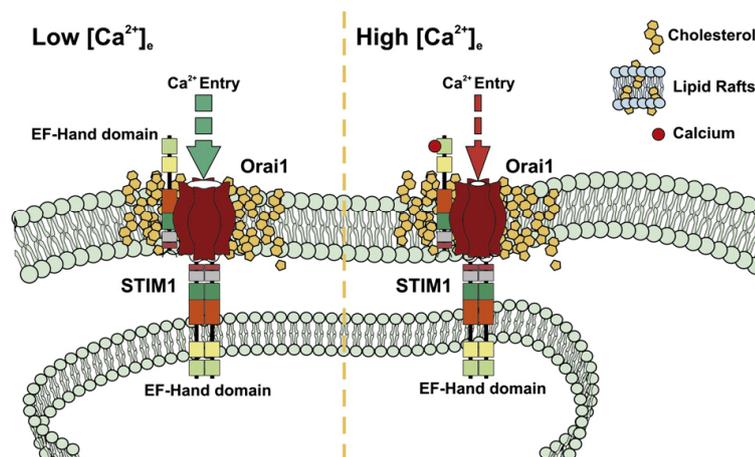


Fig. 6. Overview of the role of lipid rafts on PM-STIM1-mediated inactivation of SOCE. PM-resident STIM1 is associated to Orai1 and serves as an extracellular Ca^{2+} sensor that regulates SOCE upon store depletion preventing calcium overloading. The interaction between PM-resident STIM1 and Orai1 entirely depends on the integrity of the lipid raft domains, which provide the environment necessary for the association between these proteins.

Acknowledgements

This work is supported by Spanish Ministry of Science and Innovation grants BFU2007-60104 and BFU2010-21043-C02-01. JJ is supported by a DGI BES-2005-6899 fellowship.

References

- [1] J. Liou, M.L. Kim, W.D. Heo, J.T. Jones, J.W. Myers, J.E. Ferrell Jr., T. Meyer, STIM1 is a Ca^{2+} sensor essential for Ca^{2+} -store-depletion-triggered Ca^{2+} influx, *Curr. Biol.* 15 (2005) 1235–1241.
- [2] J. Roos, P.J. DiGregorio, A.V. Yeromin, K. Ohlsen, M. Lioudyno, S. Zhang, O. Safirina, J.A. Kozak, S.L. Wagner, M.D. Cahalan, G. Velicki, K.A. Stauderman, STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca^{2+} channel function, *J. Cell Biol.* 169 (2005) 435–445.
- [3] S. Feske, Y. Gwack, M. Prakriya, S. Srikanth, S.H. Puppel, B. Tanasa, P.G. Hogan, R.S. Lewis, M. Daly, A. Rao, A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function, *Nature* 441 (2006) 179–185.
- [4] J.C. Mercer, W.L. Dehaven, J.T. Smyth, B. Wedel, R.R. Boyles, G.S. Bird, J.W. Putney Jr., Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 24979–24990.
- [5] X. Liu, K.T. Cheng, B.C. Bandyopadhyay, B. Pani, A. Dietrich, B.C. Paria, W.D. Swaim, D. Beech, E. Yildirim, B.B. Singh, L. Birnbaumer, I.S. Ambudkar, Attenuation of store-operated Ca^{2+} current impairs salivary gland fluid secretion in TRPC1^{-/-} mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (2007) 17542–17547.
- [6] 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.
- [7] H.L. Ong, K.T. Cheng, X. Liu, B.C. Bandyopadhyay, B.C. Paria, J. Soboloff, B. Pani, Y. Gwack, S. Srikanth, B.B. Singh, D.L. Gill, I.S. Ambudkar, Dynamic assembly of TRPC1-STIM1-Orai1 ternary complex is involved in store-operated calcium influx. Evidence for similarities in store-operated and calcium release-activated calcium channel components, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 9105–9116.
- [8] J. Liou, M. Fivaz, T. Inoue, T. Meyer, Live cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after Ca^{2+} store depletion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (2007) 9301–9306.
- [9] S.L. Zhang, Y. Yu, J. Roos, J.A. Kozak, T.J. Deerinck, M.H. Ellisman, K.A. Stauderman, M.D. Cahalan, STIM1 is a Ca^{2+} sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca^{2+} store to the plasma membrane, *Nature* 437 (2005) 902–905.
- [10] J. Li, P. Sukumar, C.J. Milligan, B. Kumar, Z.Y. Ma, C.M. Munsch, L.H. Jiang, K.E. Porter, D.J. Beech, Interactions, functions, and independence of plasma membrane STIM1 and TRPC1 in vascular smooth muscle cells, *Circ. Res.* 103 (2008) 97–104.
- [11] M.A. Spassova, J. Soboloff, L.P. He, W. Xu, M.A. Dziadek, D.L. Gill, STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca^{2+} channels, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006) 4040–4045.
- [12] 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.
- [13] I. Jardin, J.J. Lopez, P.C. Redondo, G.M. Salido, J.A. Rosado, Store-operated Ca^{2+} entry is sensitive to the extracellular Ca^{2+} concentration through plasma membrane STIM1, *Biochim. Biophys. Acta* 1793 (2009) 1614–1622.
- [14] V. Leytin, D.J. Allen, S. Mykhaylov, E. Lyubimov, J. Freedman, Thrombin-triggered platelet apoptosis, *J. Thromb. Haemost.* 4 (2006) 2656–2663.
- [15] J.J. Lopez, P.C. Redondo, G.M. Salido, J.A. Pariente, J.A. Rosado, N. N. N', N'-tetrakis (2-pyridylmethyl)ethylenediamine induces apoptosis through the activation of caspases-3 and -8 in human platelets. A role for endoplasmic reticulum stress, *J. Thromb. Haemost.* 7 (2009) 992–999.
- [16] J.J. Lopez, G.M. Salido, E. Gomez-Arrieta, 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.
- [17] J.J. Lopez, G.M. Salido, J.A. Pariente, J.A. Rosado, Thrombin induces activation and translocation of Bid Bax and Bak to the mitochondria in human platelets, *J. Thromb. Haemost.* 6 (2008) 1780–1788.
- [18] B. Pani, H.L. Ong, X. Liu, K. Rauser, I.S. Ambudkar, B.B. Singh, Lipid rafts determine clustering of STIM1 in endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions and regulation of store-operated Ca^{2+} entry (SOCE), *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 17333–17340.
- [19] A. Sampieri, A. Zepeda, C. Saldaña, A. Salgado, L. Vaca, STIM1 converts TRPC1 from a receptor-operated to a store-operated channel: Moving TRPC1 in and out of lipid rafts, *Cell Calcium* 44 (2008) 479–491.
- [20] S.L. Brownlow, A.G. Harper, M.T. Harper, S.O. Sage, A role for hTRPC1 and lipid raft domains in store-mediated calcium entry in human platelets, *Cell Calcium* 35 (2004) 107–113.
- [21] S.L. Brownlow, S.O. Sage, Transient receptor potential protein subunit assembly and membrane distribution in human platelets, *Thromb. Haemost.* 94 (2005) 839–845.
- [22] 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.
- [23] C. Galan, G.E. Woodard, N. Dionisio, G. Salido, J.A. Rosado, Lipid rafts modulate the activation but not the maintenance of store-operated Ca^{2+} entry, *Biochim. Biophys. Acta* 1803 (2010) 1083–1093.
- [24] P.C. Redondo, M.T. Harper, J.A. Rosado, S.O. Sage, A role for cofilin in the activation of store-operated calcium entry by de novo conformational coupling in human platelets, *Blood* 107 (2006) 973–979.
- [25] P.C. Redondo, N. Ben-Amor, G.M. Salido, A. Bartegi, J.A. Pariente, J.A. Rosado, Ca^{2+} -independent activation of Bruton's tyrosine kinase is required for store-mediated Ca^{2+} entry in human platelets, *Cell. Signal.* 17 (2005) 1011–1021.
- [26] 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.
- [27] H.T. Cheng, B.O. Megha, E. London, Preparation and properties of asymmetric vesicles that mimic cell membranes: effect upon lipid raft formation and transmembrane helix orientation, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 6079–6092.
- [28] P.H. Purdy, J.K. Graham, Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm, *Cryobiology* 48 (2004) 36–45.
- [29] S.O. Sage, J.E. Merritt, T.J. Hallam, T.J. Rink, Receptor-mediated calcium entry in fura-2-loaded human platelets stimulated with ADP and thrombin. Dual-wavelength studies with Mn^{2+} , *Biochem. J.* 258 (1989) 923–926.
- [30] E. Graf, A.K. Verma, J.P. Gorski, G. Lopuschuk, V. Niggli, M. Zurini, E. Carafoli, J.T. Penniston, Molecular properties of calcium-pumping ATPase from human erythrocytes, *Biochemistry* 21 (1982) 4511–4516.
- [31] M.P. Blaustein, E.M. Santiago, Effects of internal and external calcium and of ATP on sodium-calcium and calcium-calcium exchange in squid axons, *Biophys. J.* 20 (1977) 79–111.
- [32] M.P. Mahaut-Smith, T.J. Rink, S.C. Collins, S.O. Sage, Voltage-gated potassium channels and the control of membrane potential in human platelets, *J. Physiol.* 428 (1990) 723–735.
- [33] I. Vaca, SOCE: the store-operated calcium influx complex, *Cell Calcium* 47 (2010) 199–209.
- [34] J.W. Putney Jr., A model for receptor-regulated calcium entry, *Cell Calcium* 7 (1986) 1–12.
- [35] A. Zweifach, R.S. Lewis, Rapid inactivation of depletion-activated calcium current I_{CRAC} due to local calcium feedback, *J. Gen. Physiol.* 105 (1995) 209–226.
- [36] M. Yamashita, L. Navarro-Boreilly, B.A. McNally, M. Prakriya, Orai1 mutations alter ion permeation and Ca^{2+} -dependent fast inactivation of CRAC channels: evidence for coupling of permeation and gating, *J. Gen. Physiol.* 130 (2007) 525–540.
- [37] I. Derler, M. Fahrner, M. Muik, B. Lackner, R. Schindl, K. Groschner, C. Romanin, A CRAC modulatory domain (CMD) within STIM1 mediates fast Ca^{2+} -dependent inactivation of Orai1 channels, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 24933–24938.
- [38] K. Simons, W.L. Vaz, Model systems, lipid rafts, and cell membranes, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 33 (2004) 269–295.
- [39] K. Simons, D. Toomre, Lipid rafts and signal transduction, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1 (2000) 31–39.
- [40] Y. Liao, N.W. Plummer, M.D. George, J. Abramowitz, M.X. Zhu, L. Birnbaumer, A role for Orai in TRPC-mediated Ca^{2+} entry suggests that a TRPC-Orai complex may mediate store and receptor operated Ca^{2+} entry, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106 (2009) 3202–3206.
- [41] U. Klein, G. Gimpl, F. Fabrenholz, Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with beta-cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor, *Biochemistry* 34 (1995) 13784–13793.
- [42] Y.S. Prakash, M.A. Thompson, B. Vaa, I. Matabadin, T.E. Peterson, T. He, C.M. Pabelick, Caveolins and intracellular calcium regulation in human airway smooth muscle, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 293 (2007) L1118–L1126.
- [43] A. Bergdahl, M.F. Gomez, K. Dreja, S.Z. Xu, M. Adner, D.J. Beech, J. Broman, P. Hellstrand, K. Sward, Cholesterol depletion impairs vascular reactivity to endothelin-1 by reducing store-operated Ca^{2+} entry dependent on TRPC1, *Circ. Res.* 93 (2003) 839–847.
- [44] A.I. Ivanov, Exocytosis and endocytosis, Humana Press, Totowa, 2008.
- [45] N. Koide, Y. Naiki, A. Morikawa, G. Tumurkhuu, J. Dagvadorj, A.S. Noman, E.K.I. Ifeakar, T. Komatsu, T. Yoshida, T. Yokochi, Nystatin-induced nitric oxide production in mouse macrophage-like cell line RAW264.7, *Microbiol. Immunol.* 53 (2009) 295–300.
- [46] M.A. Alonso, J. Millan, The role of lipid rafts in signalling and membrane trafficking in T lymphocytes, *J. Cell Sci.* 114 (2001) 3957–3965.



The cytoskeleton plays a modulatory role in the association between STIM1 and the Ca²⁺ channel subunits Orai1 and TRPC1

Carmen Galán^a, Natalia Dionisio^a, Tarik Smani^b, Ginés M. Salido^a, Juan A. Rosado^{a,*}

^a Department of Physiology (Cellular Physiology Research Group), University of Extremadura, 10071 Cáceres, Spain

^b Institute of Biomedicine from Seville, University Hospital of Virgen del Rocío, University of Seville, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 February 2011

Accepted 18 May 2011

Available online 26 May 2011

Keywords:

Actin filaments

Microtubules

Calmodulin

TRPC1

STIM1

Orai1

ABSTRACT

Store-operated Ca²⁺ entry (SOCE) is a major pathway for Ca²⁺ influx in non-excitable cells. Recent studies favour a conformational coupling mechanism between the endoplasmic reticulum (ER) Ca²⁺ sensor STIM1 and Ca²⁺ permeable channels in the plasma membrane to explain SOCE. Previous studies have reported a role for the cytoskeleton modulating the activation of SOCE; therefore, here we have investigated whether the interaction between STIM1 and the Ca²⁺ permeable channels is modulated by the actin or microtubular network. In HEK-293 cells, treatment with the microtubular disrupter colchicine enhanced both the activation of SOCE and the association between STIM1 and Orai1 or TRPC1 induced by thapsigargin (TG). Conversely, stabilization of the microtubules by paclitaxel attenuated TG-evoked activation of SOCE and the interaction between STIM1 and the Ca²⁺ channels Orai1 and TRPC1, altogether suggesting that the microtubules act as a negative regulator of SOCE. Stabilization of the cortical actin filament layer results in inhibition of TG-evoked both association between STIM1, Orai1 and TRPC1 and SOCE. Interestingly, disruption of the actin filament network by cytochalasin D did not significantly modify TG-evoked association between STIM1 and Orai1 or TRPC1 but enhanced TG-stimulated SOCE. Finally, inhibition of calmodulin by calmidazolium enhances TG-evoked SOCE and disruption of the actin cytoskeleton results in inhibition of TG-evoked association of calmodulin with Orai1 and TRPC1. Thus, we demonstrate that the cytoskeleton plays an essential role in the regulation of SOCE through the modulation of the interaction between their main molecular components.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Store-operated Ca²⁺ entry (SOCE) is a major mechanism for Ca²⁺ influx into cells and plays an important role in a wide variety of cellular processes [1]. The endoplasmic reticulum (ER) Ca²⁺ sensor STIM1, as well as a number of Ca²⁺-permeable plasma membrane channels, including Orai1 and certain members of the TRPC subfamily, are key players in SOCE. STIM1 is a single-pass membrane protein that is mainly located in the ER membrane and shows different functional domains, including the luminal EF hands, that allow STIM1 to sense the intraluminal Ca²⁺ concentration [2,3], the Orai1 interaction domain (SOAR/CAD) [4–6], the CRAC modulatory domain (CMD) [7] and the STIM1 homomerization domain (SHD) [8], among others. When Ca²⁺ stores are full STIM1 remains in an inactive state through an intramolecular shielding of the SOAR/CAD domain that prevents constitutive SOCE [8]. However, discharge of the ER results in dissociation of Ca²⁺ from the EF-hand domains, thus resulting in the activation of the

store-operated channels (SOCs) Orai1 and TRPCs. The coupling between STIM1 and Orai1 involves the interaction of SOAR domain positive charges with the acidic domain within the Orai1 C-terminal domain in order to activate the channel [9,10]. On the other hand, STIM1 has been shown to interact and gate TRPC members, such as TRPC1, through electrostatic interaction between STIM1 (K684,K685) and TRPC1 (D639,D640) [11].

Recent studies in HEK-293 cells have reported that, while oligomerization of STIM1 is independent on the microtubular network, the distribution of STIM1 in the ER requires the integrity of the microtubules, which facilitate STIM1 movements [12]; thus providing evidence for a role of the cytoskeleton in the regulation of SOCE in these cellular model. A number of studies have investigated the regulation of SOCE by the cytoskeleton, including the actin microfilaments and the microtubules, with different results depending on the cell type. In NIH 3T3 fibroblasts and smooth muscle DT40 cells inhibition of actin polymerization with cytochalasin or depolymerization of the microtubular network with nocodazole does not significantly alter SOCE [13–16], thus suggesting that in these cells the cytoskeleton is not essential for the activation of SOCE. In contrast, in human platelets, which have a more evenly distributed cytoskeleton, impairment of actin

* Corresponding author. Tel.: +34 927 257139; fax: +34 927257110.
E-mail address: jarosado@unex.es (J.A. Rosado).

filaments and microtubules remodelling either by inhibition of polymerization or by stabilization results in inhibition of SOCE [17–19] and a similar functional role has been described for the actin cytoskeleton in endothelial cells [20] and pancreatic acinar cells [21]. In human platelets we have more recently reported that store depletion results in an initial decrease in the actin filament content, probably due to disorganization of the cortical actin network to facilitate the interaction between proteins in the ER and plasma membrane, followed by an increase in actin polymerization necessary for the intracellular trafficking of portions of the ER towards the plasma membrane [22]. Therefore, we have explored the functional relevance of the cytoskeleton in the association between STIM1 and the SOC components Orai1 and TRPC1 upon depletion of the intracellular Ca^{2+} stores in HEK-293 cells endogenously expressing these proteins.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Fura-2/AM and Oregon Green 488 paclitaxel were from Invitrogen (Madrid, Spain). Bovine serum albumin (BSA), sodium dodecyl sulfate (SDS), Fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated phalloidin, Tris, triton X-100, phenyl methyl sulfonyl fluoride, leupeptin, benzamidine, deoxycholate, thapsigargin (TG), probenecid, Nonidet P-40, formaldehyde, calmidazolium, colchicine and paclitaxel (Taxol) were from Sigma (Madrid, Spain). Cytochalasin D (Cyt D) and jasplakinolide were from Calbiochem (Madrid, Spain). Dulbecco's modified Eagle's medium and heat-inactivated fetal bovine serum were from Sanex (Badajoz, Spain). Mouse anti-STIM1 antibody (25-139) was from BD Transduction Laboratories (Franklin Lakes, NJ, USA). Rabbit anti-hTRPC1 polyclonal antibody (557-571) was obtained from Alomone Laboratories (Jerusalem, Israel). Rabbit anti-Orai1 polyclonal antibody N terminal was from ProSci Inc (Derio, Bizkaia, Spain). Mouse anti-calmodulin antibody was from Abcam (Cambridge, UK). Donkey anti-rabbit IgG horseradish peroxidase-conjugated, sheep anti-mouse IgG horseradish peroxidase-conjugated, blotting paper and photographic films were from GE Healthcare (Madrid, Spain). Protein A-agarose was from Upstate Biotechnology Inc (Waltham, MA, USA). Enhanced chemiluminescence detection reagents were from Pierce (Cheshire, UK). Hyperfilm ECL was from Amersham (Buckinghamshire, UK). All other reagents were of analytical grade.

2.2. Cell culture

Human embryonic kidney 293 (HEK-293) cells were obtained from the American Type Culture Collection (Barcelona, Spain) and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium, supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, in a 37 °C incubator with 5% CO₂. At the time of the experiments cells were suspended in HEPES-buffered saline (HBS) containing (in mM): 145 NaCl, 10 HEPES, 10 D-glucose, 5 KCl, 1 MgSO₄, 1 CaCl₂, pH 7.45. When a Ca^{2+} -free medium was required 1.2 mM EGTA was added.

2.3. Measurement of intracellular free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_c$)

HEK-293 cells were suspended and loaded with fura-2 by incubation with 2 μ M fura-2/AM and 2.5 mM probenecid for 30 min at 37 °C. Fluorescence was recorded from 2 mL aliquots of magnetically stirred cellular suspension (2×10^6 cells/mL) at 37 °C using a Cary Eclipse spectrophotometer (Varian Ltd., Madrid, Spain) with excitation wavelengths of 340 and 380 nm and emission at 505 nm. Changes in $[Ca^{2+}]_c$ were monitored using the fura-2 340/380 fluorescence ratio and calibrated in terms of $[Ca^{2+}]_c$ [23].

Ca^{2+} release by TG was estimated using the integral of the rise in $[Ca^{2+}]_c$ for 3 min after the addition of the agonist. Ca^{2+} entry into TG-treated cells upon addition of Ca^{2+} to the extracellular medium was estimated using the integral of the rise in $[Ca^{2+}]_c$ for 3 min after addition of CaCl₂ ($\int \Delta [Ca^{2+}]_c dt$), normalized taking a sample every second, and expressed as nM s [24–26]. Ca^{2+} entry was corrected by subtraction of the $[Ca^{2+}]_c$ elevation due to leakage of the indicator to eliminate interferences due to extracellular fura-2.

2.4. Immunoprecipitation and Western blotting

The immunoprecipitation and Western blotting were performed as described previously [27]. Briefly, cell suspension aliquots (500 μ L; 2×10^6 cells/mL) were treated as described and lysed with lysis buffer, pH 7.2, containing 316 mM NaCl, 20 mM Tris, 2 mM EGTA, 0.2% SDS, 2% sodium deoxycholate, 2% Triton X-100, 2 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride, 100 μ g/mL leupeptin and 10 mM benzamidine. Samples were immunoprecipitated by simultaneous incubation with 2 μ g of anti-STIM1 antibody and protein A-agarose overnight at 4 °C on a rocking platform. Proteins were separated by 10% SDS-PAGE and electrophoretically transferred, for 2 h at 0.8 mA/cm², in a semi-dry blotter (Hoefer Scientific, Newcastle, Staffs., U.K.) onto nitrocellulose membranes for subsequent probing. Blots were incubated overnight with 10% (w/v) BSA in Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 (TBST) to block residual protein binding sites. Immunodetection of Orai1, hTRPC1, calmodulin and STIM1 was achieved using the anti-Orai1, anti-calmodulin or anti-STIM1 antibodies diluted 1:1000 in TBST for 2 h or the anti-hTRPC1 antibody diluted 1:200 in TBST for 2 h. To detect the primary antibody, blots were incubated for 1 h with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated anti-IgG antibody diluted 1:10,000 in TBST and then exposed to enhanced chemiluminescence reagents for 5 min. Blots were then exposed to photographic films. The density of bands on the film was measured using ImageJ (Windows version; National Institutes of Health) [28].

To assess the specificity of the bands we performed primary controls and primary-free controls, where whole cell lysates (2×10^6 cells/mL) were subjected to 10% SDS-PAGE and proteins were electrophoretically transferred onto membranes for incubation with primary and subsequently secondary antibody (primary control) or incubation solely with secondary antibody (primary-free control).

2.5. Measurement of F-actin content

The F-actin content was determined according to a previously published procedure [22]. Briefly, samples of cell suspensions (200 μ L; 2×10^6 cells/mL) were transferred to 200 mL of ice-cold 3% (w/v) formaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS; composition, in mM: NaCl 137, KCl 2.7, Na₂HPO₄ 4.3, KH₂PO₄ 1.4, pH 7.3) for 10 min. Fixed cells were permeabilized by incubation for 10 min with 0.025% (v/v) Nonidet P-40 detergent dissolved in PBS. Cells were then incubated for 30 min with 1 μ M FITC-labelled phalloidin in PBS supplemented with 0.5% (w/v) BSA. Cells were collected by centrifugation and resuspended in PBS. Cell staining was measured using a Perkin-Elmer fluorescence spectrophotometer (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). Samples were excited at 496 nm, and emission was at 516 nm.

2.6. Measurement of microtubular content

The microtubular content was determined following a previously published procedure [29]. Briefly, samples of cell suspensions (200 μ L; 2×10^6 cells/mL) were transferred to 200 μ L of ice-cold 3% (w/v) formaldehyde in PBS for 10 min. Fixed cells were

permeabilized by incubation for 10 min with 0.025% (v/v) Nonidet P40 detergent dissolved in PBS and then incubated for 30 min with Oregon Green 488 paclitaxel (1 μ M) in PBS supplemented with 0.5% (w/v) BSA. Cells were collected by centrifugation and resuspended in PBS. Cell staining was measured using a Perkin-Elmer fluorescence spectrophotometer (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). Samples were excited at 488 nm and emission was at 522 nm.

2.7. Statistical analysis

Analysis of statistical significance was performed using one-way analysis of variance combined with the Dunnett tests. The difference was considered statistically significant when at least $p < 0.05$.

3. Results

3.1. The microtubules regulate TG-evoked SOCE and association between STIM1, Orai1 and TRPC1

In the absence of extracellular Ca^{2+} , the addition of 1 μ M TG to fura-2-loaded HEK-293 cells in stirred cuvettes at 37 °C evoked a transient elevation in $[Ca^{2+}]_c$ due to the release of Ca^{2+} from intracellular stores. Subsequent addition of 2 mM Ca^{2+} to the external medium induced a sustained increase in $[Ca^{2+}]_c$ indicative of SOCE (the integral of the TG-evoked rise in $[Ca^{2+}]_c$ for 3 min after addition of $CaCl_2$ was 15327 ± 1221 nM s; Fig. 1A). Treatment of HEK-293 cells with 1 μ M TG resulted in association of Orai1 and TRPC1 with STIM1. Although the interaction of STIM1 with these two channels was detected in resting conditions, stimulation with TG enhanced the interaction between STIM1 and both Orai1 and TRPC1 by $75 \pm 9\%$ and $80 \pm 11\%$, respectively (Fig. 1B and C; $p < 0.05$; $n = 6$).

We have investigated the role of microtubules in the activation of SOCE in HEK-293 cells and the interaction between STIM1, Orai1 and TRPC1 controlled by depletion of the intracellular stores by using colchicine, a tubulin microtubule disrupting agent [29,30], and paclitaxel that induces microtubular stabilization and increases the cellular microtubular content [31,32]. Treatment with 30 μ M colchicine for 30 min at 37 °C significantly reduced the microtubular content in non-stimulated cells, as well as abolished tubulin polymerization after stimulation with 1 μ M TG (Table 1; $p < 0.05$; $n = 6$). Cell treatment with colchicine enhanced TG-evoked SOCE by $23 \pm 4\%$ (the integral of the TG-evoked rise in $[Ca^{2+}]_c$ for 3 min after addition of $CaCl_2$ in cells pretreated with colchicine was 18975 ± 543 nM s; $p < 0.05$), without having any effect on TG-evoked Ca^{2+} release from the intracellular stores (Fig. 1A). We further investigated the effect of treatment with colchicine on TG-induced association between STIM1 and both Orai1 and TRPC1. As shown in Fig. 1B and C, top panels, treatment with colchicine enhanced TG-evoked association between STIM1 and Orai1 by $75 \pm 9\%$ and between STIM1 and TRPC1 by $44 \pm 6\%$ ($p < 0.05$), without affecting the association between these proteins in non-stimulated cells ($n = 6$). Western blotting with the immunoprecipitating antibody confirms that a similar amount of protein was loaded in all lanes (Fig. 1B and C, bottom panels). Conversely, treatment of HEK-293 cells for 30 min with 10 μ M paclitaxel at 37 °C enhanced the microtubular content in non-stimulated cells and prevented TG-evoked tubulin polymerization (Table 1; $p < 0.05$; $n = 6$). Treatment with paclitaxel attenuated TG-evoked SOCE by $60 \pm 7\%$ (the integral of TG-evoked rise in $[Ca^{2+}]_c$ for 3 min after addition of $CaCl_2$ in cells pretreated with paclitaxel was 6238 ± 1508 nM s; $p < 0.05$), without having any effect on TG-evoked Ca^{2+} efflux from the stores (Fig. 2A). In addition, pretreatment with paclitaxel reduced TG-induced association between STIM1 and both Orai1 and TRPC1 by $49 \pm 6\%$ and $59 \pm 5\%$, respectively ($p < 0.05$), without affecting the interaction between these proteins in non-stimulated cells (Fig. 2B and C, top panels;

$n = 6$). Western blotting with the immunoprecipitating antibody confirms that a similar amount of protein was loaded in all lanes (Fig. 2B and C, bottom panels).

3.2. Jaspalakinolide inhibits TG-evoked SOCE and association between STIM1, Orai1 and TRPC1

Jaspalakinolide, a cell-permeant peptide isolated from *Jaspis johnstoni*, induces polymerization and stabilization of actin filaments underneath the plasma membrane [33]; therefore, it is a useful tool to explore the role of the cortical actin cytoskeleton in the activation of SOCE and its relevance in the association between STIM1 and the Ca^{2+} channels in the plasma membrane. Cell treatment for 30 min with 10 μ M jaspalakinolide at 37 °C resulted in a significant increase in the F-actin content in non-stimulated cells and prevented TG-induced further actin filament polymerization (Table 2; $p < 0.05$; $n = 6$). Treatment with jaspalakinolide attenuated SOCE by $67 \pm 7\%$ (the integral of TG-evoked rise in $[Ca^{2+}]_c$ for 3 min after addition of $CaCl_2$ in cells pretreated with jaspalakinolide was 5118 ± 1867 nM s; $p < 0.05$), without having any effect on TG-evoked Ca^{2+} release from the intracellular stores (Fig. 3A). In cells treated with jaspalakinolide TG was unable to enhance association between STIM1 and both Orai1 and TRPC1 (Fig. 3B and C, top panels; $p < 0.05$). Treatment with jaspalakinolide did not affect the interaction between these proteins in cells not treated with TG (Fig. 3B and C, top panels). Western blotting with the anti-STIM1 antibody confirms a similar amount of protein loaded in all lanes (Fig. 3B and C, bottom panels).

3.3. Disruption of the actin cytoskeleton enhances TG-evoked SOCE

In order to investigate the role of the actin filament network in SOCE and TG-evoked association between STIM1 and the Ca^{2+} channels Orai1 and TRPC1, we used Cyt D, a widely utilized cell-permeant inhibitor of actin polymerization [17,34]. Pretreatment of HEK-293 cells for 40 min at 37 °C with 10 μ M Cyt D reduced the F-actin content in non-stimulated cells and impaired TG-induced F-actin polymerization (Table 2; $p < 0.05$; $n = 6$). In addition, treatment with Cyt D enhanced TG-evoked Ca^{2+} entry by $71 \pm 5\%$ (the integral of the rise in $[Ca^{2+}]_c$ for 3 min after addition of $CaCl_2$ was 25190 ± 1780 nM s in Cyt D-treated cells, Fig. 4A; $p < 0.05$; $n = 6$). In contrast to the effect of Cyt D on TG-evoked Ca^{2+} entry, treatment of HEK-293 cells with 10 μ M Cyt D for 40 min at 37 °C did not significantly modify the association between STIM1 and both Orai1 and TRPC1 in non-stimulated cells or cells treated with TG (Fig. 4B and C, top panels). Western blotting with the immunoprecipitating antibody confirms a similar amount of protein loaded in all lanes (Fig. 4B and C, bottom panels).

3.4. Cytochalasin D impairs TG-stimulated association of calmodulin with Orai1 and TRPC1

Calmodulin has been previously reported to modulate Ca^{2+} signals and to interact with TRPC1 [35] and Orai1 [36]. Since disruption of the actin filament network by treatment with Cyt D reported different effects on TG-evoked SOCE and TG-evoked association between STIM1 and the Ca^{2+} channels, we further investigated the possible regulation of the association between calmodulin and the Ca^{2+} channels upon treatment with Cyt D. In a medium containing 1 mM Ca^{2+} , TG enhances the association between calmodulin and both Orai1 and TRPC1 proteins by $215 \pm 47\%$ and $121 \pm 27\%$, respectively (Fig. 5A and B, top panels; $p < 0.05$; $n = 6$). Treatment of HEK-293 cells for 40 min with 10 μ M Cyt D did not significantly modify the association between calmodulin and the channel proteins in non-stimulated cells but abolished TG-evoked responses (Fig. 5A and B, top panels; $p < 0.05$;

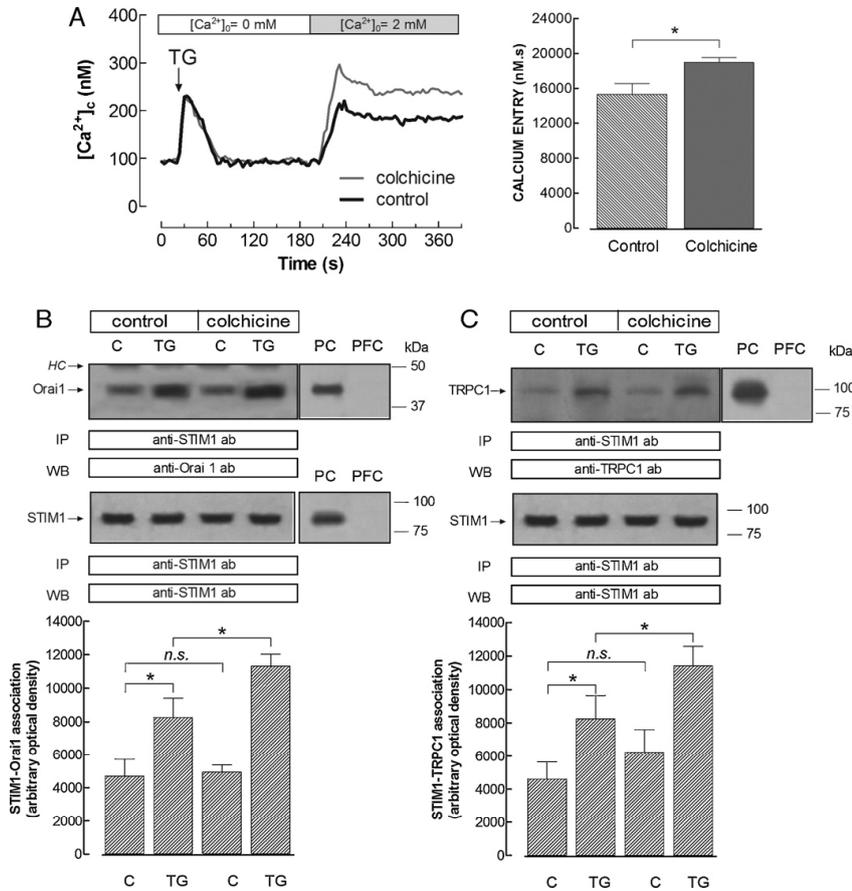


Fig. 1. Effect of colchicine on TG-evoked Ca²⁺ entry and association between STIM1 and both Orai1 and TRPC1 in HEK-293 cells. (A) Fura-2-loaded HEK-293 cells (2 × 10⁶ cells/mL) were incubated for 30 min in the absence or presence of 30 μM colchicine. At the time of experiment 1.2 mM EGTA was added. Cells were stimulated with 1 μM TG and 3 min later CaCl₂ (2 mM) was added to the medium to initiate Ca²⁺ entry. Histograms indicate Ca²⁺ entry in the presence or absence of colchicine, as indicated. Ca²⁺ entry was determined as described in Section 2. Values are means ± S.E.M. of six independent experiments; *p < 0.05. (B and C) HEK-293 cells were preincubated in presence of 30 μM colchicine or the vehicle (Control), as indicated, suspended in a Ca²⁺-free medium (1.2 mM EGTA added), stimulated for 3 min with 1 μM TG and lysed. Whole cell lysates were incubated overnight with 2 μg/mL anti-STIM1 antibody and 25 μg/mL protein A-agarose and immunoprecipitates were subjected to 10% SDS-PAGE and subsequent Western blotting with a specific anti-Orai1 (B) or anti-TRPC1 (C) antibody. Membranes were reprobbed with the anti-STIM1 antibody for protein loading control (bottom panels). The panels show results from one experiment representative of 5 others. Molecular masses indicated on the right were determined using molecular-mass markers run in the same gel. Histograms represent the quantification of STIM1–Orai1 or STIM1–TRPC1 association in non-stimulated (control) and TG-treated cells. Results are presented as arbitrary optical density units and expressed as means ± S.E.M. *p < 0.05, n.s., non significant. PC and PFC, primary control and primary-free control, respectively. For PC, whole cell lysates were subjected to 10% SDS-PAGE and subsequent Western blotting with the corresponding primary and secondary antibodies. For PFC, whole cell lysates were subjected to 10% SDS-PAGE and the membrane was subsequently incubated solely with the secondary antibody. HC, heavy chain of the immunoglobulin used for immunoprecipitation.

Table 1
Effects of colchicine and paclitaxel on the microtubular content of unstimulated and TG-stimulated HEK-293 cells.

Stimulatory agent	Control	Colchicine	Paclitaxel
None	100 ± 0	47 ± 5 [†]	139 ± 4 [†]
TG	127 ± 3 [*]	51 ± 7 [†]	145 ± 5 [†]

HEK-293 cells were incubated with 30 μM colchicine or 10 μM paclitaxel for 30 min or the vehicles for the same period as controls. Cells were suspended in a Ca²⁺-free medium (1.2 mM EGTA added) and then treated with 1 μM TG. Samples were removed 5 s before and 3 min after adding TG and the microtubular content was determined as described in material and methods. Values given are the microtubular content expressed as a percentage of the basal content and are presented as means ± S.E.M. of six separate determinations.

^{*} p < 0.01 compared with the microtubular content in non-stimulated cells.
[†] p < 0.05 compared with the microtubular content in cells treated in the absence of inhibitors.

n = 6). Western blotting with the immunoprecipitating antibody confirms a similar amount of protein loaded in all lanes (Fig. 5A and B, bottom panels). In order to investigate whether TG-evoked Ca²⁺ release from the stores is sufficient to activate association between calmodulin and the Ca²⁺ channel proteins Orai1 and TRPC1, we repeated the experiments in a Ca²⁺-free medium. In the absence of extracellular Ca²⁺ treatment with TG significantly enhanced Orai1-calmodulin and TRPC1-calmodulin interaction by 169 ± 26% and 45 ± 10%, respectively, as detected by co-immunoprecipitation (Fig. 5C and D, top panels; p < 0.05; n = 6). TG-induced association between calmodulin and both Orai1 and TRPC1 was significantly greater when the experiments were performed in a medium containing 1 mM Ca²⁺, which allowed Ca²⁺ to enter (Fig. 5, top panels; p < 0.05). TG-evoked association between calmodulin and both Orai1 and TRPC1 was abolished by treatment with Cyt D (Fig. 5C

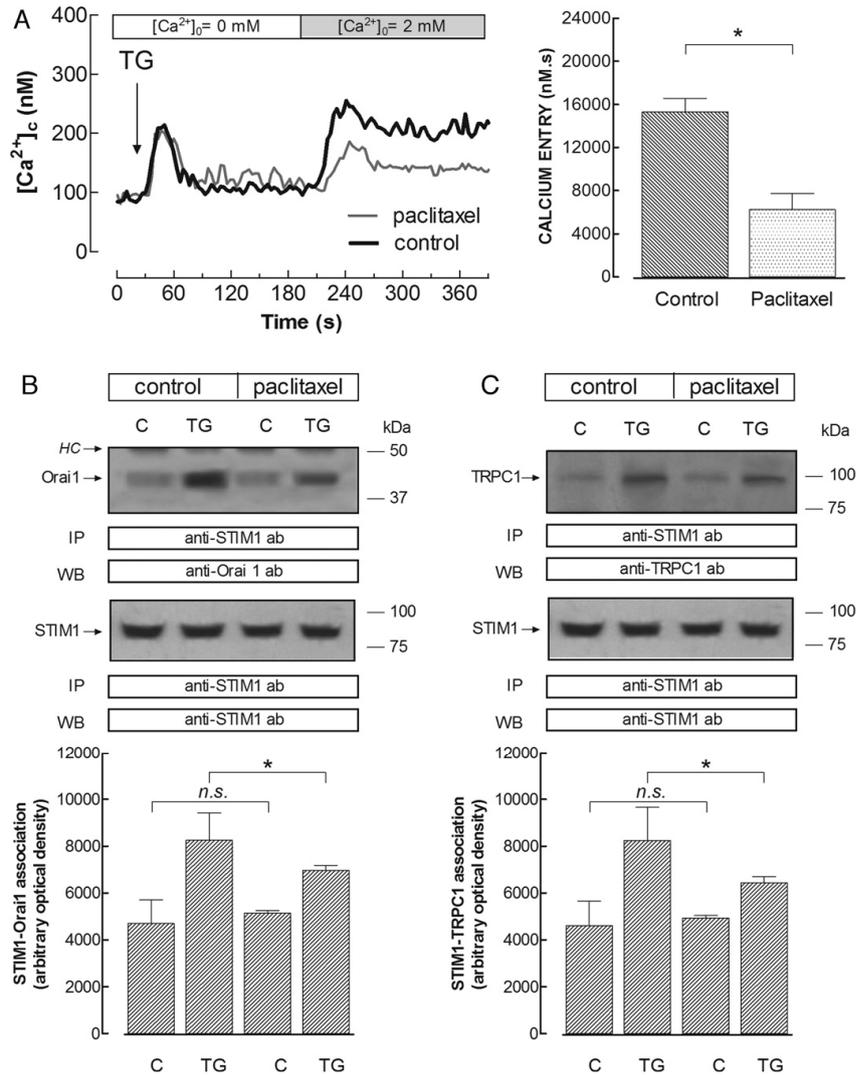


Fig. 2. Effect of paclitaxel on TG-evoked Ca²⁺ entry and association between STIM1 and both Orai1 and TRPC1 in HEK-293 cells. (A) Fura-2-loaded HEK-293 cells (2 × 10⁶ cells/mL) were incubated for 30 min in the absence or presence of 10 μM paclitaxel. At the time of experiment 1.2 mM EGTA was added. Cells were stimulated with 1 μM TG and 3 min later CaCl₂ (2 mM) was added to the medium to initiate Ca²⁺ entry. Histograms indicate Ca²⁺ entry in the presence or absence of paclitaxel, as indicated. Ca²⁺ entry was determined as described in Section 2. Values are means ± S.E.M. of six independent experiments; *p < 0.05. (B and C) HEK-293 cells were preincubated in presence of 10 μM paclitaxel or the vehicle (Control), as indicated, suspended in a Ca²⁺-free medium (1.2 mM EGTA added), stimulated for 3 min with 1 μM TG and lysed. Whole cell lysates were incubated overnight with 2 μg/mL anti-STIM1 antibody and 25 μg/mL protein A-agarose and immunoprecipitates were subjected to 10% SDS-PAGE and subsequent Western blotting with a specific anti-Orai1 (B) or anti-TRPC1 (C) antibody. Membranes were reprobed with the anti-STIM1 antibody for protein loading control (bottom panels). The panels show results from one experiment representative of 5 others. Molecular masses indicated on the right were determined using molecular-mass markers run in the same gel. Histograms represent the quantification of STIM1–Orai1 or STIM1–TRPC1 association in non-stimulated (control) and TG-treated cells. Results are presented as arbitrary optical density units and expressed as means ± S.E.M. *p < 0.05, n.s., non significant. HC, heavy chain of the immunoglobulin used for immunoprecipitation.

and D; p < 0.05; n = 6), thus suggesting that this association requires the integrity of the actin filament network.

Previous studies have reported that calmodulin antagonists potentiate SOCE in pulmonary artery smooth muscle cells [37], and cerebellar granule cells [38] and astrocytes [39]. Hence, we have further investigated the effect of the calmodulin antagonist calmidazolium on TG-evoked Ca²⁺ entry in HEK-293 cells. Our results indicate that treatment for 10 min with 1 μM calmidazolium enhances TG-induced calcium entry by 63 ± 7% (the integral of

the rise in [Ca²⁺]_c for 3 min after addition of CaCl₂ was 25092 ± 356 nM s in calmidazolium-treated cells), without inducing significant changes in TG-evoked Ca²⁺ release (Fig. 6; p < 0.05; n = 6). The effect of calmidazolium was similar to that observed when cells were pretreated with calmidazolium in the presence of Cyt D, which enhanced TG-evoked SOCE by 69 ± 5% (the integral of the rise in [Ca²⁺]_c for 3 min after addition of CaCl₂ was 26034 ± 249 nM s in calmidazolium + Cyt D-treated cells; Fig. 6; p < 0.05; n = 6); thus indicating that the effect of Cyt D enhancing TG-evoked Ca²⁺ entry

Table 2
Effects of Cyt D and jasplakinolide on the F-actin content of unstimulated and TG-stimulated HEK-293 cells.

Stimulatory agent	Control	Cyt D	Jasplakinolide
None	100 ± 0	42 ± 7 [†]	158 ± 7 [†]
TG	141 ± 5 [*]	39 ± 6 [†]	163 ± 6 [†]

HEK-293 cells were incubated with 10 μM cytochalasin D for 40 min, 10 μM jasplakinolide for 30 min or the vehicles for the same period as controls. Cells were suspended in a Ca²⁺-free medium (1.2 mM EGTA added) and then treated with 1 μM TG. Samples were removed 5 s before and 3 min after adding TG and the F-actin content was determined as described in material and methods. Values given are the F-actin content expressed as a percentage of the basal content and are presented as means ± S.E.M. of six separate determinations.

^{*} p < 0.01 compared with the F-actin content in non-stimulated cells.
[†] p < 0.05 compared with the F-actin content in cells treated in the absence of inhibitors.

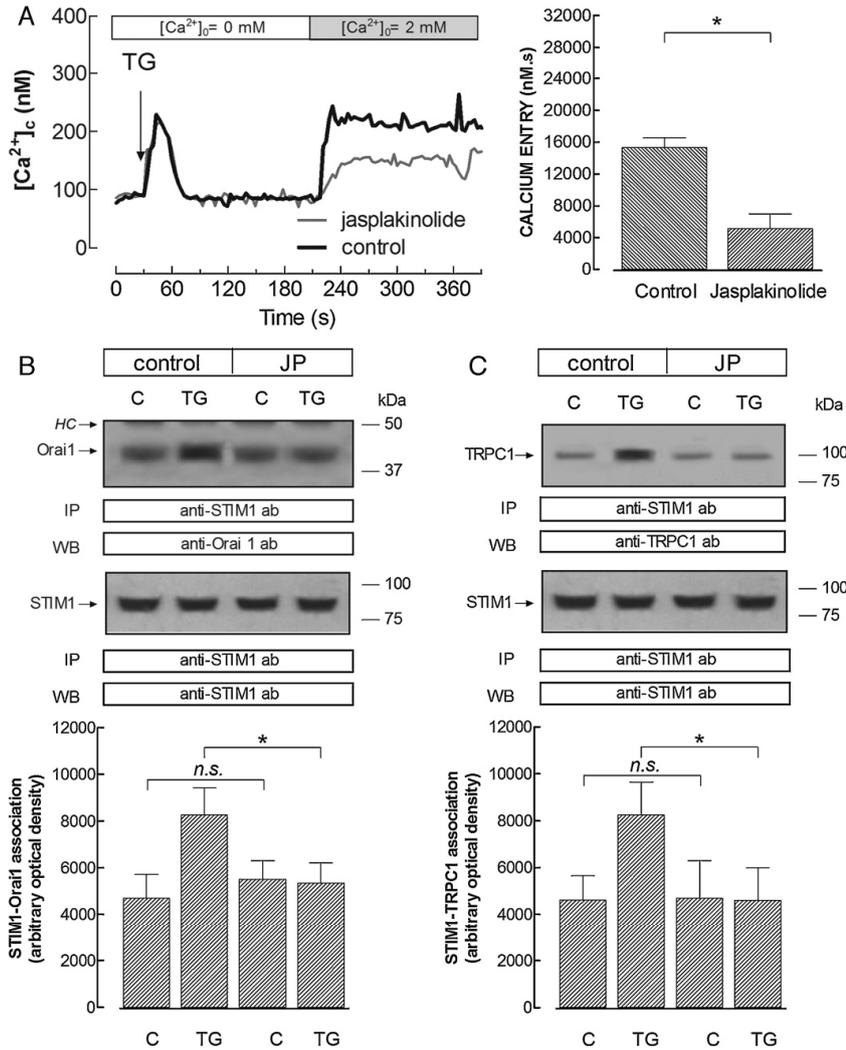


Fig. 3. Effect of jasplakinolide on TG-evoked Ca²⁺ entry and association between STIM1 and both Orai1 and TRPC1 in HEK-293 cells. (A) Fura-2-loaded HEK-293 cells (2 × 10⁶ cells/mL) were incubated for 30 min in the absence or presence of 10 μM jasplakinolide. At the time of experiment 1.2 mM EGTA was added. Cells were stimulated with 1 μM TG and 3 min later CaCl₂ (2 mM) was added to the medium to initiate Ca²⁺ entry. Histograms indicate Ca²⁺ entry in the presence or absence of jasplakinolide, as indicated. Ca²⁺ entry was determined as described in Section 2. Values are means ± S.E.M. of six independent experiments; * p < 0.05. (B and C) HEK-293 cells were preincubated in presence of 10 μM jasplakinolide or the vehicle (Control), as indicated, suspended in a Ca²⁺-free medium (1.2 mM EGTA added), stimulated for 3 min with 1 μM TG and lysed. Whole cell lysates were incubated overnight with 2 μg/mL anti-STIM1 antibody and 25 μg/mL protein A-agarose and immunoprecipitates were subjected to 10% SDS-PAGE and subsequent Western blotting with a specific anti-Orai1 (B) or anti-TRPC1 (C) antibody. Membranes were reprobed with the anti-STIM1 antibody for protein loading control (bottom panels). The panels show results from one experiment representative of 5 others. Molecular masses indicated on the right were determined using molecular-mass markers run in the same gel. Histograms represent the quantification of STIM1–Orai1 or STIM1–TRPC1 association in non-stimulated (control) and TG-treated cells. Results are presented as arbitrary optical density units and expressed as means ± S.E.M. * p < 0.05, n.s., non significant. HC, heavy chain of the immunoglobulin used for immunoprecipitation.

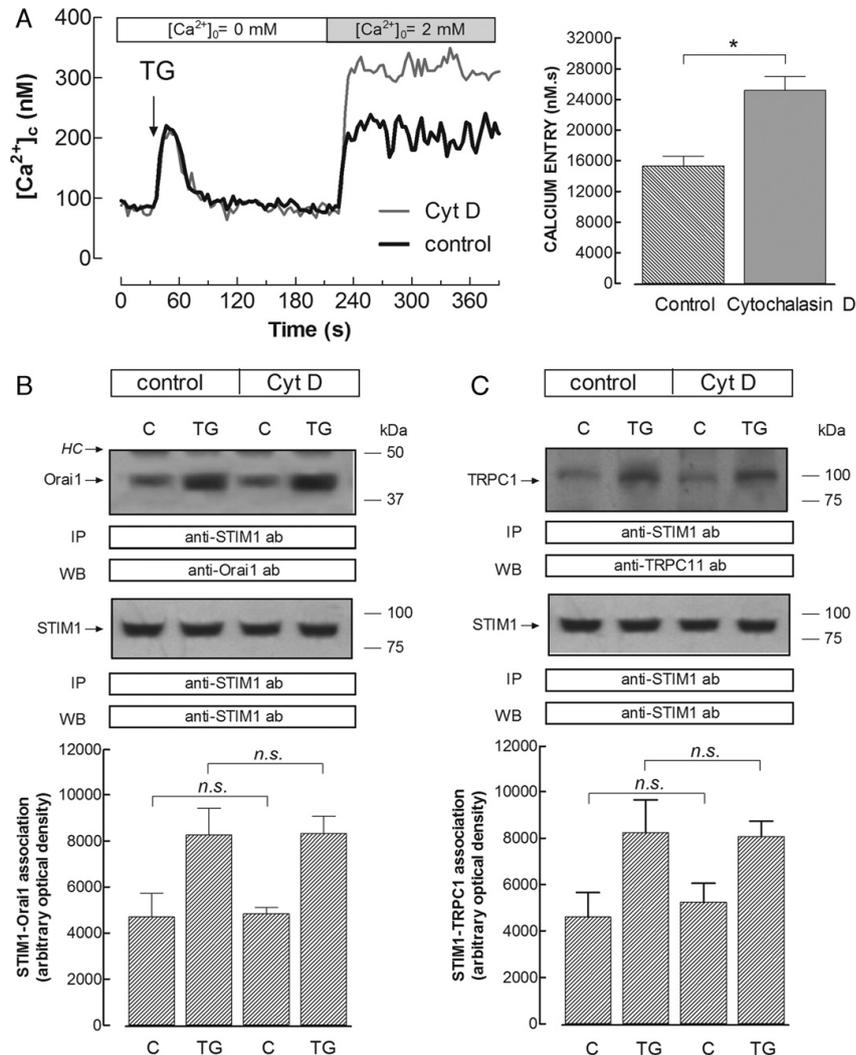


Fig. 4. Effect of cytochalasin D on TG-evoked Ca^{2+} entry and association between STIM1 and both Orai1 and TRPC1 in HEK-293 cells. (A) Fura-2-loaded HEK-293 cells (2×10^6 cells/mL) were incubated for 40 min in the absence or presence of $10 \mu\text{M}$ Cyt D. At the time of experiment 1.2 mM EGTA was added. Cells were stimulated with $1 \mu\text{M}$ TG and 3 min later CaCl_2 (2 mM) was added to the medium to initiate Ca^{2+} entry. Histograms indicate Ca^{2+} entry in the presence or absence of cytochalasin D, as indicated. Ca^{2+} entry was determined as described in Section 2. Values are means \pm S.E.M. of six independent experiments; $p < 0.05$. (B and C) HEK-293 cells were preincubated in presence of $10 \mu\text{M}$ Cyt D or the vehicle (Control), as indicated, suspended in a Ca^{2+} -free medium (1.2 mM EGTA added), stimulated for 3 min with $1 \mu\text{M}$ TG and lysed. Whole cell lysates were incubated overnight with $2 \mu\text{g/mL}$ anti-STIM1 antibody and $25 \mu\text{g/mL}$ protein A-agarose and immunoprecipitates were subjected to 10% SDS-PAGE and subsequent Western blotting with a specific anti-Orai1 (B) or anti-TRPC1 (C) antibody. Membranes were reprobed with the anti-STIM1 antibody for protein loading control. The panels show results from one experiment representative of 5 others. Molecular masses indicated on the right were determined using molecular-mass markers run in the same gel. Histograms represent the quantification of STIM1-Orai1 or STIM1-TRPC1 association in non-stimulated (control) and TG-treated cells. Results are presented as arbitrary optical density units and expressed as means \pm S.E.M. n.s., non significant. HC, heavy chain of the immunoglobulin used for immunoprecipitation.

might be attributed to inhibition of the regulatory role of calmodulin on SOCE.

4. Discussion

The role of the cytoskeleton on the activation of Ca^{2+} entry following the depletion of intracellular Ca^{2+} stores is a complex signalling process of great relevance that has been investigated in a number of cells providing discrepant results. In human platelets,

we have found that microtubules play a dual role in SOCE, acting as a barrier that prevents constitutive SOCE regulated by the dense tubular system, the ER analogue in platelets, and also supporting SOCE mediated by the acidic Ca^{2+} stores [19]. In contrast, in HEK-293 cells microtubules seems to support SOCE and I_{CRAC} , which has been attributed to a role of the microtubules in STIM1 localization [40]. On the other hand, SOCE has been reported to be insensitive to Cyt D, a widely used membrane-permeant inhibitor of actin polymerization, in a number of cells, such as the DDT₁MF-2

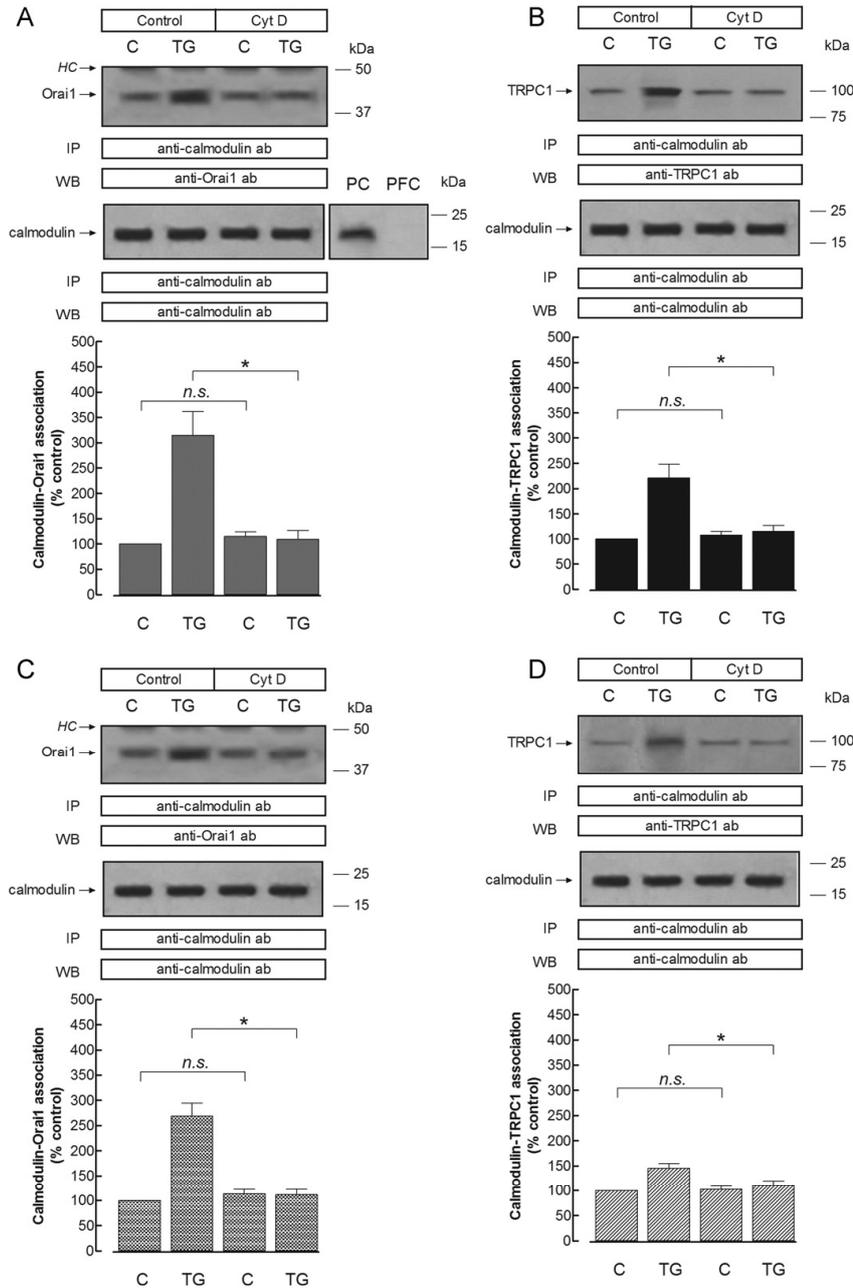


Fig. 5. Effect of cytochalasin D on TG-evoked association between calmodulin and both Orai1 and TRPC1 in HEK-293 cells. HEK-293 cells (2×10^6 cells/mL) were preincubated in presence of $10 \mu\text{M}$ Cyt D or the vehicle (Control), as indicated, and either suspended in a medium containing 1 mM Ca^{2+} (A and B) or suspended in a Ca^{2+} -free medium (1.2 mM EGTA added, C and D). Cells were then stimulated for 3 min with $1 \mu\text{M}$ TG and lysed. Whole cell lysates were incubated overnight with $2 \mu\text{g/mL}$ anti-calmodulin antibody and $25 \mu\text{g/mL}$ protein A-agarose and immunoprecipitates were subjected to 10% SDS-PAGE and subsequent Western blotting with a specific anti-Orai1 or anti-TRPC1 antibody, as indicated. Membranes were reprobbed with the anti-STIM1 antibody for protein loading control (bottom panels). The panels show results from one experiment representative of 5 others. Molecular masses indicated on the right were determined using molecular-mass markers run in the same gel. Histograms represent the quantification of calmodulin-Orai1 or calmodulin-TRPC1 association in non-stimulated (control) and TG-treated cells. Results are presented as percentage of control and expressed as means \pm S.E.M. $p < 0.05$, n.s., non significant. HC, heavy chain of the immunoglobulin used for immunoprecipitation. PC and PFC, primary control and primary-free control, respectively. For PC, whole cell lysates were subjected to 10% SDS-PAGE and subsequent Western blotting with the corresponding primary and secondary antibodies. For PFC, whole cell lysates were subjected to 10% SDS-PAGE and the membrane was subsequently incubated solely with the secondary antibody.

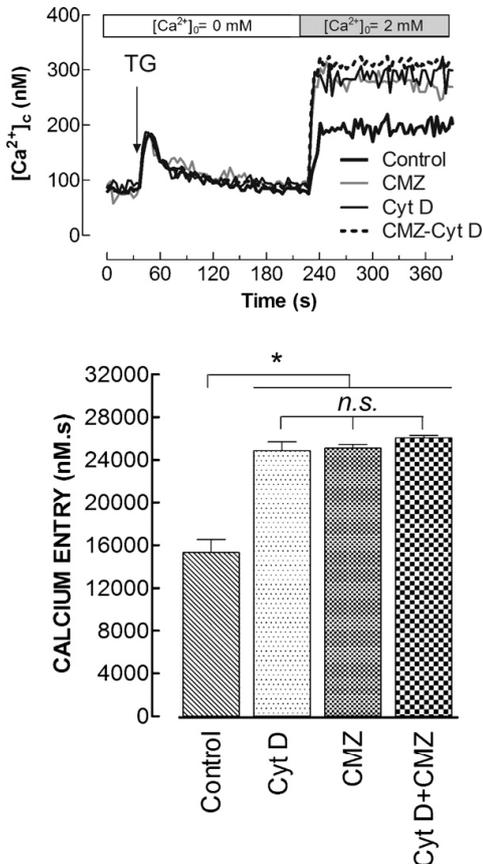


Fig. 6. Effect of calmidazolium and/or cytochalasin D on TG-evoked Ca^{2+} entry in HEK-293 cells. Fura-2-loaded HEK-293 cells (2×10^5 cells/mL) were incubated either for 40 min with 10 μM Cyt D, for 10 min with 1 μM calmidazolium, both or the vehicle as control. At the time of experiment 1.2 mM EGTA was added. Cells were stimulated with 1 μM TG and 3 min later CaCl_2 (2 mM) was added to the medium to initiate Ca^{2+} entry. Histograms indicate Ca^{2+} entry in the presence or absence of Cyt D, calmidazolium or both, as indicated. Ca^{2+} entry was determined as described in materials and methods. Values are means \pm S.E.M. of six independent experiments; * $p < 0.05$. n.s., non significant.

transformed smooth muscle cell line and the nontransformed A7r5 smooth muscle line derived from rat embryonic aorta [14]. In contrast, the actin network plays an important role in SOCE in neutrophils [41], human keratinocytes [42], bovine adrenocortical fasciculata cells [43], glioma C6 cells [44], vascular endothelial cells [20] and human platelets [17,18,45]. In the latter, we have reported a time-dependent effect of Cyt D on platelet SOCE, which is consistent with a dual role for the actin cytoskeleton in SOCE both acting as a negative clamp that prevents constitutive SOCE but also supporting the coupling between elements in the membrane of the ER and Ca^{2+} channels in the plasma membrane [17,18].

We have found that disruption of the actin cytoskeleton by Cyt D or treatment with the microtubule disrupting agent, colchicine, increases TG-evoked SOCE, while stabilization of the cortical actin network or the microtubules using jasplakinolide and paclitaxel, respectively, basically induced opposite effects, attenuating TG-evoked SOCE, as expected. These observations suggest that the actin cytoskeleton and microtubules play an important role in Ca^{2+}

influx, probably acting as a barrier that prevents SOCE in resting cells, as reported in human platelets [19]. A previous study has reported that nocodazole and colchicine reduce TG-evoked SOCE in HEK-293 cells [40]. This apparent contradiction between our observations and those reported by Smyth et al. might be attributed to the fact that both studies estimate SOCE at different stages. In our study, the initiation of Ca^{2+} entry was induced 3 min after the addition of TG, while in the study published by Smyth et al. TG was added to cells suspended in a medium containing Ca^{2+} [40]. Different stages for SOCE have been reported in different cell types, such as pancreatic acinar cells [46] and human platelets [47], the latter differentially regulated by the cytoskeleton [48].

The role of the cytoskeleton in the modulation of SOCE has been attributed to a number of signalling events, including the facilitation of STIM1 localization within the ER [40], probably through its interaction with the microtubule-plus-end-tracking protein EB1 [49], the regulation of TRP channels internalization [41] or by modulating the interaction of TRPC proteins with the type II IP_3 receptor [50,51]. Here, we report for the first time that the cytoskeleton regulates the association of STIM1 with Orai1 and the TRPC1 channels in the plasma membrane. The reported effects of the microtubule altering manoeuvres, either using colchicine or paclitaxel, or those of jasplakinolide, on SOCE are paralleled by a similar modification of the association between STIM1 and the Ca^{2+} channels, and suggest that both the actin filaments and microtubules act as a cortical barrier that prevents the association between STIM1 and the Ca^{2+} channels, as well as SOCE (see Fig. 7), thus disruption of this barrier facilitates the coupling between STIM1 and the Ca^{2+} channels, as well as SOCE, while stabilization of the cortical actin or microtubular networks impairs both events. However, we found that actin filament disruption enhances SOCE without inducing any significant effect on the association between STIM1 and Orai1 or STIM1 and TRPC1. Interestingly, we have found that microfilament disruption results in inhibition of TG-induced association between calmodulin and both Orai1 and TRPC1 (see Fig. 7). Since inhibition of calmodulin results in a similar increase in TG-evoked SOCE than disruption of the actin network our results provide evidence for a role of calmodulin in the regulation of SOCE through its interaction with Orai1 and TRPC1 supported by the actin cytoskeleton. The microtubules must play a further important regulatory role in the association of STIM1 with the Ca^{2+} channels as previously reported [12], since disruption of the microtubules enhances this association, an event that has not been found after inhibition of actin polymerization.

Calmodulin has been reported to interact with TRP proteins, including *Drosophila* TRPL [52] and mammalian TRPC1 [35]. More recently, calmodulin was found to interact with the polybasic C-termini of STIM1 [53] and with a membrane-proximal N-terminal domain of Orai1 [36] in a Ca^{2+} dependent manner. Different experimental manoeuvres have demonstrated that calmodulin is involved in Ca^{2+} -dependent inactivation of SOCE, including expression of TRPC1 or Orai1 mutants lacking the ability to bind calmodulin, which prevented Ca^{2+} -dependent inactivation of SOCE in human salivary gland cells [35], or I_{CRAC} in HEK-293 cells [36], respectively, or over-expression of a calmodulin inhibitor peptide and a Ca^{2+} -insensitive calmodulin mutant, which results in reduced inactivation of I_{SOC} in liver cells [54]. Our results indicate that association of calmodulin with the Ca^{2+} channels Orai1 and TRPC1 requires the integrity of the actin cytoskeleton, which might provide a support for these associations, and, therefore, disruption of the actin network leads to impairment of Ca^{2+} -dependent inactivation of SOCE reported above.

We have not performed experiments to assess whether the effect of the cytoskeleton modifiers is maximal; however, the changes induced in the microtubules and actin filaments are sufficiently evident to demonstrate that the cytoskeleton plays a

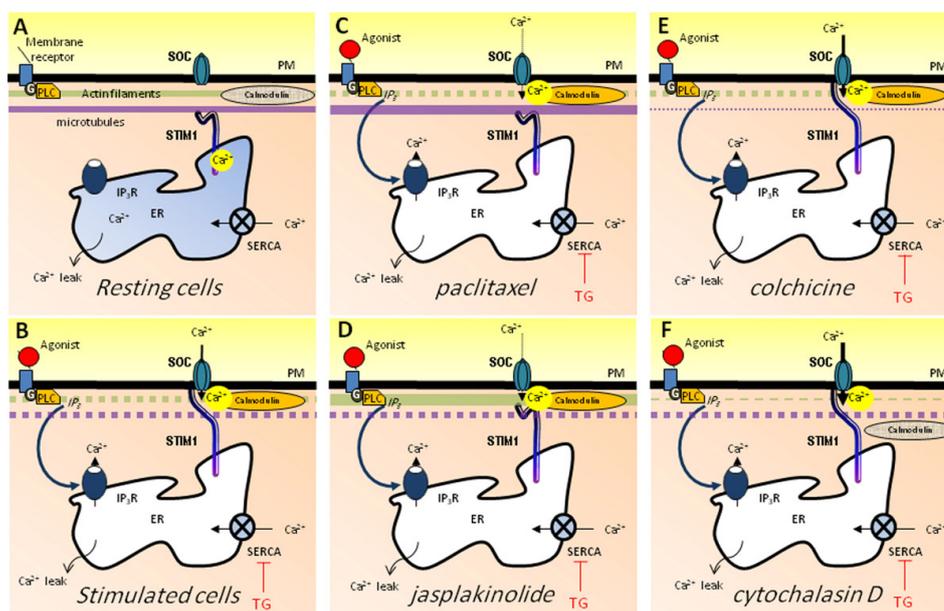


Fig. 7. Proposed model for cytoskeletal remodelling during SOCE in HEK-293 cells. (A) In the resting state the Ca^{2+} stores are full and the actin filaments and microtubules, located beneath the plasma membrane, act as a cortical barrier preventing constitutive association between STIM1 and SOC channels. (B) Cell stimulation with physiological agonists (or inhibition of Ca^{2+} reuptake by SERCA using thapsigargin (TG)) results in discharge of the Ca^{2+} stores leading to remodelling of the actin and microtubular networks to facilitate the association of STIM1 with SOC channels and the activation of SOCE. (C and D) Stabilization of the actin or microtubular peripheral network prevents the association of STIM1 with SOC channels and SOCE. (E) Disruption of the microtubular barrier facilitates agonist (or store-depletion)-induced association events and SOCE. (F) Disruption of the actin filament network enhances agonist-stimulated SOCE by impairing the association of calmodulin with SOC channels. ER, endoplasmic reticulum; G, heterotrimeric G protein; IP_3 , inositol 3,4,5-trisphosphate; IP_3R , IP_3 receptor; PLC, phospholipase C; PM, plasma membrane; SOC, store-operated Ca^{2+} channels (i.e., Orai1 and TRPC1).

relevant role in the regulation of SOCE in HEK-293 cells through the regulation of the interaction between STIM1 and Orai1 or TRPC1. In addition, the actin cytoskeleton supports the association of calmodulin with the Ca^{2+} channels in the plasma membrane, which provides an additional regulatory role of store-operated Ca^{2+} influx.

Conflict of interest

The authors state that there is no conflict of interest.

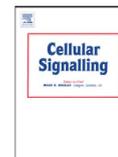
Acknowledgements

Supported by MICINN (Grants BFU2010-21043-C02-01 and BFU2010-21043-C02-02) and Junta de Extremadura – FEDER (GR10010). C.G. and N.D. are supported by Spanish Ministry of Science and Innovation (PTA2008-0870-P) and Junta de Extremadura (PRE09020), respectively.

References

- [1] Putney JW, Bird GS. Cytoplasmic calcium oscillations and store-operated calcium influx. *J Physiol* 2008;586:3055–9.
- [2] Stathopoulos PB, Zheng L, Li GY, Plevin MJ, Ikura M. Structural and mechanistic insights into STIM1-mediated initiation of store-operated calcium entry. *Cell* 2008;135:110–22.
- [3] Zhang SL, Yu Y, Roos J, Kozak JA, Deerinck TJ, Ellisman MH, et al. STIM1 is a Ca^{2+} sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca^{2+} store to the plasma membrane. *Nature* 2005;437:902–5.
- [4] Yuan JP, Zeng W, Dorwart MR, Choi YJ, Worley PF, Muallem S. SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels. *Nat Cell Biol* 2009;11:337–43.
- [5] Park CY, Hoover PJ, Mullins FM, Bachhawat P, Covington ED, Raunser S, et al. STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell* 2009;136:876–90.
- [6] Muik M, Fahrner M, Derler I, Schindl R, Bergsmann J, Frischauf I, et al. A cytosolic homomerization and a modulatory domain within STIM1C terminus determine coupling to Orai1 channels. *J Biol Chem* 2009;284:8421–6.
- [7] Derler I, Fahrner M, Muik M, Lackner B, Schindl R, Groschner K, et al. A CRAC modulatory domain (CMD) within STIM1 mediates fast Ca^{2+} -dependent inactivation of Orai1 channels. *J Biol Chem* 2009.
- [8] Yu F, Sun L, Courjaret R, Machaca K. Role of the STIM1 C-terminal domain in STIM1 clustering. *J Biol Chem* 2011. doi: 10.1074/jbc.M110.188789.
- [9] Muik M, Frischauf I, Derler I, Fahrner M, Bergsmann J, Eder P, et al. Dynamic coupling of the putative coiled-coil domain of Orai1 with STIM1 mediates Orai1 channel activation. *J Biol Chem* 2008;283:8014–22.
- [10] Wang Y, Deng X, Gill DL. Calcium signaling by STIM and Orai: intimate coupling details revealed. *Sci Signal* 2010;3:pe42.
- [11] Zeng W, Yuan JP, Kim MS, Choi YJ, Huang GN, Worley PF, et al. STIM1 gates TRPC channels, but not Orai1, by electrostatic interaction. *Mol Cell* 2008;32:439–48.
- [12] Smyth JT, DeHaven WI, Bird GS, Putney Jr JW. Role of the microtubule cytoskeleton in the function of the store-operated Ca^{2+} channel activator STIM1. *J Cell Sci* 2007;120:3762–71.
- [13] Ribeiro CM, Reece J, Putney Jr JW. Role of the cytoskeleton in calcium signaling in NIH 3T3 cells. An intact cytoskeleton is required for agonist-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ signaling, but not for capacitative calcium entry. *J Biol Chem* 1997;272:26555–61.
- [14] Patterson RL, van Rossum DB, Gill DL. Store-operated Ca^{2+} entry: evidence for a secretion-like coupling model. *Cell* 1999;98:487–99.
- [15] Bakowski D, Glitsch MD, Parekh AB. An examination of the secretion-like coupling model for the activation of the Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} current (CRAC) in RBL-1 cells. *J Physiol* 2001;532:55–71.
- [16] Baba Y, Hayashi K, Fujii Y, Mizushima A, Watarai H, Wakamori M, et al. Coupling of STIM1 to store-operated Ca^{2+} entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:16704–9.
- [17] Rosado JA, Jenner S, Sage SO. 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* 2000;275:7527–33.
- [18] Rosado JA, Lopez JJ, Harper AG, Harper MT, Redondo PC, Pariente JA, et al. Two pathways for store-mediated calcium entry differentially dependent

- on the actin cytoskeleton in human platelets. *J Biol Chem* 2004;279:29231–5.
- [19] Redondo PC, Harper AG, Sage SO, Rosado JA. Dual role of tubulin-cytoskeleton in store-operated calcium entry in human platelets. *Cell Signal* 2007;19:2147–54.
- [20] Holda JR, Blatter LA. Capacitative calcium entry is inhibited in vascular endothelial cells by disruption of cytoskeletal microfilaments. *FEBS Lett* 1997;403:191–6.
- [21] Redondo PC, Lajas AI, Salido GM, Gonzalez A, Rosado JA, Pariente JA. Evidence for secretion-like coupling involving pp60src in the activation and maintenance of store-mediated Ca^{2+} entry in mouse pancreatic acinar cells. *Biochem J* 2003;370:255–63.
- [22] Redondo PC, Harper MT, Rosado JA, Sage SO. A role for cofilin in the activation of store-operated calcium entry by de novo conformational coupling in human platelets. *Blood* 2006;107:973–9.
- [23] Redondo PC, Ben-Amor N, Salido GM, Bartegi A, Pariente JA, Rosado JA. Ca^{2+} -independent activation of Bruton's tyrosine kinase is required for store-mediated Ca^{2+} entry in human platelets. *Cell Signal* 2005;17:1011–21.
- [24] Heemskerk JW, Feijge MA, Henneman L, Rosing J, Hemker HC. The Ca^{2+} -mobilizing potency of alpha-thrombin and thrombin-receptor-activating peptide on human platelets – concentration and time effects of thrombin-induced Ca^{2+} signaling. *Eur J Biochem* 1997;249:547–55.
- [25] Jardin I, Ben-Amor N, Bartegi A, Pariente JA, Salido GM, Rosado JA. Differential involvement of thrombin receptors in Ca^{2+} release from two different intracellular stores in human platelets. *Biochem J* 2007;401:167–74.
- [26] Jardin I, Redondo PC, Salido GM, Rosado JA. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate enhances store-operated calcium entry through hTRPC6 channel in human platelets. *Biochim Biophys Acta* 2008;1783:84–97.
- [27] Woodard GE, Lopez JJ, Jardin I, Salido GM, Rosado JA. 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* 2010;285:8045–53.
- [28] De Felice FG, Velasco PT, Lambert MP, Viola K, Fernandez SJ, Ferreira ST, et al. Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *J Biol Chem* 2007;282:11590–601.
- [29] Bouaziz A, Amor NB, Woodard GE, Zibidi H, Lopez JJ, Bartegi A, et al. Tyrosine phosphorylation/dephosphorylation balance is involved in thrombin-evoked microtubular reorganisation in human platelets. *Thromb Haemost* 2007;98:375–84.
- [30] Canizares C, Vivar N, Herdoiza M. Role of the microtubular system in platelet aggregation. *Braz J Med Biol Res* 1994;27:1533–51.
- [31] White JG, Krumwiede M, Sauk JJ. Microtubule reassembly in surface-activated platelets. *Blood* 1985;65:1494–503.
- [32] Parekh H, Simpkins H. The transport and binding of taxol. *Gen Pharmacol* 1997;29:167–72.
- [33] Rosado JA, Sage SO. The actin cytoskeleton in store-mediated calcium entry. *J Physiol* 2000;526(Pt 2):221–9.
- [34] Rosado JA, Sage SO. Farnesylcysteine analogues inhibit store-regulated Ca^{2+} entry in human platelets: evidence for involvement of small GTP-binding proteins and actin cytoskeleton. *Biochem J* 2000;347(Pt 1):183–92.
- [35] Singh BB, Liu X, Tang J, Zhu MX, Ambudkar IS. 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* 2002;9:739–50.
- [36] Mullins FM, Park CY, Dolmetsch RE, Lewis RS. STIM1 and calmodulin interact with Orai1 to induce Ca^{2+} -dependent inactivation of CRAC channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:15495–500.
- [37] McElroy SP, Drummond RM, Gurney AM. Regulation of store-operated Ca^{2+} entry in pulmonary artery smooth muscle cells. *Cell Calcium* 2009;46:99–106.
- [38] Singaravelu K, Lohr C, Deitmer JW. Calcium-independent phospholipase A2 mediates store-operated calcium entry in rat cerebellar granule cells. *Cerebellum* 2008;7:467–81.
- [39] Singaravelu K, Lohr C, Deitmer JW. Regulation of store-operated calcium entry by calcium-independent phospholipase A2 in rat cerebellar astrocytes. *J Neurosci* 2006;26:9579–92.
- [40] Smyth JT, Dehaven WI, Bird GS, Putney Jr JW. Ca^{2+} -store-dependent and -independent reversal of Stim1 localization and function. *J Cell Sci* 2008;121:762–72.
- [41] Itagaki K, Kannan KB, Singh BB, Hauser CJ. Cytoskeletal reorganization internalizes multiple transient receptor potential channels and blocks calcium entry into human neutrophils. *J Immunol* 2004;172:601–7.
- [42] Korkiamaki T, Yla-Outinen H, Koivunen J, Peltonen J. An intact actin-containing cytoskeleton is required for capacitative calcium entry, but not for ATP-induced calcium-mediated cell signaling in cultured human keratinocytes. *Med Sci Monit* 2003;9:BR199–207.
- [43] Kawamura M, Terasaka O, Ebisawa T, Kondo I, Masaki E, Ahmed A, et al. Integrity of actin-network is involved in uridine 5'-triphosphate evoked store-operated Ca^{2+} entry in bovine adrenocortical fasciculata cells. *J Pharmacol Sci* 2003;91:23–33.
- [44] Sabala P, Targos B, Caravelli A, Czajkowski R, Lim D, Gragnaniello G, et al. Role of the actin cytoskeleton in store-mediated calcium entry in glioma C6 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296:484–91.
- [45] Harper AG, Sage SO. A key role for reverse Na^{+}/Ca^{2+} exchange influenced by the actin cytoskeleton in store-operated Ca^{2+} entry in human platelets: evidence against the de novo conformational coupling hypothesis. *Cell Calcium* 2007;42:606–17.
- [46] Camello C, Pariente JA, Salido GM, Camello PJ. Sequential activation of different Ca^{2+} entry pathways upon cholinergic stimulation in mouse pancreatic acinar cells. *J Physiol* 1999;516(Pt 2):399–408.
- [47] Jenner S, Sage SO. Two pathways for store-mediated calcium entry in human platelets. *Platelets* 2000;11:215–21.
- [48] Jardin I, Lopez JJ, Salido GM, Rosado JA. Functional relevance of the de novo coupling between hTRPC1 and type II IP3 receptor in store-operated Ca^{2+} entry in human platelets. *Cell Signal* 2008;20:737–47.
- [49] Grigoriev I, Gouveia SM, van der Vaart B, Demmers J, Smyth JT, Honnappa S, et al. STIM1 is a MT-plus-end-tracking protein involved in remodeling of the ER. *Curr Biol* 2008;18:177–82.
- [50] Rosado JA, Brownlow SL, Sage SO. Endogenously expressed Trp1 is involved in store-mediated Ca^{2+} entry by conformational coupling in human platelets. *J Biol Chem* 2002;277:42157–63.
- [51] Rosado JA, Sage SO. 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* 2001;356:191–8.
- [52] Phillips AM, Bull A, Kelly LE. Identification of a Drosophila gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the trp phototransduction gene. *Neuron* 1992;8:631–42.
- [53] Bauer MC, O'Connell D, Cahill DJ, Linse S. Calmodulin binding to the polybasic C-termini of STIM proteins involved in store-operated calcium entry. *Biochemistry* 2008;47:6089–91.
- [54] Litjens T, Harland ML, Roberts ML, Barritt GJ, Rychkov GY. Fast $Ca(2+)$ -dependent inactivation of the store-operated Ca^{2+} current (ISOC) in liver cells: a role for calmodulin. *J Physiol* 2004;558:85–97.



Functional role of the calmodulin- and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-binding (CIRB) site of TRPC6 in human platelet activation

N. Dionisio^a, L. Albarran^a, A. Berna-Erro^a, J.M. Hernandez-Cruz^b, G.M. Salido^a, J.A. Rosado^{a,*}

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

^b Laboratorio de Análisis Clínicos Hernandez-Cruz, Cáceres, 10003, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 June 2011

Accepted 27 June 2011

Available online 3 July 2011

Keywords:

CIRB

TRPC6

Human platelets

Calmodulin

IP₃ receptors

Calcium

Aggregation

ABSTRACT

Background: All identified mammalian TRPC channels show a C-terminal calmodulin (CaM)- and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors (IP₃Rs)-binding (CIRB) site involved in the regulation of TRPC channel function. **Objectives:** To assess the basis of CaM/IP₃Rs binding to the CIRB site of TRPC6 and its role in platelet physiology. **Methods:** Protein association was detected by co-immunoprecipitation and Western blotting. Ca²⁺ mobilization was measured by fluorimetric techniques and platelet function was analyzed by aggregometry. **Results:** Co-immunoprecipitation of TRPC6 with CaM or the IP₃Rs at different cytosolic free Ca²⁺ concentrations ([Ca²⁺]_c) indicates that the association between these proteins is finely regulated by cytosolic Ca²⁺ via association of CaM and displacement of the IP₃Rs at high [Ca²⁺]_c. Thrombin-stimulated association of TRPC6 with CaM or the IP₃Rs was sensitive to 2-APB and partially inhibited by dimethyl BAPTA loading, thus suggesting that the association between these proteins occurs through both Ca²⁺-dependent and -independent mechanisms. Incorporation of an anti-TRPC6 C-terminal antibody, whose epitope overlaps the CIRB region, impaired the dynamics of the association of TRPC6 with CaM and the IP₃Rs, which lead to both inhibition and enhancement of thrombin- and thapsigargin-evoked Ca²⁺ entry in the presence of low or high, respectively, extracellular Ca²⁺ concentrations, as well as altered thrombin-evoked platelet aggregation. **Conclusions:** Our results indicate that the CIRB site of TRPC6 plays an important functional role in platelets both modulating Ca²⁺ entry and aggregation through its interaction with CaM and IP₃Rs.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

TRPC proteins are components of the Ca²⁺ entry machinery in different cell types and participate in the regulation of a number of cell processes, including endothelial cell function, smooth muscle contraction and platelet aggregation [1–3]. TRPC function has been reported to be influenced by different factors including intracellular and extracellular Ca²⁺ [4]. Extracellular Ca²⁺ plays a negative role on agonist-induced TRPC3- and TRPC7-mediated currents [5,6]; however, external Ca²⁺ accelerates the activation and inactivation of TRPC6 [6]. In addition, cytosolic free Ca²⁺ has been shown to be necessary for the activation of TRPC proteins, such as TRPC5 [7]. The regulation of TRPC function by Ca²⁺ might involve Ca²⁺-binding proteins such as calmodulin (CaM), which has been reported to induce Ca²⁺-dependent feedback inactivation of TRPC channels through the interaction with the TRPC C-terminal CaM- and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors (IP₃Rs)-binding (CIRB) site [8–10].

CaM has been reported to regulate a number of intracellular proteins, including ion channels, in a Ca²⁺-dependent manner [4]. The

interaction of TRP channels with CaM was described in *Drosophila* by Phillips and coworkers in the early 90s [11], suggesting that regulation of TRP protein function by Ca²⁺ is a conserved mechanism. Although multiple CaM-binding domains have been identified both in the N- and C-terminus of distinct TRPCs [12,13], only one of the C-terminal CaM binding sites has been reported to associate with IP₃Rs, the so called CIRB site [12], competing with each other in a Ca²⁺-dependent manner for binding to the TRPC CIRB site. At resting low cytosolic free Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_c) the CIRB site has been reported to be predominantly associated to IP₃Rs, which allows activation of TRPC proteins by conformational coupling [4,14–16]. Agonist-induced rises in [Ca²⁺]_c enhances the affinity of CaM for the TRPC CIRB site although whether CaM displaces IP₃Rs in the presence of IP₃ remains unclear [4], since previous studies using the TRPC-binding site of type 3 IP₃Rs have reported that, when activated, the association between IP₃Rs and the CIRB site is stable even in the presence of high Ca²⁺ concentrations [8,12].

All identified mammalian TRPC channels, as well as *Drosophila* TRP and TRPL, show a C-terminal CIRB site and different studies have demonstrated that association of CaM to the CIRB site inhibits the function of different TRPC proteins, including TRPC1 [9], TRPC3 [8] and TRPC4 [12]; however, little is known about the regulation of the TRPC6 function through the association of CaM/IP₃Rs to the CIRB site.

* Corresponding author at: Department of Physiology, University of Extremadura, Cáceres 10003, Spain. Tel.: +34 927 257139; fax: +34 927257110.
E-mail address: jarosado@unex.es (J.A. Rosado).

Hence, the aim of the present study was to assess the basis of CaM/IP₃Rs binding to the CIRB site of TRPC6 and the functional role of the TRPC6 CIRB site in human platelets.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Fura-2 acetoxymethyl ester (fura-2/AM) and 5,5'-dimethyl BAPTA/AM were from Invitrogen (Barcelona, Spain). Apyrase (grade VII), aspirin, thrombin, thapsigargin (TG), 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB), sodium dodecyl sulfate (SDS), ionic detergent tween 20, ionomycin and bovine serum albumin (BSA) were from Sigma (Madrid, Spain). Anti-IP₃Rs I/II/III (H-300) antibody, anti-TRPC6 (S-20) C-terminal antibody, control antigen peptide (CAP) for the anti-TRPC6 (S-20) antibody and goat anti-rabbit IgG antibody were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, U.S.A.). Monoclonal anti-hTRPC6 antibody raised against residues 300–400 of TRPC6 monoclonal anti-calmodulin (J4D8) antibody were from Abcam (Cambridge, U.K.). Horseradish peroxidase-conjugated secondary anti-mouse IgG and anti-goat IgG antibodies and hyperfilm ECL were from GE Healthcare UK Ltd (Barcelona, Spain). Molecular weight markers were from Bio-Rad (Madrid, Spain). 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

Blood was obtained from drug-free healthy volunteers as approved by Local Ethical Committees and in accordance with the Declaration of Helsinki. Platelet-rich plasma was prepared by blood centrifugation and aspirin (100 μM) and apyrase (40 μg/mL) were added. Cells were collected by centrifugation and resuspended in HEPES-buffered saline, pH 7.45, containing (in mM): 145 NaCl, 10 HEPES, 10 D-glucose, 5 KCl, 1 Mg₂SO₄ and supplemented with 0.1% BSA and 40 μg/mL apyrase.

2.3. Protein immunoprecipitation and Western blotting

Aliquots (500 μl) of platelet suspension (10⁹ cells/mL) were lysed and immunoprecipitated by incubation with 2 μg/mL anti-TRPC6 antibody (Abcam) and 25 μl protein A-agarose overnight at 4 °C. Immunoprecipitates were resolved by 4–20% SDS-PAGE. Separated proteins were electrophoretically transferred onto nitrocellulose membrane for subsequent incubation with anti-TRPC6 antibody diluted 1:200 in TBST overnight or with anti-IP₃Rs I/II/III or anti-calmodulin antibodies diluted 1:500 in TBST overnight. The primary antibody was detected by incubation with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated anti-IgG antibody diluted 1:10000 for 1 h, and exposed to ECL solution. The optical densities of proteins in the blots were estimated using Image J (Windows version; National Institutes of Health) as previously described [16].

2.4. Reversible electroporation procedure

The platelet suspension was transferred to an electroporation chamber containing the anti-TRPC6 antibody (Santa Cruz) at a final concentration of 1 μg/mL, and the antibody was transfected according to published methods [17,18]. Reversible electroporation was performed at 4 kV/cm at a setting of 25-microfarad capacitance and was achieved by 7 pulses using a Bio-Rad Gene Pulser Xcell Electroporation System (Bio-Rad, Madrid, Spain). Following electroporation, cells were incubated with anti-TRPC6 antibody for an additional 60 min at 37 °C, centrifuged at 350×g for 20 min and resuspended in HBS prior to the experiments.

2.5. Measurement of cytosolic free Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_c)

Fluorescence was recorded from 2 mL aliquots of magnetically stirred cell suspensions (10⁸ cells/mL) at 37 °C using a Cary Eclipse spectrophotometer (Varian Ltd, Madrid, Spain) with excitation at 340 and 380 nm and emission at 505 nm. Changes in 340/380 nm fura-2 fluorescence ratio were calibrated in terms of [Ca²⁺]_c [19]. Ca²⁺ entry was estimated as the integral of the rise in [Ca²⁺]_c for two minutes after its addition, taking a sample every second.

2.6. Platelet aggregation

Aggregation in washed platelets was monitored using a Chronolog (Havertown, Pa, U.S.A.) aggregometer at 37 °C under stirring at 1200 rpm [20]. The percentage of aggregation (or amplitude) is estimated as the percentage of the difference in light transmission between the platelet suspension in HBS and HBS alone and indicates the percentage of platelets that aggregate in response to an agonist. The rate (or slope) of the aggregation is the percentage change of aggregation per minute.

2.7. Statistical analysis

Results are expressed as mean ± S.E.M. Analysis of statistical significance was performed using Student's *t*-test. *P* < 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Regulation of the interaction of TRPC6 with CaM and IP₃Rs by cytosolic Ca²⁺

We have analyzed association of TRPC6 with either CaM or IP₃Rs by co-immunoprecipitation of whole cell lysates using an anti-TRPC6 antibody and Western blotting using specific anti-IP₃RI/II/III or anti-CaM antibodies in the presence of various [Ca²⁺]_c. In order to set different [Ca²⁺]_c cells were treated with the Ca²⁺ ionophore ionomycin (500 nM) in the presence of increasing extracellular Ca²⁺ concentrations ([Ca²⁺]_o = 0–1000 μM). Treatment of platelets with ionomycin in the presence of extracellular Ca²⁺ induced a sustained increase in [Ca²⁺]_c reaching a plateau at 115 ± 8, 478 ± 23, 746 ± 104 and 1473 ± 46 nM at [Ca²⁺]_o of 0, 3, 50 and 1000 μM, respectively (Fig. 1A). Following this experimental maneuver, we have found that co-immunoprecipitation between TRPC6 and CaM is directly proportional to the [Ca²⁺]_c, while the interaction of TRPC6 with IP₃Rs is inversely proportional to the [Ca²⁺]_c (Fig. 1B; *P* < 0.01, *n* = 4–6). Reprobing of the same membranes with anti-TRPC6 antibody revealed a comparable amount of proteins in all lanes. These findings suggest that [Ca²⁺]_c *per se* modifies the interaction of TRPC6 with CaM and IP₃Rs.

3.2. Effect of cytosolic Ca²⁺ and 2-APB on thrombin-stimulated association of TRPC6 with CaM and IP₃Rs

Since changes in [Ca²⁺]_c regulate the association of IP₃Rs or CaM to TRPC6 we have investigated whether free cytosolic Ca²⁺ is a requirement for this association by performing experiments in cells loaded with the intracellular Ca²⁺ chelator dimethyl-BAPTA. Cells were stimulated with the physiological agonist thrombin in order to induce generation of IP₃. As depicted in Fig. 2, in a Ca²⁺-free medium (100 μM EGTA added), thrombin stimulates a significant association between the IP₃Rs and TRPC6 as detected by co-immunoprecipitation (Fig. 2A; *P* < 0.05, *n* = 6), while reducing the interaction of TRPC6 with CaM (Fig. 2B; *P* < 0.05, *n* = 6). Interestingly, we have found that thrombin-induced modifications in the interaction between TRPC6 and IP₃Rs or CaM in the absence of extracellular Ca²⁺ was significantly

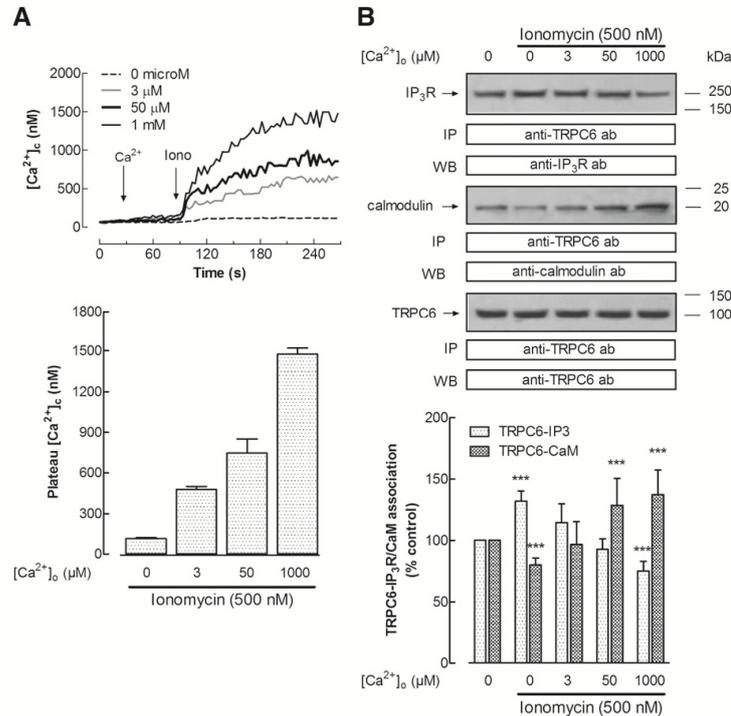


Fig. 1. Cytosolic Ca^{2+} concentration regulates the association of calmodulin and IP_3 Rs to the CIRB site of TRPC6. (A) Fura 2-loaded human platelets were stimulated with ionomycin (500 nM) in the presence of increasing concentrations of extracellular Ca^{2+} (0–1000 μM). Elevations in $[Ca^{2+}]_c$ were monitored by using the 340-to-380 nm ratio and traces were calibrated in terms of $[Ca^{2+}]_o$. The traces shown are representative of six separate experiments. Histograms represent the mean plateau $[Ca^{2+}]_c$ reached at the different extracellular Ca^{2+} concentrations ($[Ca^{2+}]_o$). (B) Platelets were stimulated for 3 min with ionomycin (500 nM) in the presence of increasing concentrations of extracellular Ca^{2+} (0–1000 μM) or left untreated in a Ca^{2+} -free medium, as indicated, and lysed. Platelet lysates were immunoprecipitated using anti-TRPC6 antibody followed by Western blotting using anti- IP_3 Rs (top panel), anti-CaM (middle panel) or anti-hTRPC6 (bottom panel) antibodies. Histograms represent association between TRPC6 and IP_3 R or CaM expressed as percentage of control (cells not treated with ionomycin). Values are means \pm S.E.M.; significance values indicate differences compared with cells not treated with ionomycin. *** $P < 0.001$ compared to cells not treated with ionomycin.

smaller than in the presence of 1.2 mM external Ca^{2+} (see histograms 1 and 2 in Fig. 2A vs. Fig. 2C and B vs. Fig. 2D). As shown in Fig. 2A and B, dimethyl BAPTA loading did not alter thrombin-induced interaction of TRPC6 with IP_3 Rs or CaM. Altogether, our results suggest that thrombin-induced interaction between TRPC6 and IP_3 Rs or CaM has both Ca^{2+} -dependent and -independent pathways.

We have further investigated whether activation of IP_3 Rs is essential for its interaction with TRPC6 by using the IP_3 Rs antagonist 2-APB. In the presence of 1.2 mM Ca^{2+} platelets stimulation with thrombin results in a significant increase in the association of TRPC6 with the IP_3 Rs (Fig. 2C) while decreased the association of TRPC6 with CaM (Fig. 2D). Treatment for 10 min with 100 μM 2-APB reduced thrombin-evoked association of TRPC6 with the IP_3 Rs by 69% and attenuated thrombin-stimulated dissociation of CaM from TRPC6 by 80% as compared to control (cells not treated with 2-APB; Fig. 2C and D); thus suggesting that IP_3 Rs activation plays an important role in thrombin-induced interaction of TRPC6 with IP_3 Rs and CaM.

3.3. Effect of electrotransfection with anti-TRPC6 antibody on thrombin-evoked both association of TRPC6 with IP_3 Rs and CaM and Ca^{2+} entry

Next we have explored the functional role of the CIRB site of TRPC6 in platelet function. Since platelets do not allow the use of molecular biology techniques, we have investigated whether introduction of the anti-TRPC6 C-terminal antibody (Santa Cruz Biotechnology), which, according to the manufacturer's instructions, overlaps with the CIRB

site, is able to impair thrombin-mediated changes in the association between TRPC6 and IP_3 Rs or CaM, as well as platelet function. To assess this possibility, the anti-TRPC6 antibody was introduced into platelets by reversible electroporation, a technique that we have successfully used for transferring peptides and antibodies into human platelets while maintaining the physiological integrity of the cells [18,21], as well as other authors in different cell types [17,22]. Platelets were treated with 1 U/mL thrombin in the presence of low (300 μM) and high (1.2 mM) $[Ca^{2+}]_o$ in order to induce two quantitatively different rises in $[Ca^{2+}]_c$ as depicted in Fig. 3C and D.

As shown in Fig. 3A, introduction of the anti-TRPC6 antibody into cells impaired the effect of thrombin on the association of TRPC6 with IP_3 Rs and dissociation from CaM both at low and high $[Ca^{2+}]_o$ (Fig. 3A and B; $P < 0.05$, $n = 4$). The effect of the anti-TRPC6 antibody was almost completely prevented when the antibody was previously incubated for 1 h in the presence of the CAP (1 $\mu g/mL$); which suggest that the antibody specifically blocks the TRPC6 CIRB site and is an interesting tool to further investigate its functional relevance in human platelets.

Next we have investigated the effect of introduction of the anti-TRPC6 antibody into platelets in thrombin-induced Ca^{2+} mobilization. In a Ca^{2+} -free medium, stimulation of platelets with 1 U/mL thrombin results in a rapid and transient increase in $[Ca^{2+}]_c$ and subsequent addition of Ca^{2+} to the external medium (to reach a low (300 μM) or high (1.2 mM) $[Ca^{2+}]_o$) induced a sustained increase in $[Ca^{2+}]_c$ indicative of Ca^{2+} entry (Fig. 3C and 3D). Introduction of the

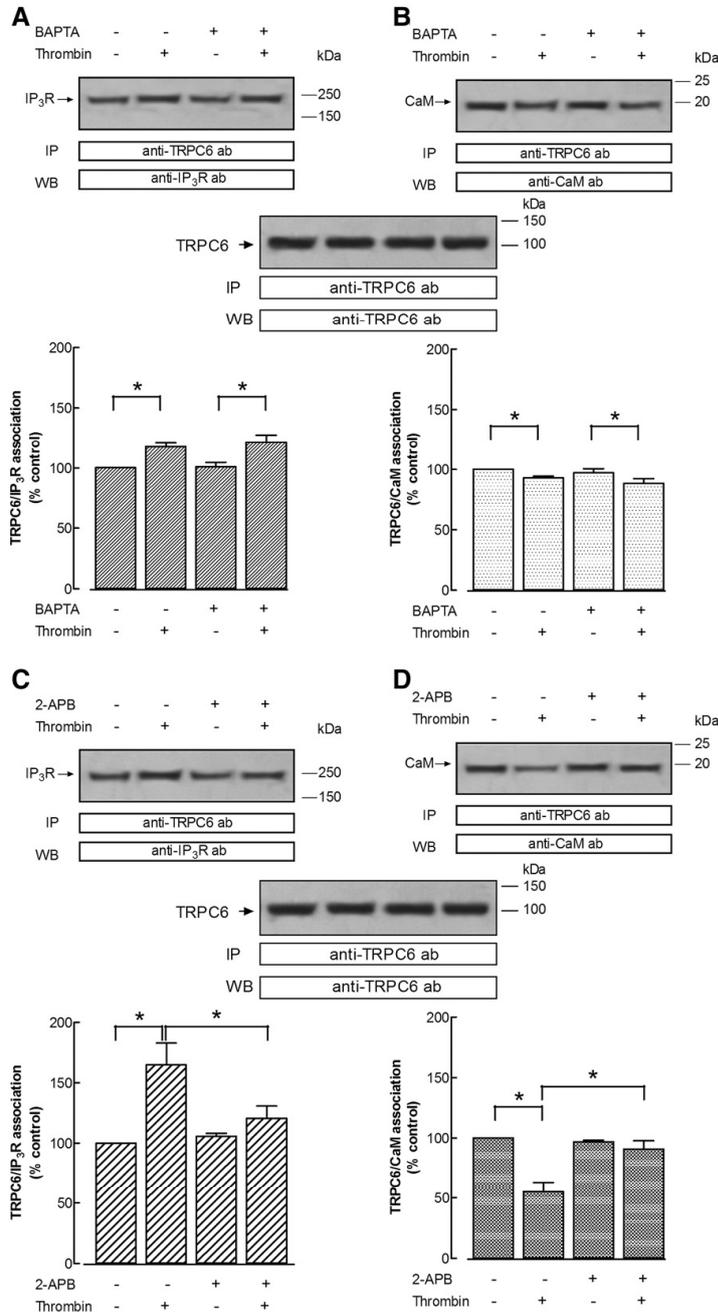


Fig. 2. Effect of dimethyl BAPTA-loading and/or 2-APB on the association of calmodulin and IP₃Rs to the CIRB site of TRPC6. Human platelets were suspended in a Ca²⁺-free medium (100 μM EGTA added; A and B) or in a medium containing 1.2 mM Ca²⁺ (C and D). Cells were either loaded with dimethyl-BAPTA and suspended in a Ca²⁺-free medium (histograms 3 and 4; A and B), treated for 10 min with 100 μM 2-APB in a medium containing 1.2 mM Ca²⁺ (histograms 3 and 4; C and D) or left untreated but otherwise treated in the same way, as indicated (histograms 1 and 2). Cells were then stimulated with 1 U/mL thrombin for 3 min and lysed. Whole cell lysates were immunoprecipitated (IP) with anti-TRPC6 antibody and immunoprecipitates were analyzed by Western blotting (WB) using anti-IP₃Rs antibody (A and C) or anti-CaM antibody (B and D) and reprobed with anti-TRPC6 antibody (bottom panels). Positions of molecular mass markers are shown on the right. Histograms represent association between TRPC6 and IP₃R or CaM expressed as percentage of control (untreated cells). These results are representative of six independent experiments.

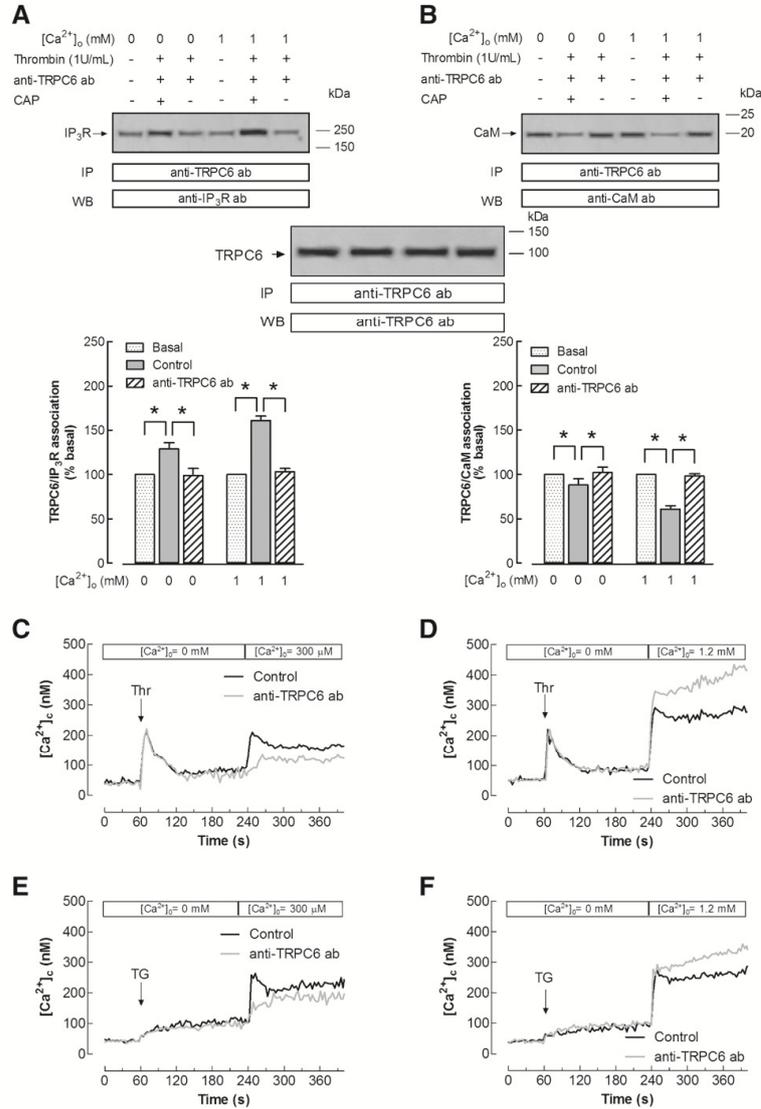


Fig. 3. Introduction of the anti-TRPC6 antibody induces [Ca²⁺]_o-dependent changes in TG- and thrombin-induced Ca²⁺ entry. (A and B) Platelets were electroporated in a Gene Pulser and either left untreated (Basal) or incubated with 1 μg/mL anti-TRPC6 antibody (Santa Cruz; anti-TRPC6 ab) neutralized by incubation for 1 h with 1 μg/mL CAP (Control) or with 1 μg/mL anti-TRPC6 antibody (anti-TRPC6 ab) for 60 min as indicated. Cells electroporated in the presence of the antibody were incubated for 3 min with 1 U/mL thrombin in a Ca²⁺-free medium or in the presence of 1 mM external Ca²⁺ and lysed. Whole cell lysates were immunoprecipitated (IP) with anti-TRPC6 antibody (Abcam) and immunoprecipitates were analyzed by Western blotting (WB) using anti-IP₃R antibody (A) or anti-CaM antibody (B) and reprobed with anti-TRPC6 antibody (Abcam; bottom panel). Positions of molecular mass markers are shown on the right. Histograms represent association between TRPC6 and IP₃R or CaM expressed as percentage of basal. These results are representative of six independent experiments. (C–F) Fura 2-loaded human platelets were electroporated and incubated with 1 μg/mL anti-TRPC6 antibody (Santa Cruz) neutralized by incubation for 1 h with 1 μg/mL CAP (control) or with 1 μg/mL anti-TRPC6 antibody (anti-TRPC6 ab) for 60 min. Cells were stimulated in a Ca²⁺-free medium (100 μM EGTA added) with 1 U/mL thrombin (C and D) or 1 μM TG (E and F) and 3 min later CaCl₂ was added (final concentration 300 μM (C and E) or 1.2 mM (D and F)) to initiate Ca²⁺ entry. The traces shown are representative of six separate experiments.

anti-TRPC6 antibody did not modify thrombin-evoked Ca²⁺ release from the intracellular stores but reduced by 41 ± 5% thrombin-evoked Ca²⁺ entry in the presence of a low [Ca²⁺]_o (300 μM extracellular Ca²⁺) as compared to cells that incorporated the anti-TRPC6 antibody neutralized by incubation with the CAP (1 μg/mL; Fig. 3C; *P* < 0.05, *n* = 6); in contrast, in the presence of a high [Ca²⁺]_o (1.2 mM)

introduction of the antibody enhanced thrombin-evoked Ca²⁺ entry by 39 ± 4% (Fig. 3D; *P* < 0.05, *n* = 6).

Since thrombin stimulates both store-operated (capacitative) Ca²⁺ entry (SOCE) and non-capacitative Ca²⁺ entry we further investigated whether the anti-TRPC6 antibody alters SOCE stimulated by TG, a specific inhibitor of the Ca²⁺-ATPase of the intracellular stores

(SERCA), that induces passive discharge of the intracellular Ca^{2+} pools. In the absence of extracellular Ca^{2+} , treatment of platelets with TG results in a sustained increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. The subsequent addition of Ca^{2+} to the external medium induced a sustained increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, indicative of SOCE (Fig. 3E and F). As for thrombin, introduction of the anti-TRPC6 antibody did not alter TG-evoked Ca^{2+} release, which indicates that this maneuver did not affect the ability of platelets to accumulate Ca^{2+} in the intracellular stores. The anti-TRPC6 antibody reduced by $30 \pm 5\%$ TG-evoked SOCE when $[\text{Ca}^{2+}]_o$ was $300 \mu\text{M}$ but enhanced SOCE when $[\text{Ca}^{2+}]_o$ was 1.2 mM by $32 \pm 3\%$, as compared to cells treated with cells that incorporated the anti-TRPC6 antibody neutralized by incubation with CAP (Fig. 3E and F; $P < 0.05$, $n = 6$); thus suggesting that the interaction of the IP_3Rs or CaM with the TRPC6 CIRB site is important for SOCE in human platelets.

Introduction of the anti-TRPC6 antibody did not alter the association of Orai1 with the IP_3Rs or CaM either in the absence or presence of 1 mM extracellular Ca^{2+} (not shown), thus indicating that this treatment does not have non-specific effects on IP_3Rs or CaM functions.

3.4. Association of TRPC6 with CaM and IP_3Rs regulates platelet aggregation

Treatment of human platelets suspended in a medium containing Ca^{2+} with 1 U/mL thrombin induces rapid aggregation characterized by an initial and brief change in platelet shape, monitored by a small decrease in light transmission, followed by a large increase in light transmission as platelets aggregate (Fig. 4). In the presence of $300 \mu\text{M}$ extracellular Ca^{2+} , thrombin-stimulated platelet aggregation was found to be significantly reduced in cells electrotransfected with $1 \mu\text{g/mL}$ anti-TRPC6 antibody compared to cells electrotransfected with the anti-TRPC6 antibody neutralized by incubation for 1 h with CAP ($1 \mu\text{g/mL}$) but otherwise treated in the same way (Fig. 4A and Table 1; $n = 4$). By contrast, when cells were suspended in a medium containing 1.2 mM Ca^{2+} thrombin-evoked platelet aggregation was enhanced in the presence of the anti-TRPC6 antibody as compared to cells that incorporated neutralized antibody (Fig. 4B and Table 1; $n = 4$).

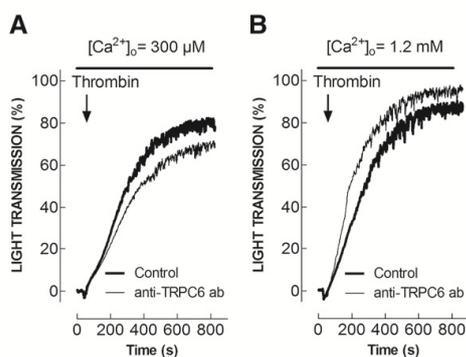


Fig. 4. Introduction of the anti-TRPC6 antibody modifies thrombin-evoked platelet aggregation in a $[\text{Ca}^{2+}]_o$ -dependent manner. Platelets were electropermeabilized in a Gene Pulser and incubated with $1 \mu\text{g/mL}$ anti-TRPC6 antibody (Santa Cruz) neutralized by incubation for 1 h with $1 \mu\text{g/mL}$ CAP (Control) or with $1 \mu\text{g/mL}$ anti-TRPC6 antibody (anti-TRPC6 ab) for 60 min as indicated. Cells were then suspended in HBS containing either $300 \mu\text{M}$ (A) or 1 mM Ca^{2+} (B) and then stimulated with 1 U/mL thrombin. Aggregation of human platelets was induced at a shear rate of 1200 rpm at 37°C in an aggregometer as described in Materials and methods. Traces shown are representative of 4 separate experiments.

Table 1

Effect of incorporation of the anti-TRPC6 antibody on thrombin-induced platelet aggregation.

	Lag-time (min)	% rate	% aggregation
300 μM extracellular Ca^{2+}			
Thrombin [control]	0.050 ± 0.014	69.7 ± 2.4	80.5 ± 2.3
Thrombin [anti-TRPC6 ab]	0.074 ± 0.021	$57.8 \pm 3.6^*$	$64.2 \pm 1.5^*$
1.2 mM extracellular Ca^{2+}			
Thrombin [control]	0.045 ± 0.017	67.9 ± 3.1	81.3 ± 1.5
Thrombin [anti-TRPC6 ab]	0.062 ± 0.030	$74.0 \pm 2.1^*$	$95.5 \pm 1.2^*$

Human platelets (10^9 cells/mL) were reversibly electropermeabilized in a Gene Pulser as described in Material and methods and then were incubated with $1 \mu\text{g/mL}$ anti-TRPC6 antibody (Santa Cruz) neutralized by incubation for 1 h with $1 \mu\text{g/mL}$ CAP (control) or with $1 \mu\text{g/mL}$ anti-TRPC6 antibody (anti-TRPC6 ab) for an additional 60 min at 37°C . Cells were then stimulated with 1 U/mL thrombin in the presence of $300 \mu\text{M}$ or 1.2 mM extracellular Ca^{2+} . Values given are presented as mean \pm SEM of four separate determinations.

* $p < 0.05$ compared to controls.

4. Discussion

We have recently reported that TRPC6 plays an important regulatory role in Ca^{2+} entry in human platelets, acting as a point of convergence between receptor- and store-operated Ca^{2+} influx [23]. Here, we have investigated the modulation of TRPC6 functional role in human platelets by CaM and IP_3Rs binding. The interaction of TRPC proteins with CaM or IP_3Rs has been reported to play an important role in the regulation of TRPC channel function. The bidirectional interaction between IP_3Rs and TRPC channels modulates agonist-induced opening of both channels [21,24] and CaM has been reported to induce Ca^{2+} -dependent inactivation of SOCE via binding to TRPC1 [9]. Several CaM-binding sites have been identified in the TRPC structure [4]; however, only one IP_3Rs -binding site has been described, the C-terminal CIRB region, which is common for CaM and IP_3Rs binding [12]. Among the CaM-binding sites of TRPCs, the CIRB site is especially relevant, since, depending on the $[\text{Ca}^{2+}]_o$, CaM might act as a switch for IP_3R -mediated activation of TRPC function. There are two major regulatory factors that must be considered concerning the interaction of CaM and IP_3Rs with TRPCs: the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and the cytosolic IP_3 concentration. We have found that at resting IP_3 levels, Ca^{2+} influx induced by ionomycin in the presence of increasing $[\text{Ca}^{2+}]_o$ results in Ca^{2+} -dependent binding of CaM to TRPC6 channels and subsequent displacement of IP_3Rs . Thus suggesting, as reported for other TRPC proteins (see [4]), that elevation in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases the affinity of CaM for the CIRB site of TRPC6. Conversely, we have found that IP_3 generation is necessary for agonist-induced IP_3R binding to TRPC6 and displacement of CaM from this channel. It is worth mentioning that, in the presence of 1.2 mM extracellular Ca^{2+} , stimulation with thrombin, which induces both robust Ca^{2+} entry and IP_3 generation, results in enhanced association of IP_3Rs and dissociation of CaM from TRPC6, thus suggesting that at high enough concentrations of IP_3 the IP_3Rs are not displaced by CaM, even when CaM is bound to Ca^{2+} . Interestingly, in platelets stimulated with thrombin to elevate IP_3 levels, association of the IP_3Rs with TRPC6 was significantly attenuated if Ca^{2+} entry was abolished, although some association was still remaining which was independent on rises in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ as dimethyl BAPTA-loading was without effect. Our findings indicate for the first time that agonist-induced association between IP_3Rs and TRPC6 occurs via Ca^{2+} entry-dependent and -independent mechanisms.

Introduction of the anti-TRPC6 antibody, whose epitope overlaps with the CIRB site, into cells provided interesting findings concerning the role of the CIRB site of TRPC6 in platelet function. This antibody impairs the dynamics of CaM/ IP_3Rs interaction with TRPC6. Introduction of the antibody resulted in significant changes in agonist-evoked Ca^{2+} entry and aggregation. In the presence of the antibody, both cellular processes are inhibited at low $[\text{Ca}^{2+}]_o$ and enhanced at high

$[Ca^{2+}]_o$. The inhibition of platelet functions at low $[Ca^{2+}]_o$ might be attributed to a partial requirement for IP_3Rs association to TRPC6, needed at low $[Ca^{2+}]_o$ but overcome by a Ca^{2+} -dependent mechanism, with low affinity for Ca^{2+} , at high $[Ca^{2+}]_o$ since Ca^{2+} entry and aggregation were increased at high $[Ca^{2+}]_o$. The enhancement of Ca^{2+} entry and aggregation at high $[Ca^{2+}]_o$ might be attributed to impairment of the negative feedback provided by CaM in the presence of high $[Ca^{2+}]_o$. Altogether, these findings reveal that thrombin-stimulated Ca^{2+} entry and aggregation in human platelets are dynamically regulated by Ca^{2+} and IP_3 levels via interaction of CaM/ IP_3Rs with the TRPC6 CIRB site.

Disclosure of conflict of interests

The authors state that there is no conflict of interest.

Acknowledgments

Supported by MICINN-FEDER (BFU2010-21043-C02-01) and Junta de Extremadura-FEDER (GR10010). N.D. held a fellowship from Junta de Extremadura (PRE09020) and A.B. is supported by a contract from University of Extremadura.

References

- [1] L.G. Babich, C.Y. Ku, H.W. Young, H. Huang, M.R. Blackburn, B.M. Sanborn, *Biol. Reprod.* 70 (2004) 919–924.
- [2] I.S. Ambudkar, B.C. Bandyopadhyay, X. Liu, T.P. Lockwich, B. Paria, H.L. Ong, *Cell Calcium* 40 (2006) 495–504.
- [3] C. Galan, H. Zbidi, A. Bartegi, G.M. Salido, J.A. Rosado, *Arch. Biochem. Biophys.* 490 (2009) 137–144.
- [4] M.X. Zhu, *Pflügers Arch.* 451 (2005) 105–115.
- [5] M. Kamouchi, S. Philipp, V. Flockerzi, U. Wissenbach, A. Mamin, I. Raeymaekers, J. Eggermont, G. Droogmans, B. Nilius, *J. Physiol.* 518 (Pt 2) (1999) 345–358.
- [6] J. Shi, E. Mori, Y. Mori, M. Mori, J. Li, Y. Ito, K. Inoue, *J. Physiol.* 561 (2004) 415–432.
- [7] T. Okada, S. Shimizu, M. Wakamori, A. Maeda, T. Kurosaki, N. Takada, K. Imoto, Y. Mori, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 10279–10287.
- [8] Z. Zhang, J. Tang, S. Tikunova, J.D. Johnson, Z. Chen, N. Qiu, A. Dietrich, E. Stefani, L. Birnbaumer, M.X. Zhu, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 3168–3173.
- [9] B.B. Singh, X. Liu, J. Tang, M.X. Zhu, I.S. Ambudkar, *Mol. Cell* 9 (2002) 739–750.
- [10] B.J. Wedel, G. Vazquez, R.R. McKay, J.B.G. Si, J.W. Putney Jr., *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 25758–25765.
- [11] A.M. Phillips, A. Bull, L.E. Kelly, *Neuron* 8 (1992) 631–642.
- [12] J. Tang, Y. Lin, Z. Zhang, S. Tikunova, L. Birnbaumer, M.X. Zhu, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 21303–21310.
- [13] B. Nilius, J. Prenen, J. Tang, C. Wang, G. Owsianik, A. Janssens, T. Voets, M.X. Zhu, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 6423–6433.
- [14] M.J. Berridge, *Biochem. J.* 312 (Pt 1) (1995) 1–11.
- [15] J.A. Rosado, S.O. Sage, *Biochem. J.* 350 (Pt 3) (2000) 631–635.
- [16] P.C. Redondo, M.T. Harper, J.A. Rosado, S.O. Sage, *Blood* 107 (2006) 973–979.
- [17] A. Dhar, S.D. Shukla, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 9123–9127.
- [18] J.J. Lopez, G.M. Salido, J.A. Pariente, J.A. Rosado, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 28254–28264.
- [19] J.J. Lopez, P.C. Redondo, G.M. Salido, J.A. Pariente, J.A. Rosado, *J. Thromb. Haemost.* 7 (2009) 992–999.
- [20] A. Bouaziz, N.B. Amor, G.E. Woodard, H. Zibidi, J.J. Lopez, A. Bartegi, G.M. Salido, J.A. Rosado, *Thromb. Haemost.* 98 (2007) 375–384.
- [21] I. Jardin, J.J. Lopez, G.M. Salido, J.A. Rosado, *Cell. Signal.* 20 (2008) 737–747.
- [22] R. Chakrabarti, D.E. Wylie, S.M. Schuster, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 15494–15500.
- [23] I. Jardin, L.J. Gomez, G.M. Salido, J.A. Rosado, *Biochem. J.* 420 (2009) 267–276.
- [24] G.E. Woodard, J.J. Lopez, I. Jardin, G.M. Salido, J.A. Rosado, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 8045–8053.

DISCUSIÓN

El Ca^{2+} es un ion con un importante papel como mensajero intracelular en la mayoría de los modelos celulares, participando en procesos tan importantes como la contracción muscular, la reproducción, la secreción e incluso la transcripción génica, la proliferación celular y la muerte celular programada o apoptosis.

Es por eso que la homeostasis intracelular del Ca^{2+} está finamente regulada por una serie de mecanismos entre los cuales se ha descrito la entrada capacitativa de Ca^{2+} (ECC). Este tipo de entrada está regulada por el estado de llenado de los depósitos intracelulares de calcio, y se inactiva al rellenarse dichos depósitos (Putney, 1986). Desde que la ECC se describió en 1986, se han estudiado en profundidad los canales que participan en la entrada de Ca^{2+} en las células. En un principio, y tras el descubrimiento de los homólogos de los canales TRP de *Drosophila* en mamíferos, se pensó que estos canales (y sobre todo los de la subfamilia TRPC) mediaban la entrada de Ca^{2+} . Unos años más tarde, con el descubrimiento de STIM1, que actúa como sensor de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (Roos *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005); y del canal Orai1, responsable de las corrientes I_{CRAC} (Feske *et al.*, 2006), los TRPC se consideraron mediadores de las corrientes I_{SOC} , un tipo de corriente menos selectiva para el ion Ca^{2+} . A pesar de que la activación de la ECC ha sido muy ampliamente estudiada, los mecanismos de la inactivación de este tipo de entrada no se conocen con claridad.

Uno de los mecanismos de la inactivación de la ECC es la inactivación rápida de los canales CRAC/Orai, que se produce en milisegundos por la inhibición por retroalimentación de I_{CRAC} mediada por la concentración de calcio citosólico alrededor de canales CRAC individuales (Yamashita *et al.*, 2007; Zweifach *et al.*, 1995). Además, se ha descrito que STIM1 de la membrana plasmática, actuando como un sensor de calcio extracelular, participa también en la inactivación de la ECC en diferentes tipos celulares (Spassova *et al.*, 2006), incluyendo plaquetas humanas (Jardin *et al.*, 2009b). La inactivación de la ECC por la STIM1 de la membrana plasmática se ha considerado como mediada por la interacción con Orai1 (Jardin *et al.*, 2009b). Un estudio reciente ha revelado que el dominio modulador de CRAC, entre los aminoácidos 474 y 485 de la

región citosólica de STIM1, proporciona una señal de retroalimentación negativa a la entrada de calcio induciendo una inactivación rápida dependiente de calcio de los canales CRAC/Orai (Derler *et al.*, 2009). Sin embargo, se desconoce si esta inactivación de la ECC por el calcio extracelular mediada por la STIM1 de la membrana contribuye a la inactivación rápida de los canales CRAC/Orai.

Cuando se estudió la relación entre STIM1, Orai1 y los canales TRPC se observó que, una vez vaciados los depósitos intracelulares con diferentes agonistas, como la trombina o la TG, se formaba un complejo formado por STIM1, Orai1 y TRPC1 que mediaba la ECC (Jardin *et al.*, 2008b). Este complejo se constituía en unas zonas concretas de la membrana plasmática, las balsas lipídicas, que son dominios de la membrana resistentes a los detergentes suaves, ricos en colesterol y esfingolípidos, que organizan la unión de moléculas de señalización (Prieschl *et al.*, 2000), constituyendo plataformas para las proteínas de membrana, de forma que proporcionan un ambiente adecuado para la interacción de las proteínas asociadas a la ECC (Jardin *et al.*, 2008d; Pani *et al.*, 2008; Sampieri *et al.*, 2008). Además, estos dominios de balsas lipídicas son importantes para la activación de muchas funciones celulares, incluyendo la adhesión y migración celular, la apoptosis, la organización del citoesqueleto, la exocitosis y la endocitosis (Pani *et al.*, 2009; Simons *et al.*, 2000). Estos procesos celulares son además dependientes de los aumentos en la concentración de calcio, y se sabe que estas balsas lipídicas regulan el mecanismo de activación de la ECC (Sampieri *et al.*, 2008). Por ejemplo, en las balsas lipídicas se insertan proteínas como la caveolina 1, para las que el TRPC1 tiene algunos dominios de interacción (Brazier, 2003).

En los experimentos llevados a cabo en esta Tesis, se utilizó un agente reductor del colesterol, la M β CD, capaz de atenuar selectivamente la estabilidad de las balsas lipídicas (Vaca, 2010), de forma que es el medio más utilizado para investigar el papel de estas balsas en la fisiología celular. A pesar de ello, este agente también presenta ciertas limitaciones, como que no afecta a los otros constituyentes de las balsas lipídicas (sólo afecta al colesterol), por lo que no retira completamente estos dominios, sino que simplemente los daña significativamente; además, al usar este agente se produce también depleción del colesterol de las membranas internas, aunque dichas membranas tienen concentraciones de colesterol más bajas que la membrana plasmática. En los experimentos llevados a cabo en esta Tesis se usó CLCD como control,

observando que el efecto de la M β CD en la regulación de la ECC está mediado específicamente por la retirada del colesterol de estas balsas lipídicas (puesto que el efecto inhibitor de este agente en la regulación de ECC mediada por STIM1 de la membrana no fue observado en presencia de CLCD).

Por tanto, los experimentos de esta Tesis se realizaron teniendo en cuenta las limitaciones que presenta ese agente a la hora de estudiar el papel de las balsas lipídicas en la activación (añadiendo la M β CD antes de la estimulación de las células con TG) y en el mantenimiento (con la adición de la M β CD después de estimular con TG) de la entrada de calcio. Se sabe que la maniobra de retirada del colesterol de estos dominios y, por tanto, de daño de los mismos, atenúa la ECC de forma significativa en diferentes tipos celulares (Bergdahl *et al.*, 2003; Jardin *et al.*, 2008d; Prakash *et al.*, 2007). Esto se puede atribuir a la alteración de la asociación entre las proteínas que participan en la ECC, puesto que esta asociación se da en las balsas lipídicas. Al investigar el papel de las balsas lipídicas en la entrada de Ca²⁺, la incubación con la M β CD se llevó a cabo durante 30 minutos. Para explorar la función de estas balsas en la activación de la entrada de Ca²⁺ inducida por TG, ésta se estudió tras 180 segundos después de la adición de la TG; mientras que, para el estudio del mantenimiento de la entrada de Ca²⁺, las mediciones se hicieron 30 minutos después de la adición de la TG. Por otra parte, también se estudió, a esos tiempos, la sensibilidad de la entrada de Ca²⁺ al La³⁺, que es un bloqueante de la ECC, encontrándose que mientras que la entrada de Ca²⁺ tras 180 segundos de estimulación con TG es totalmente sensible al La³⁺, el flujo de Ca²⁺ tras 30 minutos de tratamiento con TG era parcialmente insensible. Esta entrada de Ca²⁺ estimulada por TG e insensible al La³⁺ podría deberse a la activación de corrientes de cationes a través de canales dependientes de Ca²⁺ o de transportadores, como por ejemplo el intercambio en modo inverso de Na⁺/Ca²⁺ que se produce tras el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca²⁺ (Harper *et al.*, 2007). Nuestro estudio ha demostrado que el silenciamiento del canal TRPC6 reduce el componente insensible al La³⁺ en este tipo celular. Además, también se ha demostrado que el aumento en la entrada de Ca²⁺ por adición de M β CD a las células previamente tratadas con TG se debe mayoritariamente al aumento del componente insensible al La³⁺, sin alterar la ECC. Estos resultados sugieren que las balsas lipídicas no son necesarias para el mantenimiento de la ECC una vez producida la activación, pero que aumentan la entrada no capacitativa de Ca²⁺ estimulada por el tratamiento de 30 minutos con TG, un efecto que se puede deber al

reclutamiento de más subunidades TRPC6 para la vía de entrada de Ca^{2+} no capacitativa, como se demostró usando las técnicas de silenciamiento con shRNAs.

Además, los resultados de esta Tesis indican que TRPC1 participa tanto en la activación como en el mantenimiento de la ECC estimulada por TG, pero no participan en la entrada no capacitativa de Ca^{2+} que se produce tras el daño de las balsas lipídicas en las células de estudio. Por otra parte, y apoyando la teoría de que la M β CD carece de efecto sobre el mantenimiento de la ECC, se ha demostrado que la incubación durante 30 minutos con este agente una vez que las células fueron tratadas con TG tiene un efecto despreciable en el mantenimiento de la entrada de Mn^{2+} . Este catión se usó para estos estudios puesto que se asume que todo él entra sólo a través de la vía capacitativa. El uso de este ion está ampliamente aceptado (Parekh *et al.*, 2005), ya que evita interferencias en el estudio de la ECC debidas a la estimulación de la PMCA, puesto que el Mn^{2+} es transportado por esta bomba con menor afinidad que el Ca^{2+} (Graf *et al.*, 1982; Rink *et al.*, 1990). Además, este ion inhibe el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Blaustein *et al.*, 1977), y su permeabilidad para los canales de Ca^{2+} no capacitativos (como el TRPV6), es significativamente menor que la permeabilidad de esos canales para el Ca^{2+} (Vennekens *et al.*, 2000).

A pesar de que el papel de las balsas lipídicas en la activación de la ECC y la asociación de STIM1 y Orai1 con estas balsas ha sido cuestionado por una investigación que sugiere que I_{CRAC} no es dependiente de los dominios de balsas lipídicas (DeHaven *et al.*, 2009), nuestros resultados indican que estas balsas lipídicas tienen un papel relevante en la activación pero no en el mantenimiento de la asociación de Orai1 con STIM1 y con TRPC1 estimulada por TG. Así, en los estudios presentados en esta Tesis, observamos que la asociación estimulada por TG entre esas proteínas era transitoria, y que tras 30 minutos después de la adición de la TG la interacción entre esas proteínas era parecida a la del estado de reposo. Asimismo, demostramos que la TG promueve la asociación inicial entre Orai1 y TRPC6 pero que la estimulación prolongada con esta TG produjo la disociación entre esas proteínas. Recientemente, hemos demostrado que el TRPC6 participa tanto en la ECC como en la entrada no capacitativa de Ca^{2+} a través de su interacción con el complejo Orai1-STIM1 o hTRPC3 respectivamente (Jardin *et al.*, 2009a). A pesar de que en el presente estudio no se ha analizado la asociación de TRPC6 con TRPC3, la disociación

observada de TRPC6 con Orai1 puede apoyar la idea de la activación de la entrada no capacitativa de Ca^{2+} , lo cual podría explicar los efectos de la M β CD tanto aumentando la entrada no capacitativa de Ca^{2+} como reduciendo la coimmunoprecipitación de Orai1 con TRPC6. Es decir, esta Tesis desvela que las balsas lipídicas tienen un importante papel en la entrada de cationes divalentes inducida por TG, lo cual está probablemente mediado por el papel de las balsas lipídicas en la asociación entre Orai1, STIM1, TRPC1 y TRPC6. La disrupción de las balsas lipídicas antes de la activación de la ECC resulta en la atenuación de la asociación mediada por el vaciamiento de los depósitos entre estas proteínas, pero cuando la disrupción de las balsas lipídicas se produce tras el vaciamiento de los depósitos, la asociación de Orai1 con STIM1 o TRPC1 no se redujo significativamente, y tampoco la entrada de Mn^{2+} , mientras que la disociación entre Orai1 y TRPC6 estaba claramente aumentada, lo cual explica que se produjo una activación de la entrada no capacitativa de Ca^{2+} .

Quisimos ver también el efecto de la desorganización de las balsas lipídicas en la ECC en plaquetas, observando que dicha disrupción, producida por la M β CD, disminuía la ECC y alteraba la sensibilidad de la ECC al Ca^{2+} extracelular. A concentraciones altas de Ca^{2+} en el medio extracelular (3 mM), la entrada de cationes divalentes era significativamente mayor en presencia de la M β CD, lo cual puede atribuirse a la alteración de la localización de STIM1 en la membrana plasmática y, subsecuentemente, a la alteración de la asociación con Orai1 por tratamiento con TG. Sin embargo, puesto que la asociación inducida por el vaciamiento de los depósitos de STIM1 de la membrana con Orai1 es mucho mayor que la asociación de STIM1 a la membrana, no podemos descartar la posibilidad de que la alteración de la asociación entre STIM1 de la membrana y Orai1 se deba a cambios en el ambiente lipídico más que a la alteración de la asociación de STIM1 a la membrana. La disrupción de las balsas lipídicas no alteró las concentraciones en reposo tanto de STIM1 en la membrana plasmática como de la coimmunoprecipitación de la STIM1 de la membrana con Orai1. Aunque la causa de este fenómeno no se ha estudiado con más profundidad, podría explicarse por la presencia de STIM1 de la membrana tanto independiente como dependientemente de las balsas lipídicas o por una reducción de ambos eventos.

Además, nuestros resultados en plaquetas indican que las balsas lipídicas, como decíamos antes, son necesarias para la asociación de Orai1 con STIM1,

tanto el de la membrana como la fracción intracelular de STIM1. Esto se detectó en nuestros experimentos inmunoprecipitando lisados completos de plaquetas con anticuerpo anti-STIM1 (de forma que se incluye tanto el de la membrana como el intracelular) seguidos de Western blotting con anticuerpo anti-Orai1. Los resultados indicaron que los datos obtenidos al inmunoprecipitar STIM1 no sólo se debían a la STIM1 de la membrana, puesto que la asociación basal con Orai1 era mayor en los lisados completos, así como la asociación entre STIM1 y Orai1 tras estimular con TG.

Los resultados muestran además que la inhibición de la traslocación inducida por TG de STIM1 a la membrana plasmática producida por la disrupción de las balsas lipídicas puede deberse a la localización y al reclutamiento de STIM1 a la membrana plasmática, en vez de a la alteración del tráfico intracelular. Esto se basa en la falta de efecto de la M β CD sobre los niveles de STIM1 de la membrana en células sin estimular, lo cual sugiere que el ciclo de reemplazo de la STIM1 de la membrana no se altera, aunque tampoco se puede descartar que esté disminuido. Sin embargo, se ha visto que mientras que el reclutamiento de proteínas de membrana en regiones de membrana ricas en fosfolípidos se produce a través de interacciones proteína-proteína, las proteínas que se asocian con las balsas lipídicas requieren interacciones también entre los lípidos de estas balsas y los dominios transmembrana de las proteínas o el fraccionado lipídico de las proteínas de la membrana por una modificación lipídica (Alonso *et al.*, 2001).

Es decir, en plaquetas demostramos que las balsas lipídicas son también importantes para que se produzca la interacción entre Orai1 y STIM1 de la membrana plasmática. Esta última, actuando probablemente como un sensor del Ca²⁺ extracelular, es esencial para el mecanismo de inactivación de la ECC mediada por el Ca²⁺ extracelular, lo cual puede prevenir la intoxicación y muerte de la célula por exceso de Ca²⁺.

La activación y el mantenimiento de la ECC están regulados de forma diferente dependiendo del tipo celular, y el citoesqueleto tiene un papel muy importante en estos procesos. Por ejemplo, se sabe que la activación de la ECC es sensible a la jasplakinolida, que es un estabilizador del citoesqueleto de actina, mientras que el mantenimiento de esta ECC es insensible a la estabilización de actina tanto en plaquetas como en células acinares

pancreáticas de ratón (Redondo *et al.*, 2003; Rosado *et al.*, 2000a). Además, se ha descubierto que en plaquetas humanas los microtúbulos juegan un papel doble en la ECC, de forma que actúan por un lado como una barrera que previene la ECC constitutiva regulada por el sistema tubular denso (el análogo al retículo endoplásmico en las plaquetas), y también facilitan la ECC mediada por los depósitos acídicos de Ca^{2+} (Redondo *et al.*, 2007b). Por el contrario, en las células HEK293, que fueron el objeto de nuestro estudio para generalizar nuestra hipótesis, los microtúbulos facilitan la ECC y la corriente I_{CRAC} , lo cual se ha atribuido a un papel de los microtúbulos en la localización de STIM1 (Smyth *et al.*, 2008). Asimismo, se sabe que la ECC es insensible a la citocalasina D, un inhibidor de la polimerización de actina permeable a membranas, en un gran número de células, como la línea celular de músculo liso DDT₁MF-2 o la línea derivada de la aorta embrionaria de rata A7r5 (Patterson *et al.*, 1999). Por el contrario, la red de actina tiene un importante papel en la ECC de neutrófilos (Itagaki *et al.*, 2004), queratinocitos humanos (Korkiamaki *et al.*, 2003), células bovinas adrenocorticales (Kawamura *et al.*, 2003), células de glioma C6 (Sabala *et al.*, 2002), células del endotelio vascular (Holda *et al.*, 1997) y plaquetas humanas (Harper *et al.*, 2007; Rosado *et al.*, 2000a; Rosado *et al.*, 2004). En las plaquetas humanas, se ha observado un efecto dependiente del tiempo de la citocalasina D sobre la ECC, lo cual apoya la teoría de que existe un papel doble del citoesqueleto de actina en la ECC, como se mencionaba anteriormente, de forma que actúa tanto como un regulador negativo evitando la ECC constitutiva como facilitando el acoplamiento entre elementos de la membrana del retículo endoplásmico y los canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática (Rosado *et al.*, 2000a; Rosado *et al.*, 2004).

Es por todo ello que en esta Tesis quisimos analizar el papel del citoesqueleto en la ECC en células HEK293. Para ello, se utilizaron agentes estabilizadores, como la jasplakinolida (estabiliza la red cortical de actina) y paclitaxel (estabiliza los microtúbulos); o disruptores, como la citocalasina D (que destruye el citoesqueleto de actina) o la colchicina (que actúa sobre los microtúbulos). Se observó que, al usar los agentes disruptores, aumentaba la ECC inducida por TG, mientras que, al estabilizar la red de actina o los microtúbulos, se reducía la ECC inducida por TG, siendo éste el resultado esperado, lo cual sugiere que el citoesqueleto de actina y los microtúbulos tienen un papel importante en el flujo de Ca^{2+} , actuando probablemente como una barrera que previene la ECC en células en reposo, tal y como se dijo

anteriormente que ocurría en las plaquetas humanas (Redondo *et al.*, 2007b). Sin embargo, un estudio previo concluyó que el nocodazol y la colchicina reducen la ECC inducida por TG en células HEK293 (Smyth *et al.*, 2008). Esta aparente contradicción entre los resultados obtenidos en esta Tesis y los encontrados por Smyth *et al.* podría deberse al hecho de que ambos estudios estiman la ECC a distintas etapas. En nuestro estudio, la iniciación de la entrada de Ca^{2+} se indujo 3 minutos después de la adición de TG, mientras que en su estudio la TG fue añadida a las células resuspendidas en un medio que contenía Ca^{2+} (Smyth *et al.*, 2008). De hecho, en ciertos modelos celulares, como las células acinares pancreáticas (Camello *et al.*, 1999) y las plaquetas humanas (Jenner *et al.*, 2000) (en estas células reguladas por el citoesqueleto (Jardin *et al.*, 2008b)), se han observado diferentes etapas para la ECC.

El papel del citoesqueleto en la modulación de la ECC se ha atribuido a una serie de eventos de señalización, incluyendo la facilitación de la localización de STIM1 en el retículo endoplásmico (Smyth *et al.*, 2008), probablemente a través de su interacción con la proteína EB1 (Grigoriev *et al.*, 2008), la regulación de la internalización de los canales TRP (Itagaki *et al.*, 2004) o modulando la interacción de las proteínas TRPC con el receptor de IP_3 de tipo II (Rosado *et al.*, 2001; Rosado *et al.*, 2002). En esta Tesis demostramos por primera vez que el citoesqueleto regula la asociación de STIM1 con Orai1 y con los canales TRPC1 en la membrana plasmática. Los efectos de las alteraciones del citoesqueleto demostrados aquí, tanto usando colchicina, paclitaxel o jasplakinolida, en la ECC, son similares a las modificaciones observadas en la asociación entre STIM1 y los canales de Ca^{2+} , sugiriendo que tanto los filamentos de actina como los microtúbulos actúan como una barrera cortical que previene la asociación entre STIM1 y estos canales, así como la ECC; de forma que al romper esta barrera se facilita la asociación entre STIM1 y los canales, y la ECC. Sin embargo, al estabilizar las redes de actina o de microtúbulos se alteran ambos eventos. Asimismo, hemos descubierto que la disrupción de los filamentos de actina aumenta la ECC sin producir ningún efecto significativo en la asociación entre STIM1 y Orai1 o STIM1 y TRPC1. Además, hemos encontrado que la disrupción de los microfilamentos produce una inhibición en la asociación entre calmodulina y Orai1 o TRPC1 inducida por TG. Puesto que la inhibición de la calmodulina produce un efecto similar en la ECC inducida por TG que la disrupción de los filamentos de actina, los resultados de esta Tesis demuestran que la calmodulina tiene un papel en la regulación de la ECC a través de su

interacción con Orai1 y TRPC1, lo cual está facilitado por el citoesqueleto. Los microtúbulos tienen un papel más importante en la asociación de STIM1 con los canales de Ca^{2+} , como se ha demostrado anteriormente (Smyth *et al.*, 2007), puesto que la disrupción de los mismos aumenta esta asociación, un proceso que no se ha observado tras la inhibición de la polimerización de actina.

Por lo tanto, nuestros resultados demuestran que el citoesqueleto tiene un papel relevante en la regulación de la ECC en células HEK293, a través de la regulación de la interacción entre STIM1 y Orai1 o TRPC1. Además, el citoesqueleto de actina facilita la asociación de la calmodulina con los canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática, lo cual proporciona un papel regulador adicional del flujo de Ca^{2+} mediado por los depósitos, de forma que la disrupción de la red de actina produce una alteración de la inactivación de la ECC dependiente de Ca^{2+} .

La calmodulina es una proteína encargada de regular numerosas proteínas intracelulares, incluyendo canales iónicos, de una forma dependiente de Ca^{2+} (Zhu, 2005). Su interacción con los canales TRP fue descrita en *Drosophila* en la década de los 90 (Phillips *et al.*, 1992), sugiriéndose que la regulación de la función de las proteínas TRP por el Ca^{2+} es un mecanismo conservado. Se sabe también de la interacción de la calmodulina con TRPC1 en mamíferos (Singh *et al.*, 2002), con el extremo C-terminal polibásico de STIM1 (Bauer *et al.*, 2008) y con el dominio N-terminal proximal a la membrana de Orai1 (Mullins *et al.*, 2009). Además, se ha demostrado que la calmodulina está involucrada en la inactivación de la ECC dependiente de Ca^{2+} . Esto se ha comprobado mediante el uso de mutantes de TRPC1 o Orai1 incapaces de unirse a la calmodulina, lo cual previene la inactivación de ECC dependiente de Ca^{2+} en células de las glándulas salivales humanas (Singh *et al.*, 2002) o la I_{CRAC} en células HEK293 (Mullins *et al.*, 2009), respectivamente. También se han usado métodos de sobreexpresión de un péptido inhibidor de la calmodulina y de un mutante de la calmodulina insensible al Ca^{2+} , lo cual produce una reducción de I_{SOC} en células hepáticas (Litjens *et al.*, 2004).

La calmodulina también es capaz de unirse a TRPC6, a través del dominio CIRB (C-terminal), al que también se unirán los IP_3Rs . Este sitio es especialmente importante, puesto que, dependiendo de la concentración de Ca^{2+} , la calmodulina puede actuar como un interruptor de la activación de la

función del TRPC6 mediada por el IP₃R. Este TRPC6 tiene un importante papel regulador de la entrada de Ca²⁺ en plaquetas humanas, actuando como el punto convergente entre el flujo de Ca²⁺ mediado por receptores y el mediado por los depósitos (Woodard *et al.*, 2010). En esta Tesis hemos investigado el papel funcional de este TRPC6 en plaquetas humanas al unirse bien a calmodulina o bien a los IP₃Rs, puesto que esta unión juega un papel importante en la regulación de la función de los canales TRPC.

A la hora de realizar los experimentos, se consideraron dos factores importantes con respecto a la interacción de los TRPCs con calmodulina o IP₃Rs: la concentración de Ca²⁺ y la concentración de IP₃ citosólico. Hemos descubierto que, a concentraciones basales de IP₃, el flujo de Ca²⁺ inducido por la ionomicina en presencia de [Ca²⁺]_o crecientes produce la unión dependiente de Ca²⁺ de la calmodulina a los canales TRPC6, desplazando así la unión de los mismos con los IP₃Rs. Esto sugiere que, como se ha indicado para otras proteínas TRPC (Zhu, 2005), la elevación de la concentración de Ca²⁺ aumenta la afinidad de la calmodulina para el sitio CIRB de TRPC6. Por otra parte, en esta Tesis hemos descubierto que la generación de IP₃ es necesaria para la unión de los IP₃Rs al TRPC6 inducida por agonistas, y por tanto el desplazamiento de la calmodulina. En presencia de 1,2 mM de Ca²⁺ extracelular, la estimulación con trombina, que induce tanto una gran entrada de Ca²⁺ como la generación de IP₃, produce un aumento de la asociación de los IP₃Rs con TRPC6, y por lo tanto la disociación de la calmodulina de estos TRPC6, sugiriendo que, a concentraciones suficientemente altas de IP₃, los IP₃Rs no son desplazados por la calmodulina, incluso cuando la calmodulina está unida al Ca²⁺.

Nuestros resultados indican que, al estimular las plaquetas con trombina para elevar así los niveles de IP₃, la asociación de los IP₃Rs con TRPC6 se atenúa cuando la entrada de Ca²⁺ estaba abolida, aunque había cierta asociación, independiente de los aumentos de la concentración de Ca²⁺, puesto que la carga con dimetil BAPTA no tuvo ningún efecto. Estos resultados indican por primera vez que la asociación entre los IP₃Rs y el TRPC6 inducida por agonistas ocurre a través de mecanismos dependientes e independientes de Ca²⁺.

Por otra parte, al introducir el anticuerpo anti-TRPC6 en las plaquetas, con un epítipo que se solapa con el sitio CIRB, obtuvimos unos resultados interesantes acerca del papel del dominio CIRB del TRPC6 en la función plaquetaria. La introducción del anticuerpo alteró la interacción entre TRPC6 y calmodulina o IP₃Rs, de forma que se alteró significativamente la entrada de calcio inducida por agonistas, así como la agregación. En presencia del anticuerpo, ambos procesos celulares se encuentran inhibidos a bajas [Ca²⁺]_o y aumentados a altas [Ca²⁺]_o. Esta inhibición de las funciones plaquetarias a bajas [Ca²⁺]_o se puede atribuir a un requerimiento parcial para que se produzca la asociación de los IP₃Rs con TRPC6, necesario a bajas [Ca²⁺]_o pero debilitado por un mecanismo dependiente de Ca²⁺, con baja afinidad por el Ca²⁺, a altas [Ca²⁺]_o, puesto que la entrada de Ca²⁺ y la agregación estaban aumentadas a altas [Ca²⁺]_o. Este aumento de la entrada de Ca²⁺ y de la agregación se puede deber a una alteración del mecanismo de retroalimentación negativa del que se encarga la CaM en presencia de alta [Ca²⁺]_o. En conclusión, estos resultados revelan que la entrada de Ca²⁺ y la agregación estimuladas por trombina en plaquetas humanas están reguladas dinámicamente por los niveles de Ca²⁺ y de IP₃ a través de la interacción de la calmodulina o de los IP₃Rs con el sitio CIRB del canal TRPC6.

DISCUSSION

Ion Ca^{2+} plays an important role as an intracellular messenger in most cellular models, participating in essential processes, like muscle contraction, reproduction, secretion and even gene transcription, cell proliferation and programmed cell death or apoptosis.

This is why the intracellular Ca^{2+} homeostasis is tightly modulated by a variety of mechanisms, including store-operated Ca^{2+} entry (SOCE). This entry is regulated by the filling state of intracellular Ca^{2+} stores, and it is inactivated by store replenishment (Putney, 1986). Since SOCE was described in 1986, the channels involved in Ca^{2+} entry have been studied in depth. At first, and after the discovery of the homologues of *Drosophila* TRP channels in mammals, those channels (and especially the TRPC subfamily) were thought to mediate Ca^{2+} entry. A few years later, with the discovery of STIM1, which acts as a Ca^{2+} sensor in the endoplasmic reticulum (Roos *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005); and Orai1 channel, 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+} . Although the activation of SOCE has been widely investigated, the mechanisms of its inactivation remain unclear.

One of the mechanisms of SOCE inactivation is the fast inactivation of CRAC/Orai channels, which occurs in milliseconds by feedback inhibition of I_{CRAC} mediated by the cytosolic Ca^{2+} concentration around individual CRAC channels (Yamashita *et al.*, 2007; Zweifach *et al.*, 1995). Furthermore, it has been reported that PM-resident STIM1, acting as a sensor of extracellular Ca^{2+} , is also involved in SOCE inactivation in different cell types (Spassova *et al.*, 2006), including human platelets (Jardin *et al.*, 2009b). SOCE inactivation by PM-spanning STIM1 has been considered to be mediated by interaction with Orai1 (Jardin *et al.*, 2009b). A recent study has revealed that the CRAC modulatory domain, within the amino acids 474 and 485 of the cytosolic region of STIM1, provides a negative feedback signal to Ca^{2+} entry by inducing a rapid Ca^{2+} -dependent inactivation of the CRAC/Orai channels (Derler *et al.*, 2009). However, it remains unclear whether the observed SOCE inactivation by extracellular Ca^{2+} mediated by PM-resident STIM1 contributes to fast inactivation of the CRAC/Orai1 channels.

When we studied the relationship between STIM1, Orai1 and TRPC channels, we observed that, once the intracellular stores were depleted using different agonists (like thrombin or TG), a complex of STIM1, Orai1 and TRPC1 was formed and mediated SOCE (Jardin *et al.*, 2008b). This complex is constituted in certain areas in the plasma membrane, the lipid rafts, which are sphingolipids and cholesterol enriched plasma membrane domains, resistant to mild detergents, that organize the assembly of signalling molecules (Prieschl *et al.*, 2000), forming platforms for membrane proteins to provide a suitable environment for the interaction of SOCE-associated proteins (Jardin *et al.*, 2008d; Pani *et al.*, 2008; Sampieri *et al.*, 2008). Furthermore, these lipid rafts domains are important for the activation of many cellular functions, including cell adhesion and migration, apoptosis, cytoskeletal organization, exocytosis and endocytosis (Pani *et al.*, 2009; Simons *et al.*, 2000). These cellular processes are also dependent on increases in Ca^{2+} concentration, and lipid rafts are known to regulate the mechanism of SOCE activation (Sampieri *et al.*, 2008). For instance, proteins like caveolin 1, for which TRPC1 has some interaction domains, are inserted in lipid rafts (Brazer, 2003).

In the experiments carried out in this Thesis, we used a cholesterol-reducing agent, M β CD, which is able to selectively attenuate lipid raft stability (Vaca, 2010), so that it is the most widely used agent to investigate the role of these lipid rafts in cell physiology. However, this agent also has certain limitations, as it can not produce the complete disruption of lipid rafts since it only affects cholesterol and not the other constituents of lipid rafts. Also, the use of this agent produces cholesterol depletion of internal membranes, although those membranes have lower cholesterol levels than the plasma membrane. In the experiments conducted in this Thesis, we used CLCD as a control, observing that the effect of M β CD in SOCE regulation is specifically mediated by cholesterol removal from lipid rafts (since the inhibitory effect of this agent in SOCE regulation mediated by PM-resident STIM1 was not observed in the presence of CLCD).

Therefore, the experiments in this Thesis were conducted considering the limitations of M β CD when studying the role of lipid rafts in the activation (adding the M β CD prior to stimulation of cells with TG) and maintenance (with the addition of M β CD after stimulation with TG) of Ca^{2+} entry. It is known that removal of cholesterol from those domains and, therefore, their damage, attenuates SOCE significantly in different types of cells (Bergdahl *et al.*, 2003;

Jardin *et al.*, 2008d; Prakash *et al.*, 2007). This can be attributed to the disruption of the association between the proteins involved in SOCE, since that association occurs in lipid rafts. When we investigated the role of lipid rafts in Ca^{2+} entry, incubation with M β CD was conducted for 30 minutes. To explore the role of those lipid rafts in the activation of thapsigargin-induced Ca^{2+} entry, it was studied after 180 seconds after the addition of TG; while, for the study of the maintenance of Ca^{2+} entry, measurements were made 30 minutes after TG addition. Moreover, we also studied at those times the sensitivity of Ca^{2+} entry to La^{3+} , which is a SOCE blocker, finding that, while the influx of Ca^{2+} after 180 seconds of stimulation with TG is completely sensitive to La^{3+} , after 30 minutes of TG treatment it was partially insensitive. This La^{3+} -insensitive TG-stimulated Ca^{2+} entry may be attributed to the activation of cation currents through Ca^{2+} -dependent channels or transporters such as the reported reverse $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange activation secondary to store depletion (Harper *et al.*, 2007). Our study has shown shTRPC6 reduces the La^{3+} -insensitive component in this cellular type. Furthermore, it has been also demonstrated that the increase in Ca^{2+} entry by addition of M β CD to the cells previously treated with TG is mainly due to the increase of La^{3+} -insensitive component, without altering SOCE. These results suggest that lipid rafts are not necessary for the maintenance of SOCE once the activation has been produced, but they increase non-capacitative Ca^{2+} entry stimulated by treatment with TG for 30 minutes, an effect that may be attributed to the recruitment of further TRPC6 units to the non-capacitative Ca^{2+} entry pathway, as demonstrated using silencing techniques with shRNAs.

The results of this study also indicate that TRPC1 participates in both the activation and maintenance of TG-stimulated SOCE, but it does not participate in non-capacitative Ca^{2+} entry produced after the disruption of lipid rafts in the cells of this study. On the other hand, and supporting the lack of effect of M β CD on the maintenance of SOCE, it has been demonstrated that the incubation with this agent for 30 minutes after treatment with TG has a negligible effect on the maintenance of Mn^{2+} entry. This cation was used for these studies since it is assumed that it only enters the cell through the store-operated pathway. The use of this ion is widely accepted (Parekh *et al.*, 2005), since it avoids interferences in the study of SOCE arising from the stimulation of PMCA, because Mn^{2+} is transported by this pump with lower affinity than Ca^{2+} (Graf *et al.*, 1982; Rink *et al.*, 1990). Also, this ion inhibits the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (Blaustein *et al.*, 1977)

and the permeability for Mn^{2+} of non-capacitative Ca^{2+} channels (such as TRPV6) is significantly smaller than their permeability for Ca^{2+} (Vennekens *et al.*, 2000).

Although the role of lipid rafts in the activation of SOCE and the association of STIM1 and Orai1 with lipid rafts has been recently questioned by a report that suggests that I_{CRAC} is not dependent on lipid rafts domains (DeHaven *et al.*, 2009), our results indicate that lipid rafts have a relevant role in the activation but not the maintenance of the TG-stimulated association of Orai1 with STIM1 and TRPC1. Thus, in the studies presented in this Thesis, we observed that the TG-evoked association between those proteins was transient and that, 30 minutes after the TG addition, the interaction of those proteins was close to the resting level. Furthermore, we demonstrated that TG promotes an initial association between Orai1 and TRPC6 but a prolonged stimulation with TG produces the dissociation between those proteins. Recently, we showed that TRPC6 participates both in SOCE and in non-capacitative Ca^{2+} entry through its interaction with the Orai1-STIM1 complex or hTRPC3 respectively (Jardin *et al.*, 2009a). Although in the present study we did not analyze the association of TRPC6 with TRPC3, the observed dissociation of TRPC6 from Orai1 may support the idea of the activation of non-capacitative Ca^{2+} entry, which could explain the effects of the M β CD both increasing non-capacitative Ca^{2+} entry and reducing co-immunoprecipitation of Orai1 with TRPC6. This Thesis reveals that lipid rafts play an important role in TG-induced divalent cation entry, which is probably mediated by a role of lipid rafts in the association between Orai1, STIM1, TRPC1 and TRPC6. Lipid rafts disruption prior to SOCE activation results in the attenuation of store-operated association between those proteins, but when the disruption of lipid rafts is produced after store depletion, the association of Orai1 with STIM1 or TRPC1 is not significantly reduced, as well as Mn^{2+} entry, while dissociation between Orai1 and TRPC6 is clearly increased, which explains enhanced non-capacitative Ca^{2+} entry.

We also wanted to study the effect of the disruption of lipid rafts in SOCE in platelets, observing that this disruption, induced by M β CD, attenuates SOCE and impairs the sensibility of SOCE to extracellular Ca^{2+} . At high Ca^{2+} concentrations in extracellular medium (3 mM), divalent cation entry was significantly greater in the presence of M β CD, which may be attributed to the impairment of STIM1 localization in the plasma membrane upon treatment with TG and, subsequently, association with Orai1. However, since the store depletion-induced association of

PM-spanning STIM1 with Orai1 is much greater than PM association of STIM1, we can not rule out the possibility that impairment of the association between PM-STIM1 and Orai1 is due to changes in the lipid environment rather than to the alteration of PM association of STIM1. The disruption of lipid rafts did not alter the resting level of either expression of STIM1 in the plasma membrane or co-immunoprecipitation of PM-spanning STIM1 with Orai1. Although the cause of this phenomenon has not been further studied, it could be explained either by the presence of both lipid raft-dependent and -independent STIM1 pools in the PM or by a reduced turnover of both events.

Furthermore, our results in platelets indicate that lipid rafts, as noted above, are necessary for the association of Orai1 with PM-resident STIM1 and also with the intracellular pool of STIM1. This was detected in our experiments immunoprecipitating whole platelet lysates with anti-STIM1 antibody (so that it includes both the membrane and the intracellular fraction), followed by Western blotting with an anti-Orai1 antibody. The results indicate that the obtained results after STIM1 immunoprecipitation were not only due to PM-STIM1, since the basal association with Orai1 was higher in the whole lysates, as well as TG-evoked association between STIM1 and Orai1.

The results further show that the inhibition of TG-induced translocation of STIM1 to the plasma membrane by disruption of lipid rafts may be due to the location and recruitment of STIM1 into the plasma membrane, rather than to impairment of the intracellular trafficking. This is based on the lack of effect of M β CD in the plasma membrane level of STIM1 in unstimulated cells, which suggests that the turnover of PM-STIM1 is not altered, although we can not rule out that it is reduced. However, it has been shown that, while the recruitment of membrane proteins in phospholipid-rich membrane regions occurs through protein-protein interactions, proteins that associate with lipid rafts require interactions between the lipids in these rafts and the transmembrane domains of proteins or the lipid moiety of proteins attached to the membrane by a lipid modification (Alonso *et al.*, 2001).

Thus, we demonstrated in platelets that lipid rafts are required for the interaction between Orai1 and PM-resident STIM1. The latter, probably acting as a sensor of extracellular Ca²⁺ concentration, is essential for the mechanism of

SOCE inactivation by extracellular Ca^{2+} concentration, which can prevent the intoxication and death of the cell due to excessive Ca^{2+} .

Activation and maintenance of SOCE are regulated differently depending on the cell type, and the cytoskeleton has a very important role in these processes. For example, it is known that the activation of SOCE is sensitive to jasplakinolide, a stabilizer of the actin cytoskeleton, while the maintenance of Ca^{2+} entry is insensitive to actin stabilization both in platelets and in mouse pancreatic acinar cells (Redondo *et al.*, 2003; Rosado *et al.*, 2000a). Besides, it has been reported that in human platelets, microtubules play a dual role in SOCE, acting as a barrier that prevents constitutive SOCE regulated by the dense tubular system (the ER analogue in platelets), and also facilitating SOCE mediated by the acidic Ca^{2+} stores (Redondo *et al.*, 2007b). In contrast, in HEK293 cells, which were the object of our study to generalize our hypothesis, microtubules facilitate SOCE and I_{CRAC} current, which is attributed to a role of the microtubules in the localization of STIM1 (Smyth *et al.*, 2008). Also, it is known that SOCE is insensitive to cytochalasin D, a membrane-permeant inhibitor of actin polymerization, in a large number of cells, like the DDT₁MF-2 transformed smooth muscle cell line or the nontransformed A7r5 smooth muscle line derived from rat embryonic aorta (Patterson *et al.*, 1999). However, the actin network plays an important role in SOCE in neutrophils (Itagaki *et al.*, 2004), human keratinocytes (Korkiamaki *et al.*, 2003), bovine adrenocortical fasciculata cells (Kawamura *et al.*, 2003), glioma C6 cells (Sabala *et al.*, 2002), vascular endothelial cells (Holda *et al.*, 1997) and human platelets (Harper *et al.*, 2007; Rosado *et al.*, 2000a; Rosado *et al.*, 2004). In human platelets, a time-dependent effect of cytochalasin D on SOCE has been observed, which supports the theory that there is a dual role for the actin cytoskeleton in SOCE, as mentioned above, so it acts both as a negative clamp that prevents constitutive SOCE, and also facilitating the coupling between elements in the membrane of the endoplasmic reticulum and Ca^{2+} channels in the plasma membrane (Rosado *et al.*, 2000a; Rosado *et al.*, 2004).

It is because those reasons that in this Thesis we wanted to analyze the role of the cytoskeleton in SOCE in HEK293 cells. For this reason, we use stabilizing agents, like jasplakinolide (which stabilizes the cortical actin network) and paclitaxel (stabilizes microtubules); or disruptors, like cytochalasin D (which disrupts the actin cytoskeleton) or colchicine (which disrupts the microtubules). It was observed that, when using the disruptor agents, TG-evoked SOCE was

increased, while, when the actin network or the microtubules were stabilized, TG-evoked SOCE was reduced, which suggests that actin cytoskeleton and microtubules have an important role in Ca^{2+} influx, probably acting as a barrier that prevents SOCE in resting cells, like in human platelets, as mentioned above (Redondo *et al.*, 2007b). A previous study concluded that nocodazole and colchicine reduce TG-evoked SOCE in HEK293 cells (Smyth *et al.*, 2008). This apparent contradiction between the results obtained in this Thesis and those found by Smyth *et al.* could be due to the fact that both studies estimate SOCE at different stages. In our study, the initiation of Ca^{2+} entry was induced 3 minutes after the addition of TG, while in the study published by Smyth *et al.* TG was added to the cells in a medium containing Ca^{2+} (Smyth *et al.*, 2008). In fact, different stages for SOCE have been reported in certain cellular models, like pancreatic acinar cells (Camello *et al.*, 1999) and human platelets (Jenner *et al.*, 2000), the latter differentially regulated by the cytoskeleton (Jardin *et al.*, 2008b).

The role of the cytoskeleton in the modulation of SOCE has been attributed to a number of signalling events, including the facilitation of STIM1 localization within the endoplasmic reticulum (Smyth *et al.*, 2008), probably through its interaction with the microtubule-plus-end-tracking protein EB1 (Grigoriev *et al.*, 2008), the regulation of TRP channels internalization (Itagaki *et al.*, 2004) or by modulating the interaction of TRPC proteins with the type II IP_3 receptor (Rosado *et al.*, 2001; Rosado *et al.*, 2002). In this Thesis, we report for the first time that the cytoskeleton regulates the association between STIM1 and Orai1 and TRPC1 channels in the plasma membrane. The effects of the alterations of the cytoskeleton shown here, using colchicine, paclitaxel or jasplakinolide, on SOCE, are paralleled by a similar modification of the association between STIM1 and Ca^{2+} channels, suggesting that both the actin filaments and microtubules act as a cortical barrier that prevents the association between STIM1 and Ca^{2+} channels and SOCE; thus disruption of this barrier facilitates both the association between STIM1 and Ca^{2+} channels and SOCE. However, when actin network or microtubules were stabilized, both events were altered. Furthermore, we have discovered that the disruption of actin filaments increases SOCE without inducing any significant effect on the association between STIM1 and Orai1 or STIM1 and TRPC1. We have also found that the disruption of the microfilaments produces an inhibition of TG-induced association between calmodulin and Orai1 or TRPC1. Since inhibition of calmodulin has a similar effect in TG-induced SOCE than disruption of actin filaments, the results in this Thesis demonstrate that

calmodulin has a role in the regulation of SOCE through its interaction with Orai1 and TRPC1, which is supported by the actin cytoskeleton. The microtubules play a further important role in the association between STIM1 and Ca^{2+} channels, as was previously shown (Smyth *et al.*, 2007), since disruption of the microtubules increases this association, a process that has not been observed after inhibition of actin polymerization.

Therefore, our results show that cytoskeleton plays a relevant role in SOCE regulation in HEK293 cells, through the regulation of the interaction between STIM1 and Orai1 or TRPC1. Moreover, actin cytoskeleton facilitates association between calmodulin and Ca^{2+} channels in the plasma membrane, which provides an additional regulator role of Ca^{2+} influx mediated by the stores, so that the disruption of the actin network produces an impairment of the Ca^{2+} -dependent SOCE inactivation.

Calmodulin is a protein responsible for regulating a number of intracellular proteins, including ion channels, in a Ca^{2+} -dependent manner (Zhu *et al.*, 2005). Its interaction with TRP channels was described in *Drosophila* in the 90s (Phillips *et al.*, 1992), suggesting that regulation of TRPC protein function by Ca^{2+} is a conserved mechanism. It is also known that calmodulin interacts with TRPC1 in mammals (Singh *et al.*, 2002), with the polybasic C-termini of STIM1 (Bauer *et al.*, 2008) and with a membrane-proximal N-terminal domain of Orai1 (Mullins *et al.*, 2009). Moreover, it has been shown that calmodulin is involved in Ca^{2+} -dependent inactivation of SOCE. This has been demonstrated using mutants for TRPC1 or Orai1, unable to bind to calmodulin, which prevents Ca^{2+} -dependent inactivation of SOCE in human salivary gland cells (Singh *et al.*, 2002) or I_{CRAC} in HEK293 cells (Mullins *et al.*, 2009), respectively. Over-expression of calmodulin inhibitor peptide or a Ca^{2+} -insensitive calmodulin mutant have also been used, and produce a reduction in inactivation of I_{SOC} in liver cells (Litjens *et al.*, 2004).

Calmodulin is also able to bind to TRPC6 through CIRB domain (C-terminal), which can also bind to IP_3Rs . This site is especially important, since, depending on the Ca^{2+} concentration, calmodulin might act as a switch for IP_3R -mediated activation of TRPC function. TRPC6 has a important role regulating Ca^{2+} entry in human platelets, acting as a point of convergence between receptor- and store-operated Ca^{2+} influx (Woodard *et al.*, 2010). In this Thesis we have investigated the functional role of TRPC6 in human platelets when binding either calmodulin

or IP₃Rs, since this binding plays an important role in the regulation of the function of TRPC channels.

When these experiments were performed, two factors concerning the interaction of TRPCs with calmodulin or IP₃Rs were considered: Ca²⁺ concentration and cytosolic IP₃ concentration. We have found that, at resting IP₃ levels, ionomycin-induced Ca²⁺ influx in the presence of increasing [Ca²⁺]_o results in Ca²⁺-dependent binding of calmodulin to TRPC6 channels, thereby displacing the binding of these channels to IP₃Rs. This suggests that, as it has been indicated for other proteins (Zhu, 2005), the elevation in Ca²⁺ concentration increases the affinity of calmodulin for the CIRB domain of TRPC6. On the other hand, in this Thesis we have discovered that generation of IP₃ is necessary for agonist-induced IP₃R binding to TRPC6, and thus the displacement of calmodulin. In the presence of 1.2 mM extracellular Ca²⁺, stimulation with thrombin, which induces both a large Ca²⁺ entry and IP₃ generation, produces an increase in the association of IP₃Rs with TRPC6, and therefore the dissociation of calmodulin from this channel, suggesting that, at high enough concentrations of IP₃, IP₃Rs are not displaced by calmodulin, even when calmodulin is bound to Ca²⁺.

Our results indicate that, when platelets were stimulated with thrombin to increase IP₃ levels, the association between IP₃Rs and TRPC6 was attenuated when Ca²⁺ entry was abolished, although there was still some association, which was independent on rises in Ca²⁺ concentration, as dimethyl BAPTA-loading had no effect. These results indicate for the first time that agonist-induced association between IP₃Rs and TRPC6 occurs via Ca²⁺ entry-dependent and -independent mechanisms.

Moreover, when we introduced anti-TRPC6 antibody in platelets, with an epitope that overlaps with the CIRB site, we obtained some interesting results concerning the role of this domain in platelet function. The introduction of the antibody altered the interaction between TRPC6 and calmodulin or IP₃Rs, so that aggregation and agonist-induced Ca²⁺ entry were significantly altered. In the presence of the antibody, both cellular processes were inhibited at low [Ca²⁺]_o and increased at high [Ca²⁺]_o. This inhibition of platelet functions at low [Ca²⁺]_o may be due to a partial requirement for the association between IP₃Rs and TRPC6, necessary at low [Ca²⁺]_o but overcome by a Ca²⁺-dependent mechanism,

with low affinity for Ca^{2+} , at high $[\text{Ca}^{2+}]_o$, since Ca^{2+} entry and aggregation were increased at high $[\text{Ca}^{2+}]_o$. This increase of Ca^{2+} entry and aggregation may be due to an impairment of the negative feedback provided by calmodulin in the presence of high $[\text{Ca}^{2+}]_c$. In conclusion, these results reveal that thrombin-stimulated Ca^{2+} entry and aggregation in human platelets are dynamically regulated by the levels of Ca^{2+} and IP_3 via interaction between calmodulin or IP_3 Rs with the CIRB domain in TRPC6 channels.

CONCLUSIONES

- Las balsas lipídicas son importantes para la entrada capacitativa de cationes divalentes, debido al papel de las mismas en la asociación entre Orai1, STIM1 y las subunidades TRPC1 y TRPC6.
- La rotura de las balsas lipídicas tiene importancia para la activación de la entrada capacitativa de calcio, reduciendo la asociación entre las proteínas implicadas en la misma; pero no en el mantenimiento, en el que se aumenta la disociación entre Orai1 y TRPC6 y por tanto la vía no capacitativa.
- Las balsas lipídicas son esenciales para la interacción entre Orai1 y STIM1 de la membrana, que actúa como un sensor extracelular de Ca^{2+} .
- El citoesqueleto tiene un importante papel en la regulación de la entrada capacitativa de Ca^{2+} , a través de la regulación de la interacción entre STIM1 y Orai1 o TRPC1.
- El citoesqueleto de actina sostiene la asociación de calmodulina con los canales de Ca^{2+} de la membrana, lo cual actúa como elemento regulador de la entrada capacitativa de Ca^{2+} .
- La entrada de Ca^{2+} estimulada por trombina, así como la agregación plaquetaria, están reguladas por las concentraciones de Ca^{2+} o de IP_3 , a través de la interacción de la calmodulina o de los IP_3Rs con el dominio CIRB de TRPC6.

CONCLUSIONS

- Lipid rafts are important for capacitative divalent cation entry, due to the role of these rafts in the association between Orai1, STIM1 and the TRPC1 and TRPC6 subunits.
- Disruption of lipid rafts is important for the activation of store-operated Ca^{2+} entry, reducing the association between the proteins involved in this mechanism; but not for the maintenance, which increases the dissociation between Orai1 and TRPC6 and thus the non-capacitative pathway.
- Lipid rafts are essential for the interaction between Orai1 and PM-resident STIM1, which acts as a sensor of extracellular Ca^{2+} concentration.
- Cytoskeleton plays an important role in the regulation of store-operated Ca^{2+} entry, through the regulation of the interaction between STIM1 and Orai1 or TRPC1.
- Actin cytoskeleton supports the association of calmodulin with the Ca^{2+} channels in the plasma membrane, which acts as a regulator element of store-operated Ca^{2+} entry.
- Thrombin-stimulated Ca^{2+} entry, as well as aggregation in human platelets, are regulated by Ca^{2+} and IP_3 levels via interaction of calmodulin or IP_3Rs with the TRPC6 CIRB domain.

BIBLIOGRAFÍA

Abrams C.S., Wu H., Zhao W., Belmonte E., White D., Brass L.F. (1995) Pleckstrin inhibits phosphoinositide hydrolysis initiated by G-protein-coupled and growth factor receptors. A role for pleckstrin's PH domains, *J Biol Chem*, **270**, 14485-14492.

Abrams C.S., Kazaniet M.G., Platelets in hematologic and cardiovascular disorders.: P. Gresele (Ed.), Cambridge University Press, Cambridge, 2008, pp. 272-280.

Adebiyi A., Narayanan D., Jaggar J.H. (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**, 4341-4348.

Adunyah S.E., Dean W.L. (1987) Regulation of human platelet membrane Ca^{2+} transport by cAMP- and calmodulin-dependent phosphorylation, *Biochim Biophys Acta*, **930**, 401-409.

Akkerman J.W. (1978) Regulation of carbohydrate metabolism in platelets. A review, *Thromb Haemost*, **39**, 712-724.

Alessi M.C., Poggi M., Juhan-Vague I. (2007) Plasminogen activator inhibitor-1, adipose tissue and insulin resistance, *Curr Opin Lipidol*, **18**, 240-245.

Alonso M.A., Millan J. (2001) The role of lipid rafts in signalling and membrane trafficking in T lymphocytes, *J Cell Sci*, **114**, 3957-3965.

Ambudkar I.S., Ong H.L., Liu X., Bandyopadhyay B.C., Cheng K.T. (2007) TRPC1: the link between functionally distinct store-operated calcium channels, *Cell Calcium*, **42**, 213-223.

Authi K.S., Bruchhausen F., Walter U., Platelets and their factors, Springer, 1997.

Baba Y., Hayashi K., Fujii Y., Mizushima A., Watarai H., Wakamori M., Numaga T., Mori Y., Iino M., Hikida M., Kurosaki T. (2006) Coupling of STIM1 to store-operated Ca^{2+} entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 16704-16709.

Barkalow K.L., Italiano J.E., Jr., Chou D.E., Matsuoka Y., Bennett V., Hartwig J.H. (2003) Alpha-adducin dissociates from F-actin and spectrin during platelet activation, *J Cell Biol*, **161**, 557-570.

Barnes M.J. (1985) Collagens in atherosclerosis, *Coll Relat Res*, **5**, 65-97.

Bauer M.C., O'Connell D., Cahill D.J., Linse S. (2008) Calmodulin binding to the polybasic C-termini of STIM proteins involved in store-operated calcium entry, *Biochemistry*, **47**, 6089-6091.

Baur H., Kasperek S., Pfaff E. (1975) Criteria of viability of isolated liver cells, *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, **356**, 827-838.

Behnke O. (1968) An electron microscope study of the megacaryocyte of the rat bone marrow. I. The development of the demarcation membrane system and the platelet surface coat, *J Ultrastruct Res*, **24**, 412-433.

Ben-Amor N., Redondo P.C., Bartegi A., Pariente J.A., Salido G.M., Rosado J.A. (2006) A role for 5,6-epoxyeicosatrienoic acid in calcium entry by de novo conformational coupling in human platelets, *J Physiol*, **570**, 309-323.

Benarroch E.E. (2011) NMDA receptors: recent insights and clinical correlations, *Neurology*, **76**, 1750-1757.

Bergdahl A., Gomez M.F., Dreja K., Xu S.Z., Adner M., Beech D.J., Broman J., Hellstrand P., Sward K. (2003) Cholesterol depletion impairs vascular reactivity to endothelin-1 by reducing store-operated Ca^{2+} entry dependent on TRPC1, *Circ Res*, **93**, 839-847.

Berjukow S., Doring F., Froschmayr M., Grabner M., Glossmann H., Hering S. (1996) Endogenous calcium channels in human embryonic kidney (HEK293) cells, *Br J Pharmacol*, **118**, 748-754.

Berridge M.J. (1995) Capacitative calcium entry, *Biochem J*, **312**, 1-11.

Berridge M.J. (1997) Elementary and global aspects of calcium signalling, *J Physiol*, **499**, 291-306.

Berridge M.J., Bootman M.D., Roderick H.L. (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling, *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 517-529.

Beutler E., Williams W.J., Williams hematology, McGraw-Hill, Medical Publishing Division, New York, 2001.

Bezprozvanny I., Watras J., Ehrlich B.E. (1991) Bell-shaped calcium-response curves of $Ins(1,4,5)P_3$ - and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum, *Nature*, **351**, 751-754.

Bezprozvanny I., Ehrlich B.E. (1993) ATP modulates the function of inositol 1,4,5-trisphosphate-gated channels at two sites, *Neuron*, **10**, 1175-1184.

Biondi R.M., Nebreda A.R. (2003) Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions, *Biochem J*, **372**, 1-13.

Birnbaumer L., Zhu X., Jiang M., Boulay G., Peyton M., Vannier B., Brown D., Platano D., Sadeghi H., Stefani E., Birnbaumer M. (1996) On the molecular basis and regulation of cellular capacitative calcium entry: roles for Trp proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 15195-15202.

Blaustein M.P., Santiago E.M. (1977) Effects of internal and external cations and of ATP on sodium-calcium and calcium-calcium exchange in squid axons, *Biophys J*, **20**, 79-111.

Blaustein M.P., Lederer W.J. (1999) Sodium/calcium exchange: its physiological implications, *Physiol Rev*, **79**, 763-854.

Bonifacino J.S., Dell'Angelica E.C., Springer T.A. (2001) Immunoprecipitation, *Curr Protoc Immunol*, **Chapter 8**, Unit 8 3.

Born G.V. (1962) Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal, *Nature*, **194**, 927-929.

Bouaziz A., Amor N.B., Woodard G.E., Zibidi H., Lopez J.J., Bartegi A., Salido G.M., Rosado J.A. (2007) Tyrosine phosphorylation / dephosphorylation balance is involved in thrombin-evoked microtubular reorganisation in human platelets, *Thromb Haemost*, **98**, 375-384.

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.

Brass L.F., Molino M., O'Brien P.J., Kahn M., Platelets in hematologic and cardiovascular disorders.: P. Gresele (Ed.), Cambridge University Press, Cambridge, 2008, pp. 113-126.

Brough G.H., Wu S., Cioffi D., Moore T.M., Li M., Dean N., Stevens T. (2001) Contribution of endogenously expressed Trp1 to a Ca²⁺-selective, store-operated Ca²⁺ entry pathway, *FASEB J*, **15**, 1727-1738.

Burnette W.N. (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A, *Anal Biochem*, **112**, 195-203.

Bushfield M., Hopple S.L., Gibson I.F., Murdoch F.A., MacIntyre D.E. (1987) Effects of protein kinase C activation on human platelet cyclic AMP metabolism, *FEBS Lett*, **222**, 299-304.

Camacho M., Machado J.D., Alvarez J., Borges R. (2008) Intravesicular calcium release mediates the motion and exocytosis of secretory organelles: a study with adrenal chromaffin cells, *J Biol Chem*, **283**, 22383-22389.

Camello-Almaraz C., Pariente J.A., Salido G., Camello P.J. (2000) Differential involvement of vacuolar H⁺-ATPase in the refilling of thapsigargin- and agonist-mobilized Ca²⁺ stores, *Biochem Biophys Res Commun*, **271**, 311-317.

Camello-Almaraz M.C., Pozo M.J., Murphy M.P., Camello P.J. (2006) Mitochondrial production of oxidants is necessary for physiological calcium oscillations, *J Cell Physiol*, **206**, 487-494.

Camello C., Pariente J.A., Salido G.M., Camello P.J. (1999) Sequential activation of different Ca²⁺ entry pathways upon cholinergic stimulation in mouse pancreatic acinar cells, *J Physiol*, **516**, 399-408.

Carafoli E., Stauffer T. (1994) The plasma membrane calcium pump: functional domains, regulation of the activity, and tissue specificity of isoform expression, *J Neurobiol*, **25**, 312-324.

Carey F., Menashi S., Crawford N. (1982) Localization of cyclo-oxygenase and thromboxane synthetase in human platelet intracellular membranes, *Biochem J*, **204**, 847-851.

Carroll R.C., Butler R.G., Morris P.A., Gerrard J.M. (1982) Separable assembly of platelet pseudopodal and contractile cytoskeletons, *Cell*, **30**, 385-393.

Casteel D.E., Smith-Nguyen E.V., Sankaran B., Roh S.H., Pilz R.B., Kim C. (2010) A crystal structure of the cyclic GMP-dependent protein kinase I β dimerization/docking domain reveals molecular details of isoform-specific anchoring, *J Biol Chem*, **285**, 32684-32688.

Cavallini L., Coassin M., Alexandre A. (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**, 449-452.

Celikel R., McClintock R.A., Roberts J.R., Mendolicchio G.L., Ware J., Varughese K.I., Ruggeri Z.M. (2003) Modulation of alpha-thrombin function by distinct interactions with platelet glycoprotein Ibalpha, *Science*, **301**, 218-221.

Cohen A.W., Hnasko R., Schubert W., Lisanti M.P. (2004) Role of caveolae and caveolins in health and disease, *Physiol Rev*, **84**, 1341-1379.

Coleman R.A., Smith W.L., Narumiya S. (1994) International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes, *Pharmacol Rev*, **46**, 205-229.

Coller B.S. (2001) Anti-GPIIb/IIIa drugs: current strategies and future directions, *Thromb Haemost*, **86**, 427-443.

Coughlin S.R., Scarborough R.M., Vu T.K., Hung D.T. (1992) Thrombin receptor structure and function, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **57**, 149-154.

Courtneidge S.A., Fumagalli S., Koegl M., Superti-Furga G., Twamley-Stein G.M. (1993) The Src family of protein tyrosine kinases: regulation and functions, *Dev Suppl*, 57-64.

Covic L., Gresser A.L., Kuliopulos A. (2000) Biphasic kinetics of activation and signaling for PAR1 and PAR4 thrombin receptors in platelets, *Biochemistry*, **39**, 5458-5467.

Craske M., Takeo T., Gerasimenko O., Vaillant C., Torok K., Petersen O.H., Tepikin A.V. (1999) Hormone-induced secretory and nuclear translocation of calmodulin: oscillations of calmodulin concentration with the nucleus as an integrator, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 4426-4431.

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

Chang Y., Bluteau D., Debili N., Vainchenker W. (2007) From hematopoietic stem cells to platelets, *J Thromb Haemost*, **5 Suppl 1**, 318-327.

Chignard M., Le Couedic J.P., Tence M., Vargaftig B.B., Benveniste J. (1979) The role of platelet-activating factor in platelet aggregation, *Nature*, **279**, 799-800.

Chin D., Means A.R. (2000) Calmodulin: a prototypical calcium sensor, *Trends Cell Biol*, **10**, 322-328.

Chow T.W., Hellums J.D., Moake J.L., Kroll M.H. (1992) Shear stress-induced von Willebrand factor binding to platelet glycoprotein Ib initiates calcium influx associated with aggregation, *Blood*, **80**, 113-120.

Christensen K.A., Myers J.T., Swanson J.A. (2002) pH-dependent regulation of lysosomal calcium in macrophages, *J Cell Sci*, **115**, 599-607.

D'Souza S.E., Ginsberg M.H., Burke T.A., Plow E.F. (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**, 3440-3446.

Daniel J.L., Ashby B., Pulcinelli F.M., Platelets in hematologic and cardiovascular disorders.: P. Gresele (Ed.), Cambridge University Press, Cambridge, 2008, pp. 272-280.

Davidson G.A., Varhol R.J. (1995) Kinetics of thapsigargin-Ca²⁺-ATPase (sarcoplasmic reticulum) interaction reveals a two-step binding mechanism and picomolar inhibition, *J Biol Chem*, **270**, 11731-11734.

Davies G.E. (1984) Association of actin with the platelet membrane, *Biochim Biophys Acta*, **772**, 149-160.

de Groot P.G., Sixma J.J., Platelets in hematologic and cardiovascular disorders.: P. Gresele (Ed.), Cambridge University Press, Cambridge, 2008, pp. 304-318.

de la Fuente S., Montenegro P., Fonteriz R.I., Moreno A., Lobaton C.D., Montero M., Alvarez J. (2010) The dynamics of mitochondrial Ca^{2+} fluxes, *Biochim Biophys Acta*, **1797**, 1727-1735.

de Larouziere V., Brouland J.P., Souni F., Drouet L., Cramer E. (1998) Inverse immunostaining pattern for synthesized versus endocytosed alpha-granule proteins in human bone marrow megakaryocytes, *Br J Haematol*, **101**, 618-625.

DeHaven W.I., Jones B.F., Petranka J.G., Smyth J.T., Tomita T., Bird G.S., Putney J.W., Jr. (2009) TRPC channels function independently of STIM1 and Orai1, *J Physiol*, **587**, 2275-2298.

Deng X., Wang Y., Zhou Y., Soboloff J., Gill D.L. (2009) STIM and Orai: dynamic intermembrane coupling to control cellular calcium signals, *J Biol Chem*, **284**, 22501-22505.

Derler I., Fahrner M., Muik M., Lackner B., Schindl R., Groschner K., Romanin C. (2009) A Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CRAC) modulatory domain (CMD) within STIM1 mediates fast Ca^{2+} -dependent inactivation of ORAI1 channels, *J Biol Chem*, **284**, 24933-24938.

Derler I., Plenk P., Fahrner M., Muik M., Jardin I., Schindl R., Gruber H.J., Groschner K., Romanin C. (2013) The extended transmembrane Orai1 N-terminal (ETON) region combines binding interface and gate for Orai1 activation by STIM1, *J Biol Chem*.

Diacovo T.G., Roth S.J., Morita C.T., Rosat J.P., Brenner M.B., Springer T.A. (1996) Interactions of human alpha/beta and gamma/delta T lymphocyte subsets in shear flow with E-selectin and P-selectin, *J Exp Med*, **183**, 1193-1203.

Dietrich A., Chubanov V., Kalwa H., Rost B.R., Gudermann T. (2006) Cation channels of the transient receptor potential superfamily: their role in physiological and pathophysiological processes of smooth muscle cells, *Pharmacol Ther*, **112**, 744-760.

Dionisio N., Albarran L., Lopez J.J., Berna-Erro A., Salido G.M., Bobe R., Rosado J.A. (2011) Acidic NAADP-releasable Ca^{2+} compartments in the megakaryoblastic cell line MEG01, *Biochim Biophys Acta*, **1813**, 1483-1494.

Du X., Beutler L., Ruan C., Castaldi P.A., Berndt M.C. (1987) Glycoprotein Ib and glycoprotein IX are fully complexed in the intact platelet membrane, *Blood*, **69**, 1524-1527.

Dusting G.J., MacDonald P.S. (1990) Prostacyclin and vascular function: implications for hypertension and atherosclerosis, *Pharmacol Ther*, **48**, 323-344.

Eder P., Schindl R., Romanin C., Groschner K., Protein-Protein Interactions in TRPC Channel Complexes: TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades, CRC Press, 2007.

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

Enouf J., Bobe R., Lacabaratz-Porret C., Bredoux R., Corvazier E., Kovacs T., Papp B. (1997) The platelet Ca²⁺ transport ATPase system, *Platelets*, **8**, 5-14.

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

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

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

Folkman J., Browder T., Palmblad J. (2001) Angiogenesis research: guidelines for translation to clinical application, *Thromb Haemost*, **86**, 23-33.

Franke T.F., Yang S.I., Chan T.O., Datta K., Kazlauskas A., Morrison D.K., Kaplan D.R., Tsichlis P.N. (1995) The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase, *Cell*, **81**, 727-736.

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

Fujimura K., Phillips D.R. (1983) Calcium cation regulation of glycoprotein IIb-IIIa complex formation in platelet plasma membranes, *J Biol Chem*, **258**, 10247-10252.

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

Gabbeta J., Yang X., Sun L., McLane M.A., Niewiarowski S., Rao A.K. (1996) Abnormal inside-out signal transduction-dependent activation of glycoprotein IIb-IIIa in a patient with impaired pleckstrin phosphorylation, *Blood*, **87**, 1368-1376.

Gachet C., Hechler B., Leon C., Vial C., Leray C., Ohlmann P., Cazenave J.P. (1997) Activation of ADP receptors and platelet function, *Thromb Haemost*, **78**, 271-275.

Gachet C., Cazenave J.P., Platelets in hematologic and cardiovascular disorders.: P. Gresele (Ed.), Cambridge University Press, Cambridge, 2008, pp. 127-139.

Gambaryan S., Kobsar A., Rukoyatkina N., Herterich S., Geiger J., Smolenski A., Lohmann S.M., Walter U. (2010) Thrombin and collagen induce a feedback inhibitory signaling pathway in platelets involving dissociation of the catalytic subunit of protein kinase A from an NF κ B-I κ B complex, *J Biol Chem*, **285**, 18352-18363.

Geanacopoulos M., Turner J., Bowling K.E., Vandenberg S.R., Gear A.R. (1993) The role of protein kinase C in the initial events of platelet activation by thrombin assessed with a selective inhibitor, *Thromb Res*, **69**, 113-124.

Gear A.R. (1994) Platelet adhesion, shape change, and aggregation: rapid initiation and signal transduction events, *Can J Physiol Pharmacol*, **72**, 285-294.

Gear A.R., Polanowska-Grabowska R.K., Platelets in hematologic and cardiovascular disorders.: P. Gresele (Ed.), Cambridge University Press, Cambridge, 2008, pp. 319-337.

Gelb M.H., Mounier C.M., Hefner Y., Watson S.P., Platelets in hematologic and cardiovascular disorders: P. Gresele (Ed.), Cambridge University Press, Cambridge, 2008, pp. 221-237.

George J.N. (2000) Platelets, *Lancet*, **355**, 1531-1539.

Gerrard J.M., White J.G., Rao G.H., Townsend D. (1976) Localization of platelet prostaglandin production in the platelet dense tubular system, *Am J Pathol*, **83**, 283-298.

Graf E., Verma A.K., Gorski J.P., Lopaschuk G., Niggli V., Zurini M., Carafoli E., Penniston J.T. (1982) Molecular properties of calcium-pumping ATPase from human erythrocytes, *Biochemistry*, **21**, 4511-4516.

Graham F.L., Smiley J., Russell W.C., Nairn R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5, *J Gen Virol*, **36**, 59-74.

Grenegard M., Vretenbrant-Oberg K., Nylander M., Desilets S., Lindstrom E.G., Larsson A., Ramstrom I., Ramstrom S., Lindahl T.L. (2008) The ATP-gated P2X₁ receptor plays a pivotal role in activation of aspirin-treated platelets by thrombin and epinephrine, *J Biol Chem*, **283**, 18493-18504.

Gresele P., Fuster V., Lopez J.A., Page C.P., Vermynen J., Platelets in hematologic and cardiovascular disorders.: P. Gresele (Ed.), Cambridge University Press, Cambridge, 2008.

Grigoriev I., Gouveia S.M., van der Vaart B., Demmers J., Smyth J.T., Honnappa S., Splinter D., Steinmetz M.O., Putney J.W., Jr., Hoogenraad C.C., Akhmanova

A. (2008) STIM1 is a MT-plus-end-tracking protein involved in remodeling of the ER, *Curr Biol*, **18**, 177-182.

Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties, *J Biol Chem*, **260**, 3440-3450.

Habib A., Vezza R., Creminon C., Maclouf J., FitzGerald G.A. (1997) Rapid, agonist-dependent phosphorylation *in vivo* of human thromboxane receptor isoforms. Minimal involvement of protein kinase C, *J Biol Chem*, **272**, 7191-7200.

Halushka P.V., Allan C.J., Davis-Bruno K.L. (1995) Thromboxane A_2 receptors, *J Lipid Mediat Cell Signal*, **12**, 361-378.

Hallam T.J., Rink T.J. (1985) Agonists stimulate divalent cation channels in the plasma membrane of human platelets, *FEBS Lett*, **186**, 175-179.

Hannink M., Donoghue D.J. (1989) Structure and function of platelet-derived growth factor (PDGF) and related proteins, *Biochim Biophys Acta*, **989**, 1-10.

Hardie R.C., Minke B. (1992) The *trp* gene is essential for a light-activated Ca^{2+} channel in *Drosophila* photoreceptors, *Neuron*, **8**, 643-651.

Harker L.A., Finch C.A. (1969) Thrombokinetis in man, *J Clin Invest*, **48**, 963-974.

Harper A.G., Sage S.O. (2007) A key role for reverse $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange influenced by the actin cytoskeleton in store-operated Ca^{2+} entry in human platelets: evidence against the de novo conformational coupling hypothesis, *Cell Calcium*, **42**, 606-617.

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

Hartwig J.H. (1992) Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation, *J Cell Biol*, **118**, 1421-1442.

Haslam R.J. (1973) Interactions of the pharmacological receptors of blood platelets with adenylate cyclase, *Ser Haematol*, **6**, 333-350.

Hisatsune C., Nakamura K., Kuroda Y., Nakamura T., Mikoshiba K. (2005) Amplification of Ca^{2+} signaling by diacylglycerol-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production, *J Biol Chem*, **280**, 11723-11730.

Ho-Tin-Noe B., Goerge T., Wagner D.D. (2009) Platelets: guardians of tumor vasculature, *Cancer Res*, **69**, 5623-5626.

Hocking A.M., Shinomura T., McQuillan D.J. (1998) Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix, *Matrix Biol*, **17**, 1-19.

Hofmann T., Obukhov A.G., Schaefer M., Harteneck C., Gudermann T., Schultz G. (1999) Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol, *Nature*, **397**, 259-263.

Holda J.R., Blatter L.A. (1997) Capacitative calcium entry is inhibited in vascular endothelial cells by disruption of cytoskeletal microfilaments, *FEBS Lett*, **403**, 191-196.

Horstrup K., Jablonka B., Honig-Liedl P., Just M., Kochsiek K., Walter U. (1994) Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition, *Eur J Biochem*, **225**, 21-27.

Huang G.N., Zeng W., Kim J.Y., Yuan J.P., Han L., Muallem S., Worley P.F. (2006) STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I_{CRAC} and TRPC1 channels, *Nat Cell Biol*, **8**, 1003-1010.

Ichinohe T., Takayama H., Ezumi Y., Arai M., Yamamoto N., Takahashi H., Okuma M. (1997) Collagen-stimulated activation of Syk but not c-Src is severely compromised in human platelets lacking membrane glycoprotein VI, *J Biol Chem*, **272**, 63-68.

Inazu T., Taniguchi T., Yanagi S., Yamamura H. (1990) Protein-tyrosine phosphorylation and aggregation of intact human platelets by vanadate with H_2O_2 , *Biochem Biophys Res Commun*, **170**, 259-263.

Irvine R.F., McNulty T.J., Schell M.J. (1999) Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate as a second messenger--a special role in neurones?, *Chem Phys Lipids*, **98**, 49-57.

Itagaki K., Kannan K.B., Singh B.B., Hauser C.J. (2004) Cytoskeletal reorganization internalizes multiple transient receptor potential channels and blocks calcium entry into human neutrophils, *J Immunol*, **172**, 601-607.

Italiano J.E., Jr., Platelets in hematologic and cardiovascular disorders.: P. Gresele (Ed.), Cambridge University Press, Cambridge, 2008, pp. 1-20.

Jackson S.P., Schoenwaelder S.M., Yuan Y., Salem H.H., Cooray P. (1996) Non-receptor protein tyrosine kinases and phosphatases in human platelets, *Thromb Haemost*, **76**, 640-650.

Jackson S.P. (2011) Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly, *Nat Med*, **17**, 1423-1436.

Jakobs K.H., Saur W., Schultz G. (1976) Reduction of adenylate cyclase activity in lysates of human platelets by the alpha-adrenergic component of epinephrine, *J Cyclic Nucleotide Res*, **2**, 381-392.

Jardin I., Ben Amor N., Bartegi A., Pariente J.A., Salido G.M., Rosado J.A. (2007) Differential involvement of thrombin receptors in Ca^{2+} release from two different intracellular stores in human platelets, *Biochem J*, **401**, 167-174.

Jardin I., Lopez J.J., Salido G.M., Rosado J.A. (2008a) 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.

Jardin I., Lopez J.J., Salido G.M., Rosado J.A. (2008b) Functional relevance of the de novo coupling between hTRPC1 and type II IP_3 receptor in store-operated Ca^{2+} entry in human platelets, *Cell Signal*, **20**, 737-747.

Jardin I., Redondo P.C., Salido G.M., Rosado J.A. (2008c) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate enhances store-operated calcium entry through hTRPC6 channel in human platelets, *Biochim Biophys Acta*, **1783**, 84-97.

Jardin I., Salido G.M., Rosado J.A. (2008d) Role of lipid rafts in the interaction between hTRPC1, Orai1 and STIM1, *Channels (Austin)*, **2**, 401-403.

Jardin I., Gomez L.J., Salido G.M., Rosado J.A. (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**, 267-276.

Jardin I., Lopez J.J., Redondo P.C., Salido G.M., Rosado J.A. (2009b) Store-operated Ca^{2+} entry is sensitive to the extracellular Ca^{2+} concentration through plasma membrane STIM1, *Biochim Biophys Acta*, **1793**, 1614-1622.

Jardin I., Complejos STIM1-Orai1-TRPC en la entrada de Ca^{2+} en plaquetas humanas (Tesis Doctoral), Universidad de Extremadura, 2011.

Jenner S., Sage S.O. (2000) Two pathways for store-mediated calcium entry in human platelets, *Platelets*, **11**, 215-221.

Jin J., Daniel J.L., Kunapuli S.P. (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**, 2030-2034.

Jones O.P. (1960) Origin of megakaryocyte granules from Golgi vesicles, *Anat Rec*, **138**, 105-113.

Jones S., Evans R.J., Mahaut-Smith M.P. (2011) Extracellular Ca^{2+} modulates ADP-evoked aggregation through altered agonist degradation: implications for conditions used to study P2Y receptor activation, *Br J Haematol*, **153**, 83-91.

Kahn M.L., Zheng Y.W., Huang W., Bigornia V., Zeng D., Moff S., Farese R.V., Jr., Tam C., Coughlin S.R. (1998) A dual thrombin receptor system for platelet activation, *Nature*, **394**, 690-694.

Kamata T., Handa M., Sato Y., Ikeda Y., Aiso S. (2005) Membrane-proximal α/β stalk interactions differentially regulate integrin activation, *J Biol Chem*, **280**, 24775-24783.

Kaplan K.L., Broekman M.J., Chernoff A., Lesznik G.R., Drillings M. (1979) Platelet alpha-granule proteins: studies on release and subcellular localization, *Blood*, **53**, 604-618.

Kauffmanstein G., Hechler B., Cazenave J.P., Gachet C. (2004) Adenine triphosphate nucleotides are antagonists at the P2Y₁₂ receptor, *J Thromb Haemost*, **2**, 1980-1988.

Kaufman R.M., Airo R., Pollack S., Crosby W.H. (1965) Circulating megakaryocytes and platelet release in the lung, *Blood*, **26**, 720-731.

Kaushansky K. (2008) Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis, *Blood*, **111**, 981-986.

Kawamura M., Terasaka O., Ebisawa T., Kondo I., Masaki E., Ahmed A., Kagata M. (2003) Integrity of actin-network is involved in uridine 5'-triphosphate evoked store-operated Ca²⁺ entry in bovine adrenocortical fasciculata cells, *J Pharmacol Sci*, **91**, 23-33.

Keely P.J., Parise L.V. (1996) The $\alpha_2\beta_1$ integrin is a necessary co-receptor for collagen-induced activation of Syk and the subsequent phosphorylation of phospholipase Cy2 in platelets, *J Biol Chem*, **271**, 26668-26676.

King S.M., Reed G.L. (2002) Development of platelet secretory granules, *Semin Cell Dev Biol*, **13**, 293-302.

Kiselyov K., Shin D.M., Shcheynikov N., Kurosaki T., Muallem S. (2001) Regulation of Ca²⁺-release-activated Ca²⁺ current (I_{CRAC}) by ryanodine receptors in inositol 1,4,5-trisphosphate-receptor-deficient DT40 cells, *Biochem J*, **360**, 17-22.

Klinger M.H. (1996) The storage lesion of platelets: ultrastructural and functional aspects, *Ann Hematol*, **73**, 103-112.

Korkiamaki T., Yla-Outinen H., Koivunen J., Peltonen J. (2003) An intact actin-containing cytoskeleton is required for capacitative calcium entry, but not for ATP-induced calcium-mediated cell signaling in cultured human keratinocytes, *Med Sci Monit*, **9**, BR199-207.

Kruithof E.K., Tran-Thang C., Bachmann F. (1986) Studies on the release of a plasminogen activator inhibitor by human platelets, *Thromb Haemost*, **55**, 201-205.

Lacabaratz-Porret C., Corvazier E., Kovacs T., Bobe R., Bredoux R., Launay S., Papp B., Enouf J. (1998) Platelet sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ATPase

isoform 3b and Rap 1b: interrelation and regulation in physiopathology, *Biochem J*, **332** (Pt 1), 173-181.

Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685.

Lee K.P., Yuan J.P., Zeng W., So I., Worley P.F., Muallem S. (2009) Molecular determinants of fast Ca²⁺-dependent inactivation and gating of the Orai channels, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 14687-14692.

Levy S., Platelets in hematologic and cardiovascular disorders.: P. Gresele (Ed.), Cambridge University Press, Cambridge, 2008, pp. 113-126.

Linder B.L., Chernoff A., Kaplan K.L., Goodman D.S. (1979) Release of platelet-derived growth factor from human platelets by arachidonic acid, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4107-4111.

Lintschinger B., Balzer-Geldsetzer M., Baskaran T., Graier W.F., Romanin C., Zhu M.X., Groschner K. (2000) Coassembly of Trp1 and Trp3 proteins generates diacylglycerol- and Ca²⁺-sensitive cation channels, *J Biol Chem*, **275**, 27799-27805.

Liou J., Kim M.L., Heo W.D., Jones J.T., Myers J.W., Ferrell J.E., Jr., Meyer T. (2005) STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx, *Curr Biol*, **15**, 1235-1241.

Liou J., Fivaz M., Inoue T., Meyer T. (2007) Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after Ca²⁺ store depletion, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 9301-9306.

Litjens T., Harland M.L., Roberts M.L., Barritt G.J., Rychkov G.Y. (2004) Fast Ca²⁺-dependent inactivation of the store-operated Ca²⁺ current (*I*_{SOC}) in liver cells: a role for calmodulin, *J Physiol*, **558**, 85-97.

Liu X., Bandyopadhyay B.C., Singh B.B., Groschner K., Ambudkar I.S. (2005) Molecular analysis of a store-operated and 2-acetyl-sn-glycerol-sensitive non-selective cation channel. Heteromeric assembly of TRPC1-TRPC3, *J Biol Chem*, **280**, 21600-21606.

Lopez-Vilchez I., Escolar G., Diaz-Ricart M., Fuste B., Galan A.M., White J.G. (2007) Tissue factor-enriched vesicles are taken up by platelets and induce platelet aggregation in the presence of factor VIIa, *Thromb Haemost*, **97**, 202-211.

Lopez J.J., Camello-Almaraz C., Pariente J.A., Salido G.M., Rosado J.A. (2005) Ca²⁺ accumulation into acidic organelles mediated by Ca²⁺- and vacuolar H⁺-ATPases in human platelets, *Biochem J*, **390**, 243-252.

Lopez J.J., Redondo P.C., Salido G.M., Pariente J.A., Rosado J.A. (2006a) Two distinct Ca²⁺ compartments show differential sensitivity to thrombin, ADP and vasopressin in human platelets, *Cell Signal*, **18**, 373-381.

Lopez J.J., Salido G.M., Pariente J.A., Rosado J.A. (2006b) Interaction of STIM1 with endogenously expressed human canonical TRP1 upon depletion of intracellular Ca²⁺ stores, *J Biol Chem*, **281**, 28254-28264.

Lowenberg E.C., Meijers J.C., Levi M. (2010) Platelet-vessel wall interaction in health and disease, *Neth J Med*, **68**, 242-251.

Luckhoff A., Clapham D.E. (1992) Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates an endothelial Ca²⁺-permeable channel, *Nature*, **355**, 356-358.

Mahaut-Smith M.P., Ennion S.J., Rolf M.G., Evans R.J. (2000) ADP is not an agonist at P2X₁ receptors: evidence for separate receptors stimulated by ATP and ADP on human platelets, *Br J Pharmacol*, **131**, 108-114.

Marcus A.J. (1978) The role of lipids in platelet function: with particular reference to the arachidonic acid pathway, *J Lipid Res*, **19**, 793-826.

McDonald T.F., Pelzer S., Trautwein W., Pelzer D.J. (1994) Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells, *Physiol Rev*, **74**, 365-507.

Mercer J.C., Dehaven W.I., Smyth J.T., Wedel B., Boyles R.R., Bird G.S., Putney J.W., Jr. (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**, 24979-24990.

Merten M., Thiagarajan P. (2000) P-selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates, *Circulation*, **102**, 1931-1936.

Metcalfe E.E., Traaseth N.J., Veglia G. (2005) Serine 16 phosphorylation induces an order-to-disorder transition in monomeric phospholamban, *Biochemistry*, **44**, 4386-4396.

Missiaen L., Taylor C.W., Berridge M.J. (1991) Spontaneous calcium release from inositol trisphosphate-sensitive calcium stores, *Nature*, **352**, 241-244.

Moers A., Nieswandt B., Massberg S., Wettschureck N., Gruner S., Konrad I., Schulte V., Aktas B., Gratacap M.P., Simon M.I., Gawaz M., Offermanns S. (2003) G13 is an essential mediator of platelet activation in hemostasis and thrombosis, *Nat Med*, **9**, 1418-1422.

Montell C. (2001) Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels, *Sci STKE*, **2001**, re1.

Montell C. (2005) The TRP superfamily of cation channels, *Sci STKE*, **2005**, re3.

Moore C., Tymvios C., Emerson M. (2010) Functional regulation of vascular and platelet activity during thrombosis by nitric oxide and endothelial nitric oxide synthase, *Thromb Haemost*, **104**, 342-349.

Morales S., Camello P.J., Rosado J.A., Mawe G.M., Pozo M.J. (2005) Disruption of the filamentous actin cytoskeleton is necessary for the activation of capacitative calcium entry in naive smooth muscle cells, *Cell Signal*, **17**, 635-645.

Muik M., Fahrner M., Derler I., Schindl R., Bergsmann J., Frischauf I., Groschner K., 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.

Muik M., Fahrner M., Schindl R., Stathopoulos P., Frischauf I., Derler I., Plenk P., Lackner B., Groschner K., Ikura M., Romanin C. (2011) STIM1 couples to ORAI1 via an intramolecular transition into an extended conformation, *EMBO J*, **30**, 1678-1689.

Mullins F.M., Park C.Y., Dolmetsch R.E., Lewis R.S. (2009) STIM1 and calmodulin interact with Orai1 to induce Ca²⁺-dependent inactivation of CRAC channels, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 15495-15500.

Nagata Y., Muro Y., Todokoro K. (1997) Thrombopoietin-induced polyploidization of bone marrow megakaryocytes is due to a unique regulatory mechanism in late mitosis, *J Cell Biol*, **139**, 449-457.

Neher E., Augustine G.J. (1992) Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells, *J Physiol*, **450**, 273-301.

Neumann E., Schaefer-Ridder M., Wang Y., Hofschneider P.H. (1982) Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields, *EMBO J*, **1**, 841-845.

Nieswandt B., Bergmeier W., Schulte V., Rackebrandt K., Gessner J.E., Zirngibl H. (2000) Expression and function of the mouse collagen receptor glycoprotein VI is strictly dependent on its association with the FcRγ chain, *J Biol Chem*, **275**, 23998-24002.

Nieswandt B., Brakebusch C., Bergmeier W., Schulte V., Bouvard D., Mokhtari-Nejad R., Lindhout T., Heemskerk J.W., Zirngibl H., Fassler R. (2001) Glycoprotein VI but not α₂β₁ integrin is essential for platelet interaction with collagen, *EMBO J*, **20**, 2120-2130.

Olson M.F., Ashworth A., Hall A. (1995) An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1, *Science*, **269**, 1270-1272.

Oury C., Toth-Zsamboki E., Thys C., Tytgat J., Vermylen J., Hoylaerts M.F. (2001) The ATP-gated P2X₁ ion channel acts as a positive regulator of platelet responses to collagen, *Thromb Haemost*, **86**, 1264-1271.

Ozdener F., Dangelmaier C., Ashby B., Kunapuli S.P., Daniel J.L. (2002) Activation of phospholipase C γ 2 by tyrosine phosphorylation, *Mol Pharmacol*, **62**, 672-679.

Packham M.A., Rand M.L., Kinlough-Rathbone R.L., Platelets in hematologic and cardiovascular disorders.: P. Gresele (Ed.), Cambridge University Press, Cambridge, 2008, pp. 338-356.

Pani B., Ong H.L., Liu X., Rauser K., Ambudkar I.S., Singh B.B. (2008) Lipid rafts determine clustering of STIM1 in endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions and regulation of store-operated Ca $^{2+}$ entry (SOCE), *J Biol Chem*, **283**, 17333-17340.

Pani B., Singh B.B. (2009) Lipid rafts/caveolae as microdomains of calcium signaling, *Cell Calcium*, **45**, 625-633.

Paredes R.M., Etzler J.C., Watts L.T., Zheng W., Lechleiter J.D. (2008) Chemical calcium indicators, *Methods*, **46**, 143-151.

Parekh A.B., Penner R. (1997) Store depletion and calcium influx, *Physiol Rev*, **77**, 901-930.

Parekh A.B., Putney J.W., Jr. (2005) Store-operated calcium channels, *Physiol Rev*, **85**, 757-810.

Park C.Y., Hoover P.J., Mullins F.M., Bachhawat P., Covington E.D., Rauser S., Walz T., Garcia K.C., Dolmetsch R.E., Lewis R.S. (2009) STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1, *Cell*, **136**, 876-890.

Pasquet J.M., Quek L., Stevens C., Bobe R., Huber M., Duronio V., Krystal G., Watson S.P. (2000) Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate regulates Ca $^{2+}$ entry via btk in platelets and megakaryocytes without increasing phospholipase C activity, *EMBO J*, **19**, 2793-2802.

Patel-Hett S., Wang H., Begonja A.J., Thon J.N., Alden E.C., Wandersee N.J., An X., Mohandas N., Hartwig J.H., Italiano J.E., Jr. (2011) The spectrin-based membrane skeleton stabilizes mouse megakaryocyte membrane systems and is essential for proplatelet and platelet formation, *Blood*, **118**, 1641-1652.

Patel S.R., Richardson J.L., Schulze H., Kahle E., Galjart N., Drabek K., Shivdasani R.A., Hartwig J.H., Italiano J.E., Jr. (2005) Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes, *Blood*, **106**, 4076-4085.

Patterson R.L., van Rossum D.B., Gill D.L. (1999) Store-operated Ca $^{2+}$ entry: evidence for a secretion-like coupling model, *Cell*, **98**, 487-499.

Paul B.Z., Jin J., Kunapuli S.P. (1999) Molecular mechanism of thromboxane A₂-induced platelet aggregation. Essential role for P2T_{AC} and α_{2A} receptors, *J Biol Chem*, **274**, 29108-29114.

Phillips A.M., Bull A., Kelly L.E. (1992) Identification of a *Drosophila* gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the trp phototransduction gene, *Neuron*, **8**, 631-642.

Plant T.D., Schaefer M. (2005) Receptor-operated cation channels formed by TRPC4 and TRPC5, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **371**, 266-276.

Poncz M., Eisman R., Heidenreich R., Silver S.M., Vilaire G., Surrey S., Schwartz E., Bennett J.S. (1987) Structure of the platelet membrane glycoprotein IIb. Homology to the alpha subunits of the vitronectin and fibronectin membrane receptors, *J Biol Chem*, **262**, 8476-8482.

Pozo-Guisado E., Campbell D.G., Deak M., Alvarez-Barrientos A., Morrice N.A., Alvarez I.S., Alessi D.R., Martin-Romero F.J. (2010) Phosphorylation of STIM1 at ERK1/2 target sites modulates store-operated calcium entry, *J Cell Sci*, **123**, 3084-3093.

Pozzan T., Rizzuto R., Volpe P., Meldolesi J. (1994) Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores, *Physiol Rev*, **74**, 595-636.

Prakash Y.S., Thompson M.A., Vaa B., Matabdin I., Peterson T.E., He T., Pabelick C.M. (2007) Caveolins and intracellular calcium regulation in human airway smooth muscle, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **293**, L1118-1126.

Prakriya M., Feske S., Gwack Y., Srikanth S., Rao A., Hogan P.G. (2006) Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel, *Nature*, **443**, 230-233.

Prieschl E.E., Baumruker T. (2000) Sphingolipids: second messengers, mediators and raft constituents in signaling, *Immunol Today*, **21**, 555-560.

Pulcinelli F.M., Daniel J.L., Riondino S., Gazzaniga P.P., Salganicoff L. (1995) Fibrinogen binding is independent of an increase in intracellular calcium concentration in thrombin degranulated platelets, *Thromb Haemost*, **73**, 304-308.

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

Radley J.M., Scurfield G. (1980) The mechanism of platelet release, *Blood*, **56**, 996-999.

Redondo P.C., Lajas A.I., Salido G.M., Gonzalez A., Rosado J.A., Pariente J.A. (2003) Evidence for secretion-like coupling involving pp60src in the activation and maintenance of store-mediated Ca²⁺ entry in mouse pancreatic acinar cells, *Biochem J*, **370**, 255-263.

Redondo P.C., Salido G.M., Pariente J.A., Rosado J.A. (2004) Dual effect of hydrogen peroxide on store-mediated calcium entry in human platelets, *Biochem Pharmacol*, **67**, 1065-1076.

Redondo P.C., Ben-Amor N., Salido G.M., Bartegi A., Pariente J.A., Rosado J.A. (2005a) Ca²⁺-independent activation of Bruton's tyrosine kinase is required for store-mediated Ca²⁺ entry in human platelets, *Cell Signal*, **17**, 1011-1021.

Redondo P.C., Jardin I., Hernandez-Cruz J.M., Pariente J.A., Salido G.M., Rosado J.A. (2005b) Hydrogen peroxide and peroxyntirite enhance Ca²⁺ mobilization and aggregation in platelets from type 2 diabetic patients, *Biochem Biophys Res Commun*, **333**, 794-802.

Redondo P.C., Harper M.T., Rosado J.A., Sage S.O. (2006) A role for cofilin in the activation of store-operated calcium entry by de novo conformational coupling in human platelets, *Blood*, **107**, 973-979.

Redondo P.C., Harper A.G., Harper M.T., Brownlow S.L., Rosado J.A., Sage S.O. (2007a) hTRPC1-associated alpha-actinin, and not hTRPC1 itself, is tyrosine phosphorylated during human platelet activation, *J Thromb Haemost*, **5**, 2476-2483.

Redondo P.C., Harper A.G., Sage S.O., Rosado J.A. (2007b) Dual role of tubulin-cytoskeleton in store-operated calcium entry in human platelets, *Cell Signal*, **19**, 2147-2154.

Redondo P.C., Salido G.M., Pariente J.A., Sage S.O., Rosado J.A. (2008) SERCA2b and 3 play a regulatory role in store-operated calcium entry in human platelets, *Cell Signal*, **20**, 337-346.

Redondo P.C., Blood coagulation.: J.A. Rosado (Ed.) Textbook of hemostasis and blood coagulation, Research Signpost, Kerala, 2009, pp. 47-60.

Rhee S.G., Choi K.D. (1992) Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes, *J Biol Chem*, **267**, 12393-12396.

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

Rittenhouse S.E. (1996) Phosphoinositide 3-kinase activation and platelet function, *Blood*, **88**, 4401-4414.

Roos J., DiGregorio P.J., Yeromin A.V., Ohlsen K., Liudyno M., Zhang S., Safrina O., Kozak J.A., Wagner S.L., Cahalan M.D., Velicelebi G., Stauderman K.A. (2005) STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function, *J Cell Biol*, **169**, 435-445.

Rosado J.A., Jenner S., Sage S.O. (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**, 7527-7533.

Rosado J.A., Sage S.O. (2000b) A role for the actin cytoskeleton in the initiation and maintenance of store-mediated calcium entry in human platelets, *Trends Cardiovasc Med*, **10**, 327-332.

Rosado J.A., Sage S.O. (2000c) Coupling between inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and human transient receptor potential channel 1 when intracellular Ca^{2+} stores are depleted, *Biochem J*, **350**, 631-635.

Rosado J.A., Sage S.O. (2000d) Farnesylcysteine analogues inhibit store-regulated Ca^{2+} entry in human platelets: evidence for involvement of small GTP-binding proteins and actin cytoskeleton, *Biochem J*, **347**, 183-192.

Rosado J.A., Sage S.O. (2000e) Protein kinase C activates non-capacitative calcium entry in human platelets, *J Physiol*, **529**, 159-169.

Rosado J.A., Sage S.O. (2001) 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**, 191-198.

Rosado J.A., Brownlow S.L., Sage S.O. (2002) Endogenously expressed Trp1 is involved in store-mediated Ca^{2+} entry by conformational coupling in human platelets, *J Biol Chem*, **277**, 42157-42163.

Rosado J.A., Lopez J.J., Harper A.G., Harper M.T., Redondo P.C., Pariente J.A., Sage S.O., Salido G.M. (2004) Two pathways for store-mediated calcium entry differentially dependent on the actin cytoskeleton in human platelets, *J Biol Chem*, **279**, 29231-29235.

Rosado J.A., Redondo P.C., Sage S.O., Pariente J.A., Salido G.M. (2005) Store-operated Ca^{2+} entry: vesicle fusion or reversible trafficking and de novo conformational coupling?, *J Cell Physiol*, **205**, 262-269.

Rosenberg S., Stracher A., Lucas R.C. (1981) Isolation and characterization of actin and actin-binding protein from human platelets, *J Cell Biol*, **91**, 201-211.

Rosenberg S., Stracher A. (1982) Effect of actin-binding protein on the sedimentation properties of actin, *J Cell Biol*, **94**, 51-55.

Ryu S.H., Kim U.H., Wahl M.I., Brown A.B., Carpenter G., Huang K.P., Rhee S.G. (1990) Feedback regulation of phospholipase C-beta by protein kinase C, *J Biol Chem*, **265**, 17941-17945.

Sabala P., Targos B., Caravelli A., Czajkowski R., Lim D., Gagnaniello G., Santella L., Baranska J. (2002) Role of the actin cytoskeleton in store-mediated calcium entry in glioma C6 cells, *Biochem Biophys Res Commun*, **296**, 484-491.

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

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

Salido G.M., Jardin I., Rosado J.A. (2011) The TRPC ion channels: association with Orai1 and STIM1 proteins and participation in capacitative and non-capacitative calcium entry, *Adv Exp Med Biol*, **704**, 413-433.

Sampieri A., Zepeda A., Carlos S., Alfonso S., Vaca L. (2008) STIM1 converts TRPC1 from a receptor-operated to a store-operated channel: moving TRPC1 in and out of lipid rafts, *Cell Calcium*, **44**, 479-491.

Santoro S.A. (1988) Molecular basis of platelet adhesion to collagen, *Prog Clin Biol Res*, **283**, 291-314.

Savage B., Almus-Jacobs F., Ruggeri Z.M. (1998) Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow, *Cell*, **94**, 657-666.

Scase T.J., Heath M.F., Allen J.M., Sage S.O., Evans R.J. (1998) Identification of a P_{2X1} purinoceptor expressed on human platelets, *Biochem Biophys Res Commun*, **242**, 525-528.

Shattil S.J., Cunningham M., Wiedmer T., Zhao J., Sims P.J., Brass L.F. (1992) Regulation of glycoprotein IIb-IIIa receptor function studied with platelets permeabilized by the pore-forming complement proteins C5b-9, *J Biol Chem*, **267**, 18424-18431.

Shaw G., Morse S., Ararat M., Graham F.L. (2002) Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells, *FASEB J*, **16**, 869-871.

Shukla S.D., Franklin C.C., Carter M.G. (1987) Activation of phospholipase C in platelets by platelet activating factor and thrombin causes hydrolysis of a common pool of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, *Biochim Biophys Acta*, **929**, 134-141.

Siljander P.R., Farndale R.W., Platelets in hematologic and cardiovascular disorders.: P. Gresele (Ed.), Cambridge University Press, Cambridge, 2008, pp. 158-178.

Simmerman H.K., Jones L.R. (1998) Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function, *Physiol Rev*, **78**, 921-947.

Simons K., Toomre D. (2000) Lipid rafts and signal transduction, *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 31-39.

Singh B.B., Liu X., Tang J., Zhu M.X., Ambudkar I.S. (2002) Calmodulin regulates Ca²⁺-dependent feedback inhibition of store-operated Ca²⁺ influx by interaction with a site in the C terminus of TrpC1, *Mol Cell*, **9**, 739-750.

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

Sixma J.J., van Zanten G.H., Huizinga E.G., van der Plas R.M., Verkley M., Wu Y.P., Gros P., de Groot P.G. (1997) Platelet adhesion to collagen: an update, *Thromb Haemost*, **78**, 434-438.

Smyth J.T., DeHaven W.I., Bird G.S., Putney J.W., Jr. (2007) Role of the microtubule cytoskeleton in the function of the store-operated Ca^{2+} channel activator STIM1, *J Cell Sci*, **120**, 3762-3771.

Smyth J.T., Dehaven W.I., Bird G.S., Putney J.W., Jr. (2008) Ca^{2+} -store-dependent and -independent reversal of Stim1 localization and function, *J Cell Sci*, **121**, 762-772.

Smyth J.T., Petranka J.G., Boyles R.R., DeHaven W.I., Fukushima M., Johnson K.L., Williams J.G., Putney J.W., Jr. (2009) Phosphorylation of STIM1 underlies suppression of store-operated calcium entry during mitosis, *Nat Cell Biol*, **11**, 1465-1472.

Soboloff J., Spassova M.A., Hewavitharana T., He L.P., Xu W., Johnstone L.S., Dziadek M.A., Gill D.L. (2006) STIM2 is an inhibitor of STIM1-mediated store-operated Ca^{2+} Entry, *Curr Biol*, **16**, 1465-1470.

Spassova M.A., Soboloff J., He L.P., Xu W., Dziadek M.A., Gill D.L. (2006) STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca^{2+} channels, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 4040-4045.

Srikanth S., Jung H.J., Kim K.D., Souda P., Whitelegge J., Gwack Y. (2010) A novel EF-hand protein, CRACR2A, is a cytosolic Ca^{2+} sensor that stabilizes CRAC channels in T cells, *Nat Cell Biol*, **12**, 436-446.

Stathopoulos P.B., Li G.Y., Plevin M.J., Ames J.B., Ikura M. (2006) Stored Ca^{2+} depletion-induced oligomerization of stromal interaction molecule 1 (STIM1) via the EF-SAM region: An initiation mechanism for capacitive Ca^{2+} entry, *J Biol Chem*, **281**, 35855-35862.

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

Stefanini L., Bergmeier W. (2010) CalDAG-GEFI and platelet activation, *Platelets*, **21**, 239-243.

Steiner M., Ikeda Y. (1979) Quantitative assessment of polymerized and depolymerized platelet microtubules. Changes caused by aggregating agents, *J Clin Invest*, **63**, 443-448.

Stenberg P.E., Levin J. (1989) Mechanisms of platelet production, *Blood Cells*, **15**, 23-47.

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

Strehler E.E., Zacharias D.A. (2001) Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps, *Physiol Rev*, **81**, 21-50.

Suganuma A., Nakashima S., Okano Y., Nozawa Y. (1992) Mass contents of inositol 1,4,5-trisphosphate and 1,2-diacylglycerol in human platelets stimulated with a thromboxane analogue and thrombin, *Thromb Haemost*, **68**, 341-345.

Sun B., Li J., Okahara K., Kambayashi J. (1998) P2X₁ purinoceptor in human platelets. Molecular cloning and functional characterization after heterologous expression, *J Biol Chem*, **273**, 11544-11547.

Sundivakkam P.C., Kwiatek A.M., Sharma T.T., Minshall R.D., Malik A.B., Tirupathi C. (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**, C403-413.

Swindells M.B., Ikura M. (1996) Pre-formation of the semi-open conformation by the apo-calmodulin C-terminal domain and implications binding IQ-motifs, *Nat Struct Biol*, **3**, 501-504.

Taylor A., Cooper D., Granger D.N. (2005) Platelet-vessel wall interactions in the microcirculation, *Microcirculation*, **12**, 275-285.

Tamarina N.A., Kuznetsov A., Philipson L.H. (2008) Reversible translocation of EYFP-tagged STIM1 is coupled to calcium influx in insulin secreting beta-cells, *Cell Calcium*, **44**, 533-544.

Tang J., Lin Y., Zhang Z., Tikunova S., Birnbaumer L., Zhu M.X. (2001) Identification of common binding sites for calmodulin and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors on the carboxyl termini of trp channels, *J Biol Chem*, **276**, 21303-21310.

Taylor C.W., Richardson A. (1991) Structure and function of inositol trisphosphate receptors, *Pharmacol Ther*, **51**, 97-137.

Thastrup O., Dawson A.P., Scharff O., Foder B., Cullen P.J., Drobak B.K., Bjerrum P.J., Christensen S.B., Hanley M.R. (1989) Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage, *Agents Actions*, **27**, 17-23.

Thomas P., Smart T.G. (2005) HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins, *J Pharmacol Toxicol Methods*, **51**, 187-200.

Tocantis L. (1948) Historical notes on blood platelets, *Blood*, **3**, 1073-1082.

Torti M., Lapetina E.G., Platelets in hematologic and cardiovascular disorders.: P. Gresele (Ed.), Cambridge University Press, Cambridge, 2008, pp. 238-259.

Toyoshima C. (2008) Structural aspects of ion pumping by Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum, *Arch Biochem Biophys*, **476**, 3-11.

Trebak M., Vazquez G., Bird G.S., Putney J.W., Jr. (2003) The TRPC3/6/7 subfamily of cation channels, *Cell Calcium*, **33**, 451-461.

Ueno M., Kodali M., Tello-Montoliu A., Angiolillo D.J. (2011) Role of platelets and antiplatelet therapy in cardiovascular disease, *J Atheroscler Thromb*, **18**, 431-442.

Ullrich A., Schlessinger J. (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity, *Cell*, **61**, 203-212.

Vaca L. (2010) SOCIC: the store-operated calcium influx complex, *Cell Calcium*, **47**, 199-209.

Varga-Szabo D., Authi K.S., Braun A., Bender M., Ambily A., Hassock S.R., Gudermann T., Dietrich A., Nieswandt B. (2008) Store-operated Ca²⁺ entry in platelets occurs independently of transient receptor potential (TRP) C1, *Pflugers Arch*, **457**, 377-387.

Vennekens R., Hoenderop J.G., Prenen J., Stuiver M., Willems P.H., Droogmans G., Nilius B., Bindels R.J. (2000) Permeation and gating properties of the novel epithelial Ca(2+) channel, *J Biol Chem*, **275**, 3963-3969.

Verkleij M.W., Morton L.F., Knight C.G., de Groot P.G., Barnes M.J., Sixma J.J. (1998) Simple collagen-like peptides support platelet adhesion under static but not under flow conditions: interaction via $\alpha 2 \beta 1$ and von Willebrand factor with specific sequences in native collagen is a requirement to resist shear forces, *Blood*, **91**, 3808-3816.

Vial C., Rolf M.G., Mahaut-Smith M.P., Evans R.J. (2002) A study of P2X₁ receptor function in murine megakaryocytes and human platelets reveals synergy with P2Y receptors, *Br J Pharmacol*, **135**, 363-372.

Vig M., Beck A., Billingsley J.M., Lis A., Parvez S., Peinelt C., Koomoa D.L., Soboloff J., Gill D.L., Fleig A., Kinet J.P., Penner R. (2006) CRACM1 multimers form the ion-selective pore of the CRAC channel, *Curr Biol*, **16**, 2073-2079.

Vijayan K.V., Liu Y., Li T.T., Bray P.F. (2004) Protein phosphatase 1 associates with the integrin α IIb $\beta 3$ subunit and regulates signaling, *J Biol Chem*, **279**, 33039-33042.

Vitrat N., Cohen-Solal K., Pique C., Le Couedic J.P., Norol F., Larsen A.K., Katz A., Vainchenker W., Debili N. (1998) Endomitosis of human megakaryocytes are due to abortive mitosis, *Blood*, **91**, 3711-3723.

Vogel W., Lammers R., Huang J., Ullrich A. (1993) Activation of a phosphotyrosine phosphatase by tyrosine phosphorylation, *Science*, **259**, 1611-1614.

Vu T.K., Hung D.T., Wheaton V.I., Coughlin S.R. (1991) Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation, *Cell*, **64**, 1057-1068.

Wang Y., Deng X., Mancarella S., Hendron E., Eguchi S., Soboloff J., Tang X.D., Gill D.L. (2010) The calcium store sensor, STIM1, reciprocally controls Orai and $Ca_v1.2$ channels, *Science*, **330**, 105-109.

Watson S.P. (2009) Platelet activation by extracellular matrix proteins in haemostasis and thrombosis, *Curr Pharm Des*, **15**, 1358-1372.

Wes P.D., Chevesich J., Jeromin A., Rosenberg C., Stetten G., Montell C. (1995) TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 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**, 447-461.

White J.G. (1972) Interaction of membrane systems in blood platelets, *Am J Pathol*, **66**, 295-312.

White J.G. (1987) An overview of platelet structural physiology, *Scanning Microsc*, **1**, 1677-1700.

White J.G., Platelets in hematologic and cardiovascular disorders.: P. Gresele (Ed.), Cambridge University Press, Cambridge, 2008, pp. 41-69.

Woodard G.E., Lopez J.J., Jardin I., Salido G.M., 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.

Worth R.G., Chien C.D., Chien P., Reilly M.P., McKenzie S.E., Schreiber A.D. (2006) Platelet Fc γ RIIA binds and internalizes IgG-containing complexes, *Exp Hematol*, **34**, 1490-1495.

Yamashita M., Navarro-Borelly L., McNally B.A., Prakriya M. (2007) Orai1 mutations alter ion permeation and Ca^{2+} -dependent fast inactivation of CRAC channels: evidence for coupling of permeation and gating, *J Gen Physiol*, **130**, 525-540.

Yao Y., Ferrer-Montiel A.V., Montal M., Tsien R.Y. (1999) Activation of store-operated Ca^{2+} current in *Xenopus oocytes* requires SNAP-25 but not a diffusible messenger, *Cell*, **98**, 475-485.

Yeromin A.V., Zhang S.L., Jiang W., Yu Y., Safrina O., Cahalan M.D. (2006) Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai, *Nature*, **443**, 226-229.

Young K.W., Bootman M.D., Channing D.R., Lipp P., Maycox P.R., Meakin J., Challiss R.A., Nahorski S.R. (2000) Lysophosphatidic acid-induced Ca^{2+} mobilization requires intracellular sphingosine 1-phosphate production. Potential involvement of endogenous EDG-4 receptors, *J Biol Chem*, **275**, 38532-38539.

Yu S.P., Kerchner G.A. (1998) Endogenous voltage-gated potassium channels in human embryonic kidney (HEK293) cells, *J Neurosci Res*, **52**, 612-617.

Yuan J.P., Zeng W., Huang G.N., Worley P.F., Muallem S. (2007) STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels, *Nat Cell Biol*, **9**, 636-645.

Yuan J.P., Zeng W., Dorwart M.R., Choi Y.J., Worley P.F., Muallem S. (2009) SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels, *Nat Cell Biol*, **11**, 337-343.

Zagranichnaya T.K., Wu X., Villereal M.L. (2005) Endogenous TRPC1, TRPC3, and TRPC7 proteins combine to form native store-operated channels in HEK-293 cells, *J Biol Chem*, **280**, 29559-29569.

Zbidi H., Jardin I., Woodard G.E., Lopez J.J., Berna-Ero A., Salido G.M., Rosado J.A. (2011) 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**, 12257-12270.

Zhang S.L., Yu Y., Roos J., Kozak J.A., Deerinck T.J., Ellisman M.H., Stauderman K.A., Cahalan M.D. (2005) STIM1 is a Ca^{2+} sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca^{2+} store to the plasma membrane, *Nature*, **437**, 902-905.

Zhu M.X. (2005) Multiple roles of calmodulin and other Ca^{2+} -binding proteins in the functional regulation of TRP channels, *Pflugers Arch*, **451**, 105-115.

Zhu M.X., Li Y.P., Xie M., Xin H.Z. (2005) Sorption of an anionic dye by uncalcined and calcined layered double hydroxides: a case study, *J Hazard Mater*, **120**, 163-171.

Zhu M.X., Evans A.M., Ma J., Parrington J., Galione A. (2010) Two-pore channels for integrative Ca^{2+} signaling, *Commun Integr Biol*, **3**, 12-17.

Zhu X., Chu P.B., Peyton M., Birnbaumer L. (1995) Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the *Drosophila* trp gene, *FEBS Lett*, **373**, 193-198.

Zhu X., Jiang M., Peyton M., Boulay G., Hurst R., Stefani E., Birnbaumer L. (1996) trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca^{2+} entry, *Cell*, **85**, 661-671.

Zitt C., Zobel A., Obukhov A.G., Harteneck C., Kalkbrenner F., Luckhoff A., Schultz G. (1996) Cloning and functional expression of a human Ca^{2+} -permeable cation channel activated by calcium store depletion, *Neuron*, **16**, 1189-1196.

Zucker M.B., Mosesson M.W., Broekman M.J., Kaplan K.L. (1979) Release of platelet fibronectin (cold-insoluble globulin) from alpha granules induced by thrombin or collagen; lack of requirement for plasma fibronectin in ADP-induced platelet aggregation, *Blood*, **54**, 8-12.

Zweifach A., Lewis R.S. (1995) Rapid inactivation of depletion-activated calcium current (I_{CRAC}) due to local calcium feedback, *J Gen Physiol*, **105**, 209-226.

