

**UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA**



Papel del calcio en la secreción de los gránulos alfa y densos en plaquetas humanas

Memoria de tesis para optar al grado de doctora presentada por
Nuria Bermejo Vega

Directores:

Dr. Juan Antonio Rosado Dionisio

Dr. Pedro Cosme Redondo Liberal

Dr. Alejandro Rafael Berna Erro

Cáceres, 2013



UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
Campus universitario
Avenida de la Universidad s/n
10003 Cáceres
Telf: 927 25 71 39

D. Juan Antonio Rosado Dionisio, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura,

D. Pedro Cosme Redondo Liberal, Doctor en Biología e Investigador del Programa Ramón y Cajal del Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura,

y D. Alejandro Rafael Berna Erro, Doctor en Biología e Investigador contratado del Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura,

CERTIFICAN que Dña. Nuria Bermejo Vega, licenciada en Medicina y Cirugía por la Universidad de Salamanca, ha realizado bajo su dirección los estudios y experimentos necesarios para la elaboración de la memoria titulada "Papel del calcio en la secreción de los gránulos alfa y densos en plaquetas humanas", **y entendiendo que se encuentra finalizada y que reúne los requisitos de originalidad, autorizamos su presentación para que pueda ser juzgada por el Tribunal correspondiente para optar al grado de Doctora por la Universidad de Extremadura.**

Y para que así conste, a los efectos legales, firman la presente en Cáceres a diez de Octubre de dos mil doce.

Fdo. Juan A. Rosado Dionisio

Fdo. Pedro C. Redondo Liberal

Fdo. Alejandro R. Berna Erro

A mis hijos,

Miguel, mi angel, *in memoriam*

Íñigo, el sol y la sal de mi vida

A Pedro,

que nunca ha dejado de apoyarme

y con quien quiero seguir compartiendo

camino, promesa y esperanza

Lo bueno que yo tenga, vosotros me lo disteis

Agradecimientos

Llegar hasta aquí no ha sido sencillo, pero nunca faltaron manos amigas que me allanaran el camino. Quiero dar las gracias especialmente a aquellos que me apoyaron, alentaron y confiaron en mi en las circunstancias más difíciles.

A quienes me han instruído, dirigido y aconsejado en la elaboración de mi tesis, el profesor Ginés Salido, catedrático del Departamento de Fisiología de la UEX, y los doctores Juan Antonio Rosado, Pedro Redondo y Alejandro Berna. Ha sido un privilegio conocerlos y aprender de vosotros, y espero lograr el privilegio aún mayor de llegar a contaros entre mis amigos. A Leticia, Natalia, Carmen, Inés, Esther, Isaac y JJ, que con tanta generosidad han compartido su buen hacer y experiencia en el laboratorio conmigo.

A quienes me han guiado en el conocimiento de la medicina, mi querido padre, mi primer y mejor maestro, de quien tanto aprendí y a quien tanto echo de menos, y mis compañeros, especialmente los hematólogos del Hospital San Pedro de Alcántara, de los que sigo aprendiendo, gracias por vuestra paciencia con mis limitaciones.

A quienes con su ejemplo y su afecto me han enseñado la ciencia más difícil de todas, la de vivir con fe y esperanza, mi querida madre, que sigue cuidando de todos, el corazón valiente y generoso a quien querría parecerme, mi hermana Gema, el refugio seguro donde se que me quieren, mi tío Satu, que es un segundo padre para mí, y mi tía Sagrario, por su bondad y sus libros. Y a los que estuvieron a mi lado en los momentos duros, mis sobrinos, Jara y Juanjo, y mis buenas amigas Mari Carmen, Cáliz, Isabel, Juani, Tina, Inma, Menchu, Rosa y Victoria.

Sin vosotros, nunca se hubiera escrito esta tesis.

Abreviaturas

[Ca²⁺]_c: Concentración de Ca²⁺ citosólico.

[Ca²⁺]_i: Concentración de Ca²⁺ intracelular.

[Ca²⁺]_s: Concentración de Ca²⁺ en los depósitos.

5HT: 5-hidroxitriptamina.

aa: aminoácidos.

AA: Ácido araquidónico.

ABP: Proteínas unidas a actina.

AC: Adenilato ciclasa.

ADP: Adenosina difosfato.

AMPc: Adenosina monofosfato cíclico.

ASA: Aspirina.

ATP: Adenosina trifosfato.

BSA: Albúmina de suero bovino.

BtK: Tirosina cinasa de Bruton.

Ca²⁺ : Calcio.

CAD: Dominio activador de los canales CRAC.

CaIDAG-GEF/RasGRP: Factor de intercambio de nucleótidos de guanina regulado por Ca²⁺ y DAG.

CRAC: Corrientes activadas por la liberación de Ca²⁺.

CICR: Liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺.

CIF: Factor del influjo de Ca²⁺.

CIRB: Dominio de unión de los TRPCs a IP₃R y calmodulina.

CMD: Dominio modulador de los canales CRAC.

COX: Ciclooxigenasa.

CRAC: Canales de Ca^{2+} activados por la liberación de Ca^{2+} .

DAG: D-1,2-diacilglicerol.

DMSO: Dimetil sulfóxido.

Dominio K: Dominio rico en lisinas.

DTS: Dense tubular system.

DTT: Ditiotreititol.

ECC: Entrada capacitativa de calcio.

EF-hand: Dominio de unión a Ca^{2+} .

EGF: Factor de crecimiento epidérmico.

ENCC: Entrada no capacitativa de calcio.

EPs: Receptor de prostaglandina I_2 .

ER: Endoplasmatic reticulum.

EWKFAR: Dominio característico de los TRPs.

FVW: Factor von Willebrand

FAK: Cinasa de adhesión focal.

FGF: Factor de crecimiento de los fibroblastos.

FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

GMPc: Guanosina monofosfato cíclica.

GP: Glicoproteína.

GPCR: Receptores acoplados a proteínas G

GDP: Guanosina difosfato.

GTP: Guanosina trifosfato.

H⁺: Protones.

H⁺-ATPasa: Bomba de H⁺ vacuolar.

HBS: Tampón hepes salino.

HRP: Peroxidasa de rábano picante.

ICAM-2: Molécula de adhesión intracelular 2

Ig: Inmunoglobulina.

Iono: Ionomicina.

IP₃ : Inositol 1,4,5-trifosfato.

IP₃R: Receptor inositol 1,4,5-trifosfato.

IP₄ : Inositol 1,3,4,5- tetrakisfosfato

JP: Jasplakinolide.

LB: Solución Laemmli

LDPR/S: Lugar de escisión de la trombina en el receptor de trombina.

LRR: Secuencia de leucinas muy conservadas.

MLC: Cadena ligera de miosina.

MLCK: Cinasa de la cadena ligera de miosina.

Mn²⁺ : Manganeso.

MP: Membrana plasmática.

Na⁺ : Sodio.

NAADP: Nicotinato de adenina dinucleótido fosfato.

NAADPR: Receptor de Nicotinato de adenina dinucleótido fosfato.

NADP: Nicotinadenín dinucleótido fosfato.

NCX: Intercambiador sodio calcio.

NGF: Factor de crecimiento nervioso.

NO: Óxido nítrico.

NRTK: Tirosina cinasa no receptor.

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

OASF: Fragmento más pequeño activador de Orai1.

P47: Pleckstrina.

PA: Ácido fosfatídico.

PAF: Factor activador de las plaquetas.

PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1.

PAR: Receptor activado por proteasas.

PBS: Tampón fosfato salino.

pCa²⁺ : Permeabilidad al calcio.

PDGF: Factor de crecimiento derivado de la plaqueta.

PE: Ficoeritrina.

PF-4: Factor plaquetario 4.

PG: Prostaglandina.

PGI₂ : Prostaglandina I₂.

PH: Dominio de unión a pleckstrina.

PI3K: 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.

PMA: Aceto miristato de forbol

PMCA: Bomba ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática.

PM-STIM1: Plasma membrane STIM1.

pNa⁺ : Permeabilidad al sodio.

PPP: Plasma pobre en plaquetas.

PRP: Plasma rico en plaquetas.

PTKs: Proteínas tirosina cinasas.

PTP: Proteínas tirosina fosfatasa.

RE: Retículo endoplasmático.

RGD: Secuencia arginina-glicina-aspartato.

ROC: Canal activado por receptor.

RTKs: Receptores tirosina cinasa.

RyR: Receptor de la rianodina.

SAM: Dominio alfa estéril.

SCA: Sistema canalicular abierto.

SCaMPER: Canal liberador de calcio mediado por esfingolípidos unidas a proteínas del retículo endoplasmático.

Ser/Thr: Serina/treonina.

SERCA: Bomba ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarco/endoplasmático.

SFK: Proteínas tirosina cinasas de la subfamilia Src.

SH: Dominio de unión a Src.

SMOC: Canales activados por segundos mensajeros.

SNAP: Proteína soluble que enlaza NSF.

SNARE: Proteína receptora de SNAP.

SOAR: Región de STIM1 activadora de Orai1.

SOC: Canal activado por el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} .

SOCE: Store-operated Ca^{2+} entry.

SPG: Síndrome de la plaqueta gris.

STD: Sistema tubular denso.

STIM1-MP: STIM1 de la membrana plasmática.

TBHQ: 2,5-di(ter-butil)-1,4,-hidroquinona.

TBS: Solución de lavado.

TBST: Solución de lavado con tween 20.

TG: Tapsigargina.

Thr: Trombina.

TPC: Canales de dos dominios de poro.

TPO: Trombopoyetina

TRP: Receptor de potencial transitorio.

TRPC1: Receptor de potencial transitorio C1.

TRPC3: Receptor de potencial transitorio C3.

TRPC6: Receptor de potencial transitorio C6.

TxA₂ : Tromboxano A₂ .

VASP: Fosfoproteína estimulada por vasodilatadores.

VOCs: Canal activado por voltaje.

Índice

1. Introducción	19
1.1. Morfología y estructura de las plaquetas	21
1.1.1. Zona periférica	23
1.1.2. Zona sol gel o citoplasma	27
1.1.2.1. Citoesqueleto	
1.1.3. Sistemas membranosos	29
1.1.3.1. Sistema canalicular abierto	
1.1.3.2. Sistema canalicular denso	
1.1.4. Zona de organelas	30
1.1.4.1. Gránulos alfa	
1.1.4.2. Gránulos densos	
1.1.4.3. Lisosomas	
1.2. Activación y función plaquetaria	36
1.2.1. Adhesión y activación	37
1.2.1.1. Proteínas adhesivas de la matriz extracelular subendotelial	
1.2.1.2. Activación plaquetaria inducida por adhesión al colágeno	
1.2.2. Amplificación y agregación	41
1.2.2.1. Agonistas plaquetarios solubles	
1.2.2.2. Activación de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$	
1.2.3. Estabilización del trombo	47
1.2.4. Regulación de la activación plaquetaria	48

1.2.5. Vías de señalización de la activación y agregación plaquetaria	49
1.3. Secreción plaquetaria	57
1.3.1. Mecanismo molecular de la fusión de membranas	58
1.3.1.1. Lípidos de membrana	
1.3.1.2. Proteínas SNARE	
1.3.1.3. Proteínas asociadas a SNARE	
1.3.2. Regulación de la secreción de los gránulos plaquetarios	63
1.3.2.1. Influencia del citoesqueleto	
1.3.2.2. Proteínas de unión al calcio	
1.3.2.3. Actividad cinasa	
1.3.2.4. Actividad proteasa	
1.3.3. Vías de señalización de la secreción plaquetaria	66
1.4. Homeostasis del Ca²⁺ en plaquetas humanas	67
1.4.1. Mecanismos que incrementan la [Ca ²⁺] _c	67
1.4.1.1. Liberación de Ca ²⁺ desde los depósitos intracelulares	
1.4.1.2. Entrada de Ca ²⁺ desde el medio extracelular	
1.4.1.3. Mecanismo de la entrada de Ca ²⁺	
1.4.2. Mecanismos que disminuyen la [Ca ²⁺] _c	78
1.4.3. Finalización de la señal de [Ca ²⁺] _c	79
1.4.4. Homeostasis del Ca ²⁺ en la función plaquetaria	80
2. Objetivos	85
3. Material y métodos	89
3.1. Reactivos	91

3.2. Preparación de las plaquetas	93
3.2.1. Selección de los individuos susceptibles de investigación	93
3.2.2. Preparación de la suspensión de plaquetas	93
3.3. Métodos de medición de la viabilidad celular	94
3.3.1. Tinción con Azul de Tripán	94
3.3.3. Calceína	94
3.4. Técnica para la determinación de la $[Ca^{2+}]_c$. Fluorimetría	95
3.4.1. Fura2/AM	95
3.4.2. Carga del indicador	95
3.4.3. Determinación de la $[Ca^{2+}]_c$ mediante métodos fluorimétricos	96
3.4.4. Determinación de la liberación y entrada de Ca^{2+}	96
3.4.5. Determinación de la entrada de manganeso (Mn^{2+})	97
3.4.6. Determinación de la movilización de Ca^{2+} intracelular. <i>Stopped flow</i>	97
3.5. Técnicas para el aislamiento y cuantificación de proteínas.	98
3.5.1. Obtención de lisados celulares	98
3.5.2. Tratamiento y fijación de las muestras mediante la técnica <i>Quench flow</i>	98
3.5.3. Inmunoprecipitación	99
3.5.3.1. Protocolo de inmunoprecipitación de STIM1 de la membrana plasmática	
3.5.4. Cuantificación de la concentración de proteínas	101
3.5.5. Western blotting	101
3.5.5.1. Electroforesis	
3.5.5.2. Transferencia	
3.5.5.3. Bloqueo	

3.5.5.4. Incubación con anticuerpos	
3.5.5.5. Revelado	
3.6. Técnica para la introducción de moléculas en las células. Electroporación Reversible	104
3.7. Determinación de la secreción por Citometría de flujo	104
3.8. Agregometría plaquetaria.	106
3.9. Análisis estadístico	106
3.10. Anexo	107
4. Resultados	111
4.1. La fosforilación de STIM1 en residuos de tirosina es requerida para la asociación entre STIM1 y Orai1 en plaquetas humanas.	113
4.2. Las proteínas Homer regulan la entrada de calcio y la agregación en plaquetas humanas: papel de las proteínas Homer en la asociación entre STIM1 y Orai1.	121
4.3. Relación entre la movilización de calcio extracelular e intracelular y la secreción de gránulos plaquetarios.	131
5. Discusión	143
6. Conclusiones	153
7. Bibliografía	157

1.Introducción

1.1. Morfología y estructura de las plaquetas

Las plaquetas son las células sanguíneas de los mamíferos especializadas en la función hemostática. Descritas a lo largo del siglo XIX por varios autores, fue Bizzozero, en una publicación de 1882, el primero en identificar correctamente su papel central en la hemostasia [1]. Desde entonces, y además de su contribución fundamental a la hemostasia y la trombosis, se ha ido reconociendo su participación en otros muchos procesos tanto fisiológicos como patológicos, entre los que destacan la inflamación, la respuesta inmune, la cicatrización de heridas, la angiogénesis y el crecimiento y diseminación metastásica de neoplasias [2].

Las plaquetas humanas son fragmentos celulares anucleados derivados del citoplasma de los megacariocitos en la médula ósea por un mecanismo no completamente dilucidado en la actualidad. Las plaquetas anucleadas, y presumiblemente sus progenitores, los megacariocitos poliploides, se encuentran sólo en mamíferos [3]. En las demás especies animales las células involucradas en la hemostasia son nucleadas. Las células nucleadas que participan primariamente en la hemostasia de vertebrados no mamíferos se denominan trombocitos para distinguirlas de las plaquetas sin núcleo [3].

Los megacariocitos son precursores mieloides altamente especializados cuya función primordial es producir y liberar plaquetas a la circulación sanguínea. Los megacariocitos proceden de células progenitoras hematopoyéticas multipotenciales, tras un proceso único de endomitosis en el que se suceden múltiples replicaciones del DNA sin división celular [4]. Una vez completada la endomitosis, los megacariocitos poliploides comienzan una fase de rápida expansión citoplasmática caracterizada por la formación de un elaborado sistema de membranas de demarcación, y la acumulación de proteínas en el citoplasma y en el interior de los gránulos, esenciales para la función plaquetaria [5]. Durante el estadio final de su desarrollo, el citoplasma megacariocítico sufre una profunda reorganización y acaba fragmentándose y liberando las plaquetas a la circulación [6]. La megacariocitopoyesis y la trombopoyesis están reguladas por factores de transcripción y citocinas entre las que destaca la trombopoyetina (TPO) [7].

Diariamente se liberan al torrente circulatorio entre 20 y 30 x 10⁹ plaquetas por litro de sangre que se distribuyen en dos compartimentos, uno circulante, que alberga 2/3 de las plaquetas producidas, y otro tisular, fundamentalmente esplénico, que contiene el tercio restante [8]. Su vida media es de 7 a 10 días antes de ser eliminadas de la circulación sanguínea por los macrófagos esplénicos y hepáticos, siempre

que no hayan tenido antes que ejercer su función hemostática, o bien se hayan visto involucradas en eventos trombóticos [9].

Las plaquetas son las células mas pequeñas de la circulación sanguínea, con un diámetro aproximado de entre 2.0 y 5.0 μm y un espesor de unos 0.5 μm , lo que supone un volumen celular medio de entre 6 y 10 femtolitros. Al microscopio óptico, en frotis sanguíneos confeccionados sin anticoagulante y teñidos con la coloración de May-Grümwald-Giemsa, las plaquetas aparecen como pequeños elementos redondeados de 2-3 μm de diámetro, de color rojizo y con un contenido granular [10]. Al microscopio electrónico de barrido, las plaquetas en reposo son elementos discoides biconvexos de forma elipsoide. Su superficie externa es lisa excepto por un número variable de pequeñas invaginaciones que representan la salida al exterior de un sistema de canales intraplaquetarios comunicados entre sí de manera similar a las cavidades de una esponja [11], y que se corresponden con las entradas del sistema canalicular abierto. Las plaquetas activadas, en cambio, pierden su forma de disco y adquieren una morfología esférica irregular con múltiples prolongaciones pseudopódicas, que favorecen la adhesión y agregación plaquetaria [12], **Fig.1**.

El análisis de la morfología ultraestructural de la plaqueta mediante el microscopio electrónico de transmisión, revela una compleja estructura interna que puede dividirse en cuatro zonas:

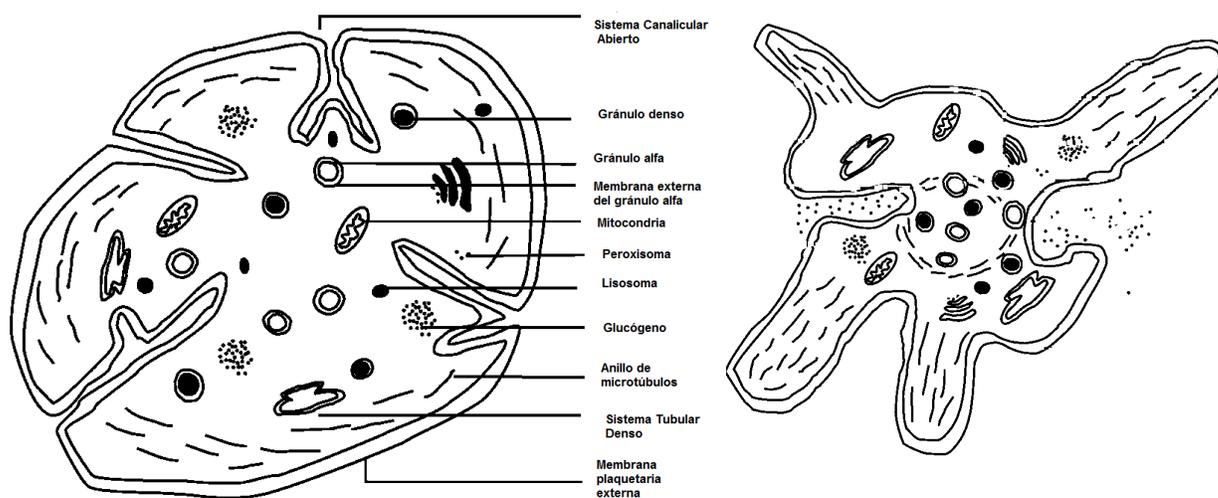


Figura 1. Morfología y estructura de la plaqueta en reposo y activada, donde se observa el cambio de forma, emisión de psudópodos, centralización de los gránulos y secreción plaquetaria.

- zona periférica
- zona sol-gel o citoplasma
- zona de sistema de membranas especializadas
- zona de organelas

1.1.1. Zona periférica

La zona periférica incluye las membranas exteriores y las estructuras estrechamente relacionadas con ella. La plaqueta tiene un sistema de canales conectados a la superficie llamado sistema canalicular abierto (SCA). Las paredes del SCA están incluidas en esta zona. El SCA ofrece acceso a las sustancias plasmáticas al interior de la plaqueta y un canal de salida para los productos plaquetarios y, además, constituye un reservorio de membrana plasmática para la expansión de las plaquetas sobre el endotelio dañado [13]. Por tanto la membrana constituye el límite de la plaqueta con el exterior, no solo en su superficie biconvexa principal sino también en la de los canales intraplaquetarios [14].

Clásicamente se distinguen tres capas: exterior o glicocálix (cubierta exterior rica en receptores glicoprotéicos), intermedia (típica unidad de membrana o bicapa fosfolipídica), e interna o área submembranosa (unida a las porciones transmembranosas de algunas glicoproteínas y rica en filamentos que forman parte del citoesqueleto) [15]. La membrana externa no funciona únicamente como barrera de separación del contenido interno plaquetario con el exterior, sino que se trata de una estructura dinámica que sirve como lugar de contacto inicial para detectar los cambios en el compartimento vascular que requieran una respuesta hemostática de las plaquetas sobre la lesión endotelial.

Considerada en su conjunto, la membrana plaquetaria está compuesta por fosfolípidos, que pueden participar en los mecanismos de transmisión de estímulos o proporcionar una superficie procoagulante sobre la que reaccionan las proteasas de la coagulación; por glicoproteínas (GP), que integran en su estructura química los principales antígenos plaquetarios de membrana y actúan como receptores de los agonistas fisiológicos de las plaquetas; por mucopolisacáridos, y por proteínas absorbidas del plasma requeridas para la función plaquetaria [2,16].

La amplia variedad de receptores transmembrana móviles que cubre la membrana plaquetaria incluye receptores que contienen la secuencia LRR (*leucine-rich repeat*) como el complejo GPIb/IX/V y los receptores Toll-*like*; proteínas pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Igs), como la GPVI y el FcγRIIA; receptores acoplados a proteína G (GPCR, *G-protein-coupled receptors*) como los receptores de la trombina, PAR-1 y PAR-4, los receptores del ADP, P2Y₁ y P2Y₁₂, o los receptores del tromboxano A₂ (TxA₂), TPα y TPβ; integrinas como α_{IIb}β₃, α₂β₁, α₅β₁, α₆β₁, α_vβ₃; el receptor P2X₁; receptores de lectina tipo C, como P-selectina o CLEC-2 (*C-type lectin receptor 2*); receptores tipo tirosina cinasa como el receptor TPO, y una miscelánea de otros tipos de receptores [17]. Los principales se describen a continuación.

- **Complejo glicoprotéico Ib/IX/V (GPIb/IX/V).** Este complejo glicoprotéico es el receptor más abundante en plaquetas humanas después de la integrina α_{IIb}β₃ [18]. Media en la adhesión de las plaquetas a la matriz subendotelial y muestra una actividad procoagulante al reclutar factores de la coagulación sobre la superficie de las plaquetas activadas. Está formado por 4 subunidades, GPIba (~135 kDa), GPIbβ (~25 kDa), GPIX (~22 kDa) y GPV (~82 kDa). Las cuatro poseen un motivo estructural, la secuencia LRR, con las leucinas altamente conservadas, fundamental para el correcto funcionamiento del complejo [19]. La GPIb/IX/V se une al factor von Willebrand (FVW) inmovilizado en el subendotelio expuesto, siendo esta unión crítica para iniciar el proceso de adhesión plaquetaria, lo que permite que se produzca posteriormente la adhesión firme de las plaquetas al colágeno, mediada por GPVI e integrinas. El complejo GPIb/IX/V se une también a la trombospondina, posee un dominio de unión de alta afinidad para la trombina, e interacciona con otros factores de la coagulación (factor XI, XII y cininógeno de alto peso molecular) [20]. La GPIba juega un importante papel en los procesos inflamatorios, mediando la interacción con células endoteliales activadas y leucocitos a través de la P-selectina y la integrina leucocitaria Mac-1, respectivamente [17]. La deficiencia o disfunción de esta GP ocasiona la diátesis hemorrágica hereditaria denominada síndrome de Bernard-Soulier.

- **Glicoproteína VI (GPVI).** (~62 kDa). La GPVI es un receptor miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas asociado de forma no covalente a ITAM (*immunoreceptor tyrosine activation motif*), que interviene en la activación plaquetaria desencadenando cascadas de señalización vía fosforilación tirosina cinasa [21]. Esta proteína es, junto con la integrina α₂β₁, el principal receptor para el colágeno en las plaquetas [22]. La GPVI es un receptor para el colágeno de baja afinidad, pero aunque no es capaz de proporcionar una adhesión estable por sí sola, desencadena los mecanismos de activación de integrinas que las conducen a un estado de alta afinidad por el colágeno, mediando en la adhesión estable y la activación plaquetaria inducida por colágeno. Tanto la integrina α₂β₁ como la GPVI son

necesarias para la completa activación de las plaquetas por este ligando, pero aún no se ha descrito el modelo definitivo que explique la naturaleza exacta de esta interacción. La inhibición de la GPVI inhibe la formación del trombo, mientras que el bloqueo de la integrina $\alpha_2\beta_1$ no tiene efectos significativos conocidos hasta el momento [23,2].

- **Receptores acoplados a proteína G.** Los GPCRs son una familia de receptores con 7 dominios transmembrana que transmiten la señal a través de proteínas G heterotriméricas. Las proteínas G heterotriméricas constan de 3 subunidades (α , β , γ) que se unen a GPCRs en forma de complejos $\alpha/\beta/\gamma$. Cuando la subunidad α está unida a GDP, la proteína G está inactiva. Al unirse el agonista al receptor, la subunidad α sufre un cambio conformacional y reemplaza el GDP por GTP, activándose. Las subunidades activas G_α se disocian del receptor y del complejo β/γ , e interactúan con dianas específicas que transmiten la señal GPCR [24]. En función de la similitud de las subunidades α , las proteínas G pueden dividirse en 4 subfamilias: G_q/G_{11} , G_{12}/G_{13} , $G_i/G_o/G_z$, y G_s , cada una de las cuales se acoplan a receptores específicos y transmiten la señal mediante efectores determinados [24].

Las plaquetas expresan G_q , G_{12}/G_{13} , G_i/G_z y G_s . Las proteínas G en plaquetas están acopladas a receptores de agonistas de la activación plaquetaria, con la excepción de G_s , que se acopla a receptores de inhibidores fisiológicos de la activación plaquetaria, como prostaglandina I_2 (PGI_2), que interviene en los mecanismos de inhibición a través de la estimulación de la síntesis de adenosina monofosfato cíclica (AMPc). La trombina actúa a través de un sistema dual de receptores acoplados a proteína G activados por proteasas denominados PARs (*protease-activated receptors*), PAR-1 y PAR-4 en humanos [25] y PAR-3 y PAR-4 en ratones [26]. PAR-1 y PAR-4 se acoplan directamente a G_q y G_{12}/G_{13} [26] y posiblemente a G_i [27,28]. El TxA_2 activa a las plaquetas a través del receptor H_2 para TxA_2/PG , que se acopla a G_q y G_{13} [29,30]. La serotonina (5-hidroxitriptamina, 5HT) reconoce al receptor 5HT_{2A} acoplado a G_q [24]. El ADP induce activación plaquetaria vía receptores P2Y₁ (acoplados a G_q) y P2Y₁₂ (acoplados a G_i) [24,30]. El receptor de epinefrina (α_2) en plaquetas está acoplado a G_i [31].

- **Receptores integrinas.** Los receptores de adhesión integrinas son una familia de proteínas heterodiméricas transmembrana formadas por una cadena α y una cadena β . Las plaquetas expresan varias integrinas en su membranas, $\alpha_{IIb}\beta_3$ (receptor del fibrinógeno), $\alpha_v\beta_3$ (receptor de la vitronectina), $\alpha_2\beta_1$ (receptor del colágeno), $\alpha_5\beta_1$ (receptor de la fibronectina), y $\alpha_6\beta_1$ (receptor de la laminina) [17]. Estas integrinas muestran mecanismos similares de transducción de la señal: tras la activación plaquetaria, mediada por diferentes cascadas de señalización, las integrinas cambian su estado de "baja afinidad"

por un estado de "alta afinidad". Este proceso se realiza a través de vías de señalización que se denominan "*inside-out*" (porque van desde dentro de la plaqueta hacia afuera, a las integrinas de la membrana) y capacita a las integrinas para unirse eficientemente a sus ligandos. Esta unión a su vez desencadena procesos como la expansión (*spreading*) de las plaquetas sobre el subendotelio expuesto en la zona vascular lesionada, o la retracción del coágulo, mediante cascadas de señalización denominadas "*outside-in*" (desde la integrina a la plaqueta) [17]. La integrina plaquetaria más importante y mejor conocida es la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$.

- **Integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$.** Clásicamente se la ha denominado glicoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa). Es específica de plaquetas y megacariocitos, y es el receptor más abundante en la membrana plaquetaria. Su papel es fundamental en la hemostasia, sirviendo como receptor para el fibrinógeno y el FvW. Cuando la plaqueta está en reposo, esta integrina tiene poca afinidad por sus ligandos; sin embargo, en la plaqueta activada, la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ establece una interacción estable entre el FvW y la matriz extracelular subendotelial, que le permite unir fibrinógeno y agregar con otras plaquetas [32]. Estructuralmente está formada por dos cadenas, α_{IIb} y β_3 , cada una con un dominio extracelular muy largo, formando una región globular que contiene los sitios de unión con los ligandos [33], seguido de un solo dominio transmembrana y una corta sección citoplasmática [34]. Los defectos cuantitativos o cualitativos de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ conducen a un defecto mayor de la función hemostática de las plaquetas y a un trastorno hemorrágico grave, la tromboastenia de Glanzmann [35]. La deficiencia de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ también proporciona protección frente a la trombosis arterial, por lo que el antagonismo farmacológico de esta integrina representa una estrategia antitrombótica muy efectiva [36,37].

• **Receptor P2X₁.** Es un miembro de la familia de los receptores purinérgicos no acoplados a proteínas G, y la única isoforma de la familia P2X que se expresa en plaquetas y megacariocitos [38,39]. Son canales activados por adenosina 5'-trifosfato (ATP) que permiten la entrada de Ca^{2+} y sodio (Na^+) [40]. Además, la activación de este receptor provoca un cambio de forma rápida y reversible, la centralización de los gránulos secretores, y se han observado algunos procesos propios del inicio de la agregación, como la exposición de los sitios de unión al colágeno de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. Existen numerosos estudios que muestran que el receptor P2X₁ interacciona con las rutas metabólicas de otros receptores, como los receptores P2Y, los receptores del colágeno, la adrenalina y la TPO [41,42]. Un ejemplo de esto es la potenciación sobre el efecto de los receptores P2Y en la movilización del Ca^{2+} , mostrándose un incremento mayor, tanto en la velocidad de respuesta como en la liberación de Ca^{2+} , al activarse ambos receptores, P2Y y P2X₁, de manera simultánea, que cuando se activa solamente P2Y.

La explicación puede deberse a una potenciación de la fosfolipasa C (PLC) o de los receptores de inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃), por la entrada rápida de Ca²⁺ que se produce tras la activación del P2X₁, precediendo a los eventos de la vía de los GPCRs [40,42].

- **P-selectina**. (CD62P, ~140 kd). Es la mayor de las moléculas de adhesión de la familia selectina. Se encuentra principalmente en la membrana de los gránulos α de las plaquetas, pero también se ha descrito en los gránulos densos [43]; además, está presente en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales. En las plaquetas en reposo, una pequeña cantidad de P-selectina es evidente en la membrana externa. Sin embargo, en las plaquetas activadas (y de forma similar, en las células endoteliales), la fusión de la membrana de los gránulos con la superficie de la plaqueta da lugar a una rápida expresión de P-selectina sobre la superficie externa. La cinética de esta respuesta varía según el tipo y la dosis del agonista empleado, pero la máxima expresión de superficie de la P-selectina se ha descrito en un rango entre ~30 segundos y 10 minutos tras la estimulación [44,45]. La expresión de superficie de P-selectina se usa habitualmente como marcador de activación plaquetaria [46]. Los ligandos para la P-selectina incluyen el PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*), que se expresa primariamente en leucocitos [47], el FVW [48] y la GPIIb [49]. La P-selectina plaquetaria contribuye a la hemostasia, así como a las interacciones entre plaquetas, leucocitos y células endoteliales en la inflamación [50]. Además, una forma soluble de P-selectina presente en plasma, podría contribuir a la trombosis [51].

1.1.2. Zona sol-gel o citoplasma

La membrana plasmática de las plaquetas está separada del espacio intracelular por un fino anillo de citoplasma periférico que aparece claramente delimitado al observarse al microscopio electrónico, y que contiene el citoesqueleto de las plaquetas y, debajo del mismo, diversos elementos químicos dispersos, algunos macromoleculares, como las inclusiones de glucógeno y las gotas lipídicas, y otros solubles, como el *pool* metabólico de nucleótidos plaquetarios, calcio (Ca²⁺), y varios componentes químicos que participan en la activación [52].

1.1.2.1. Citoesqueleto

La forma discoidal de las plaquetas en reposo es sostenida por un citoesqueleto muy especializado que permite mantener su forma e integridad en el torrente sanguíneo. Además, este citoesqueleto facilita que la respuesta de las plaquetas a la lesión vascular sea muy rápida, al posibilitar la alteración del gel

contráctil y la remodelación de actina, tanto en el primer cambio de forma que se produce en la plaqueta tras su activación, como para la emisión de pseudópodos. El citoesqueleto está formado por tres componentes principales, el anillo marginal de microtúbulos, el citoesqueleto de actina y el esqueleto de membrana de espectrina.

- **Anillo marginal de microtúbulos.** Formado por tubulina α y β en un equilibrio dinámico entre monómeros y polímeros, este anillo es una de las características más visibles de las plaquetas en reposo cuando se estudian al microscopio. Descrito por primera vez por White, está formado por un sólo microtúbulo de 100 μm de longitud que se enrolla entre 8 y 12 veces en la periferia de la plaqueta formando un entramado que soporta la estructura celular [53]. Su papel principal es el mantenimiento de la forma discoidal de la plaqueta, y la desorganización de los microtúbulos provoca la pérdida de la forma de disco [54]. Además juega un doble papel en la entrada capacitativa de Ca^{2+} (ECC), actuando por un lado como barrera para prevenir la ECC constitutiva regulada por el STD, y apoyando por otro la ECC mediada por los depósitos acídicos de Ca^{2+} [55].

- **Citoesqueleto de actina.** La actina es la proteína más abundante en las plaquetas y, al igual que la tubulina, mantiene un equilibrio dinámico entre monómeros y polímeros. En las plaquetas en reposo, el 40-50% de la actina se encuentra en forma filamentosa o F-actina [56], y el 50-60% de actina restante se mantiene almacenado formando un complejo con β -4-timosina, la G-actina globular monomérica. La G-actina se convierte en F-actina tras la activación de la plaqueta, permitiendo el cambio de forma de la célula [57]. Cuando las plaquetas están en reposo, los filamentos de actina están interconectados en distintos puntos con una red citoplasmática rígida o gel contráctil, y presentan sitios de unión con proteínas de soporte, como la filamina y la α -actinina, que facilitan la unión de estos filamentos con otras proteínas [58,59]. La interacción entre los filamentos de actina y la región citoplasmática de la subunidad GPIIb del complejo GPIIb/IX/V, mediada por la filamina, es esencial para la organización estructural de las plaquetas en reposo, ya que no sólo habilitan una vía de comunicación entre el citoplasma y los receptores de membrana, y disponen el complejo GPIIb/IX/V en línea con la superficie de la célula, sino que, además, comprimen y estabilizan el gel contráctil en el citoplasma impidiendo su dispersión [60].

- **Gel contráctil o esqueleto de membrana de espectrina.** El gel contráctil envuelve la superficie citoplasmática del SCA y de las organelas que se desplazan hacia el centro como consecuencia de la activación plaquetaria. Está formado por largas moléculas de espectrina, aducina y filamentos de

actina. La espectrina interacciona con filamentos de actina, generando una ultraestructura de poros triangulares [61]. En plaquetas en reposo, la actina interacciona también con la proteína aducina, formando complejos actina-aducina-espectrina [62].

1.1.3. Sistemas membranosos

La zona de sistema de membranas especializadas incluye el sistema canalicular abierto (SCA) y el sistema tubular denso (STD). Es aquí donde se concentra la mayor parte del Ca^{2+} , y esta zona también incluye los sistemas enzimáticos para la síntesis de prostaglandinas (PG).

1.1.3.1. Sistema canalicular abierto

El SCA, generado por invaginación de la membrana plaquetaria es, en realidad, una ampliación de la misma, y como tal, posee su misma estructura en tres capas -glicocálix, unidad de membrana y región submembranosa- y en la plaqueta en reposo, no muestra contenido alguno [14,63]. El SCA es el sistema membranoso más abundante en la plaqueta y comprende un conjunto complejo de canales ramificados interconectados a la membrana, con dos funciones principales. En primer lugar, cuando las plaquetas se activan, el SCA se evagina aumentando la superficie secretora, convirtiéndose el SCA en una vía a través de la que se secretarán los mediadores plaquetarios [64]. En segundo lugar, el SCA sirve 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 las plaquetas son activadas [2] e incluso el transporte de GP desde el SCA hacia los gránulos α [65].

1.1.3.2. Sistema tubular denso

Las plaquetas contienen un segundo sistema canalicular, derivado del retículo endoplasmático liso (RE) de los megacariocitos, conocido como sistema tubular denso (STD). El STD almacena Ca^{2+} y diferentes enzimas involucradas en la activación plaquetaria; en contraste con el SCA, el STD no se asocia con la membrana externa [66,67]. El STD interviene en el almacenamiento de Ca^{2+} de modo similar al RE de otras células [68]. El STD posee bombas de Ca^{2+} que se encargan de introducirlo en su interior, y junto con otros mecanismos en la membrana, de mantener las concentraciones de Ca^{2+} citosólico, ($[\text{Ca}^{2+}]_c$), en el rango nanomolar propio de las plaquetas en reposo. Cuando la célula es activada por agonistas, se pone en marcha una cascada de señales que desemboca en la síntesis de IP_3 , que provocará la

liberación de Ca^{2+} del STD [68]. Además, el STD es el lugar principal de síntesis de TxA_2 y PG, debido a que en él se localiza la enzima ciclooxygenasa (COX) [69,70].

1.1.4. Zona de organelas

La zona de organelas está formada por diferentes estructuras celulares que intervienen en los procesos metabólicos de la plaqueta y almacenan enzimas y otra gran variedad de sustancias críticas para la función plaquetaria. Las plaquetas contienen un pequeño número de mitocondrias que las proveen de energía mientras circulan por el torrente sanguíneo, un número muy escaso de ribosomas y, raramente, retículo endoplasmático rugoso o vesículas del aparato de Golgi [14]. Pero las estructuras más características de la zona de organelas plaquetarias son los gránulos de secreción, que comprenden, además de los peroxisomas - pequeñas organelas que contienen la enzima catalasa encargada de la degradación del H_2O_2 [71] - tres tipos de gránulos mayores de secreción, que se definen por su contenido molecular, cinética de exocitosis y morfología [72]. Son los gránulos alfa, gránulos densos y lisosomas.

1.1.4.1. Gránulos alfa

Los gránulos alfa (α) son los gránulos plaquetarios de mayor tamaño (~200–400 nm), más abundantes, y con un contenido más heterogéneo [73]. El desarrollo de los gránulos α comienza en el megacariocito, pero continúa en las plaquetas circulantes. Se originan en el aparato de Golgi trans [74] y adquieren su contenido molecular en los megacariocitos, antes de su fragmentación, por dos vías. La primera tiene lugar a través de la síntesis endógena de proteínas, como el factor plaquetario 4 (PF4), tromboglobulina y el FVW, y se produce en las cercanías del aparato de Golgi. La segunda vía se produce por endocitosis y pinocitosis, mediada por receptores de proteínas como el fibrinógeno, y este proceso se realiza en las regiones periféricas de los megacariocitos [75]. Esta segunda vía continúa en las plaquetas circulantes.

Hay alrededor de 50–60 gránulos por plaqueta, que son los responsables de la apariencia granular de las plaquetas en los frotis de sangre periférica. Las características morfológicas observadas por microscopía electrónica han definido históricamente a estos gránulos e incluyen: 1) una membrana periférica 2) un nucleoide electrondenso que contiene quimiocinas y proteoglicanos, 3) una zona menos electrondensa adyacente al nucleoide que contiene fibrinógeno y 4) una zona periférica electroluminiscente que contiene FVW [73,76].

Estos gránulos contienen la mayor parte de los factores plaquetarios que participan en la hemostasia, que incluyen grandes polipéptidos como trombospondina, P-selectina, FP4 y β -tromboglobulinas, así como factores de la coagulación (Factores V, XI, XIII, fibrinógeno, FVW y cininógeno de alto peso molecular). Además, los gránulos α contienen una gran variedad de moléculas de adhesión involucradas en la interacción de las plaquetas con la pared vascular, como fibronectina y vitronectina.

La membrana de los gránulos α contiene varias proteínas que se expresan también en la membrana externa plaquetaria como la GPIIb α , la GPVI, la integrina $\alpha_2\beta_1$, y P-selectina. Los gránulos α contienen también proteínas que participan en la inflamación, reparación de heridas, factores de crecimiento, como el Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, *Platelet-derived growth factor*), y un amplio espectro de citocinas. Un reciente análisis proteómico de los gránulos α ha revelado la presencia de más de 300 tipos de proteínas, de las cuales 44 no habían sido descritas con anterioridad en estos gránulos (Tabla 1) [77]. Se ha demostrado que la composición de la carga protéica de los gránulos α no es homogénea, lo que sugiere la existencia de subpoblaciones específicas de estos gránulos, que podrían ser liberadas selectivamente en respuesta a diferentes agonistas [78,79]. El conocimiento de los mecanismos que conducen a la secreción específica de una u otra subpoblación de gránulos α , y el amplio rango de efectos inducidos por la secreción de sus numerosos componentes, constituye un área de investigación muy activa en la actualidad.

La secreción de los gránulos α durante la activación plaquetaria es un proceso complejo que comprende su confluencia en el centro de la plaqueta, la fusión de las membranas de los gránulos entre sí y con el SCA, así como con la membrana plasmática externa [63,73,80,81]. Las plaquetas contienen una compleja maquinaria para la secreción de sus gránulos que incluye proteínas SNARE (*soluble NSF [N-ethylmaleimide-sensitive factor] attachment protein receptors*), proteínas asociadas y lípidos de membrana [63,82]. Algunos constituyentes de los gránulos α , como P-selectina, realizan su principal papel fisiológico después de incorporarse a la superficie externa de la plaqueta [83]. Otros constituyentes de los gránulos cumplen una función primordial tras su secreción de los gránulos, participando en la agregación plaquetaria, la trombosis, las interacciones adhesivas de las plaquetas con leucocitos y otros substratos, y la regulación de la proliferación celular a través de la liberación de varios factores.

La deficiencia de los gránulos α de las plaquetas se produce en una rara enfermedad hereditaria, el Síndrome de la Plaqueta Gris (SPG), que conlleva disfunción plaquetaria cuantitativa y cualitativa, y

predisposición al sangrado [84]. En el SPG, las proteínas procedentes de la síntesis protéica en los megacariocitos o adquiridas por endocitosis en megacariocitos y plaquetas, no se incorporan con normalidad a los gránulos α de las plaquetas debido a la formación anormal de estos gránulos durante la diferenciación megacariocítica. Esto resulta en la liberación sostenida en el interior de la médula ósea del contenido de los gránulos α , como factores de crecimiento o diversas citocinas, originando fibrosis medular. Morfológicamente, las plaquetas aparecen de color gris en los frotis de sangre periférica.

Tabla 1. Principal contenido de los gránulos alfa

Membrana	Matriz
Proteínas de unión a GTP GMP33, rab-4, Rap1	Glicoproteínas adhesivas FVW, fibronectina, vitronectina, trombospondina
Receptores y antígenos P-selectina (CD62), PECAM , GPIIb α , GPIV, Integrinas α IIb β 3, α v β 3 , Osteonectina	Factores y cofactores de la coagulación Fibrinógeno, Factores V, VIII, XI, XII, Cinínógeno de alto peso molecular, proteína S Plasminógeno
	Proteoglicanos PF4 (CXCL4), β TG, serglicina, NAP-2
	Mitógenos celulares PDGF, TGF β , ECGF, EGF, VEGF, IGF, Interleucina β
	Inhibidores de proteasas PAI1, TFPI, α 2-antiplasmina α 2-macroglobulina, α 2-antitripsina,
	Miscelánea Albúmina, inmunoglobulinas IgG, IgA, IgM, Complemento

PECAM (*Platelet endothelial cell adhesion molecule*); β TG, proteínas de la familia de la β -Tromboglobulina; NAP-2 (*Neutrophil-activating peptide*); TGF β (*Transforming growth factor- β*) ECGF (*Endothelial cell growth factor*); EGF (*Epidermal-derived growth factor*); VEGF (*Vascular endothelial growth factor*); IGF (*Insuline-like growth factor I*); PAI1, Inhibidor del Activador del Plasminogeno tipo 1; TFPI, Inhibidor de la vía del Factor Tisular.

1.1.4.2. Gránulos densos

Los gránulos densos, también denominados gránulos δ , son los gránulos plaquetarios de menor tamaño (~150 nm) y aparecen como cuerpos densos por microscopía electrónica debido a su alto contenido en Ca^{2+} y fosfato [85]. Hay alrededor de 3 a 8 gránulos densos por plaqueta. Son orgánulos ácidos como

los lisosomas, pero, a diferencia de ellos, contienen concentraciones extremadamente altas de componentes no protéicos, como Ca^{2+} a concentraciones muy elevadas (~2 mM) [86], serotonina, ADP, catecolaminas pirofosfato y polifosfato, que parece existir como complejo insoluble en el interior de la plaqueta [87]. Además contienen pequeñas proteínas de unión a GTP y relevantes moléculas de adhesión, presentes inicialmente en otros compartimentos plaquetarios, como GPIIb, integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, y P-selectina (Tabla 2).

Durante la activación plaquetaria, las proteínas de membrana de los gránulos densos se incorporan a la membrana plasmática externa, y el contenido de estos gránulos se libera al ambiente extracelular: la serotonina produce vasoconstricción, el ADP activa y recluta plaquetas cercanas, y más recientemente, se ha descrito al polifosfato derivado de plaquetas como un potente modulador de la coagulación sanguínea y la fibrinólisis [88]. El contenido en ADP de los gránulos densos está involucrado primordialmente en la hemostasia y no guarda relación con el *pool* metabólico de ADP, por lo que se denomina *pool* de almacenamiento. La liberación de los gránulos densos comprende mecanismos comparables a aquellos identificados para los gránulos α , aunque parece que el papel de ciertas proteínas SNARE es diferente en ambas poblaciones de gránulos [89].

Tabla 2. Principal contenido de los gránulos densos

Membrana	Matriz
Proteínas de unión a GTP: Ral-I	ATP, ADP, GTP, GDP
GPIIb, integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$	TFPI, Factor XIII, Cininógeno de alto peso molecular
LIMP1 (CD63), LAMP2	Serotonina, Histamina, Epinefrina
SRC	CCL 3,5,7 y 17, CXCL 1,4,5,7 y 8
P-selectina (CD62)	Calcio, Magnesio, Pirofosfato, Polifosfato

LIMP1 (*Lysosomal integral membrane protein 1*); LAMP2 (*Lysosomal associated membrane protein 2*); CCL (*C-C motif ligand*); CXCL (*C-X-C motif ligand*).

La importancia de los gránulos densos en la hemostasia normal se demuestra por la diátesis hemorrágica observada en pacientes con deficiencia de estos gránulos. La deficiencia aislada de

gránulos densos se ha identificado en dos raras enfermedades humanas asociadas con predisposición al sangrado, el síndrome de Hermansky-Pudlak (HPS), que cursa con albinismo oculocutáneo y afectación pulmonar y digestiva, y el síndrome de Chediak-Higashi, que se asocia a deficiencias de la inmunidad celular [90].

Por último, dada su naturaleza acídica y su rico contenido en Ca^{2+} , pirofosfato y polifosfato, recientemente se ha postulado la teoría de que los gránulos densos podrían formar parte de los denominados reservorios de Ca^{2+} acídicos, o ácidocalcisosomas, en plaquetas humanas [91], un pool de orgánulos plaquetarios pertenecientes al grupo de organelas relacionado con lisosomas, que podrían participar en el depósito de cationes y fósforo, la homeostasis del Ca^{2+} o la osmoregulación, entre otras posibles funciones [92].

1.1.4.3. Lisosomas

Los lisosomas representan la tercera categoría de gránulos plaquetarios, con un tamaño intermedio entre los gránulos α y densos (~200–250 nm); contienen un pH ácido intraluminal con enzimas hidrolíticas activas sobre un número importante de sustratos, como los componentes de la matriz extracelular [64,93]. Debido a su similar electrodensidad, los lisosomas no pueden distinguirse de los gránulos α en las imágenes habituales de microscopía electrónica, pero sí se identifican mediante citoquímica con tinciones específicas para enzimas lisosomales, como fosfatasa ácida o aril-sulfatasa [94].

El contenido de los lisosomas plaquetarios (Tabla 3) puede liberarse después de la activación, aunque para su secreción requieren una mayor estimulación de la que se precisa para la secreción de los gránulos α y densos. La liberación del contenido de los lisosomas implica mecanismos análogos a aquellos involucrados en la secreción de los demás gránulos plaquetarios [95,96], pero el papel funcional de los lisosomas plaquetarios es menos conocido que el de los gránulos α y densos. Se cree que la secreción lisosomal contribuye a la regulación de la formación del trombo y la remodelación de la matriz extracelular [64,93]. Como ocurre con los gránulos α y densos, la secreción lisosomal contribuye a la incorporación de proteínas lisosomales a la membrana externa plaquetaria; por ejemplo, la expresión en la superficie de la plaqueta de la proteína lisosomal LIMP-1 o CD63, se utiliza como marcador de activación plaquetaria significativa o "fuerte".

Tabla 3. Principal contenido de los lisosomas

Membrana	Matriz
LIMP1 (CD63)	Proteasas ácidas Catepsinas D y E, Carboxipeptidasas A y B Prolinecarboxipeptidasa, Colagenasa Fosfatasa ácida, Arilsulfatasa
LAMP1, LAMP2	Glicohidrolasas Heparinasa, β -N-acetil-glucosaminidasa β -glucuronidasa, β -galactosidasa, β -glicerofosfatasa, α -D-manosidasa α -D-glucosidasa, β -D-glucosidasa, β -D-fucosidas α -L-fucosidasa, α -L-arabinosidasa

LAMP1 (*Lysosomal associated membrane protein 1*).

Todas las estructuras biológicas presentes en las plaquetas se encuentran en otras células, pero los receptores de membrana junto con los gránulos específicos determinan la identidad celular específica de las plaquetas [3]. Esto se debe a que al carecer de núcleo y, por tanto, de ADN genómico, su capacidad de adaptación a las diferentes situaciones mediante la síntesis proteica *de novo* es muy limitada y dependiente de su escaso contenido en ARN mensajero (ARNm) derivado de los megacariocitos. Por tanto, por una parte las plaquetas necesitan estar equipadas con un amplio repertorio de moléculas presintetizadas preparadas para ser secretadas en una gran variedad de situaciones fisiológicas o eventos patológicos, y, por otra parte, la manera fundamental en que las plaquetas pueden alterar su fenotipo para adaptarse a las diferentes situaciones, es a través de múltiples receptores presentes en la membrana de sus gránulos de almacenamiento, que se expresan sobre la superficie plaquetaria después de la activación [3]. Como la principal función de las plaquetas es la hemostasia, tanto la mayoría de las moléculas contenidas en los gránulos como la mayoría de los receptores de la superficie plaquetaria tienen un papel directo en este proceso.

1.2. Activación y función plaquetaria

La función fisiológica fundamental de las plaquetas es prevenir la pérdida de sangre y mantener la integridad vascular mediante la formación del tapón hemostático. Las principales características de las plaquetas, incluida su forma, el contenido de sus gránulos, la alta densidad de sus receptores de adhesión, o su capacidad para promover la generación de trombina, son consecuencia de la necesidad de formar un tapón hemostático estable bajo condiciones circulatorias de alto flujo y alta presión [98]. Las plaquetas circulantes deben ser capaces de mantener contactos repetidos con la pared vascular normal [99] sin que se produzca su activación, reconocer la lesión vascular cuando se produce, adhiriéndose al subendotelio expuesto a pesar de la fuerza del flujo sanguíneo continuo, y tras su activación, formar un tapón hemostático estable y del tamaño adecuado, capaz de permanecer en el lugar de la lesión mientras sea necesario.

La contribución de las plaquetas a la hemostasia es diferente en arterias y venas. En el sistema venoso, el bajo coeficiente de cizalladura y la estasis, permiten la acumulación de factores de la coagulación activados, y la generación local de gran cantidad de trombina, con una contribución menor de las plaquetas. El trombo venoso contiene plaquetas, pero el componente celular dominante son los eritrocitos atrapados en la red de fibrina. En la circulación arterial, el alto coeficiente de cizalladura limita la formación de fibrina, por aclaramiento de los factores de la coagulación. Las plaquetas ayudan a formar una barrera física frente a la pérdida de sangre, y al mismo tiempo, proporcionan una superficie para la generación de trombina. La formación de trombos patológicos en el sistema arterial se produce en aquellas situaciones que alteran los mecanismos destinados a prevenir la activación plaquetaria no deseada, produciéndose una acumulación local de plaquetas donde no se necesitan [100].

La serie coordinada de eventos que conduce a la activación plaquetaria y la formación del tapón hemostático se divide clásicamente en tres fases [98], **Fig.2**.

- Fase de iniciación, en la que las plaquetas, tras entrar en contacto con el subendotelio expuesto, forman una monocapa sobre la lesión y son activadas. Comprende los procesos de adhesión plaquetaria y activación inducida por adhesión al colágeno.
- Fase de extensión, en la que se reclutan y activan nuevas plaquetas debido a la liberación local de agonistas plaquetarios. Comprende los procesos de amplificación de la activación, mediados por agonistas solubles, y la agregación plaquetaria.

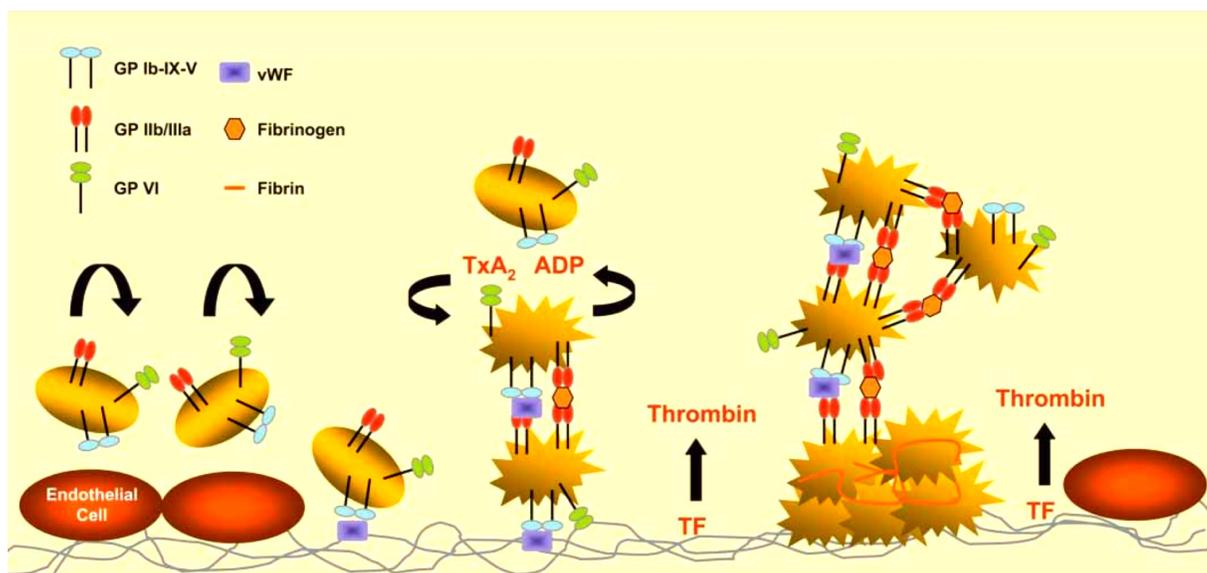


Figura 2. Formación del tapón hemostático: captura y adhesión inicial, activación, adhesión firme, amplificación de la activación y agregación. Fuente: ref .212.

- Fase de estabilización, en la que se previene la desagregación prematura del tapón hemostático y se produce la reparación del tejido lesionado. Comprende los eventos finales de la formación del tapón hemostático, activación de la coagulación y formación de fibrina, y los mecanismos de amplificación de señal intrplaquetarios (autocrinos), o a través de receptores cuyos ligandos están localizados sobre la superficie de plaquetas adyacentes (paracrinos)

El resultado final es un tapón hemostático formado por plaquetas activadas embebidas dentro de una malla de fibrina, capaz de formar una estructura lo bastante estable como para soportar las fuerzas de cizalladura generadas por el flujo sanguíneo en la circulación arterial. En este proceso, las plaquetas no solo proporcionan una superficie protrombótica que permite la acción de las proteasas de la coagulación, sino también una superficie que puede facilitar la emigración leucocitaria al interior de los tejidos circundantes, y una fuente de mediadores de la inflamación, o de moléculas que favorecen la reparación de tejidos [98].

1.2.1. Adhesión y activación

Bajo condiciones fisiológicas las plaquetas circulan muy próximas a la pared vascular, sin interactuar con las células endoteliales, que presentan una natural resistencia a la trombosis. Cuando se produce una ruptura de la continuidad del endotelio, las proteínas de la matriz extracelular subendotelial,

como colágeno, FVW, fibronectina o laminina, quedan expuestas e interaccionan de manera inmediata con los receptores específicos de la superficie plaquetaria. La función de adhesión del FVW subendotelial es dependiente de la interacción de su dominio A1 con la GPIIb, uno de los componentes del complejo GPIIb/IIIa de la membrana plaquetaria [101]. Pero la unión entre GPIIb y FVW se disocia rápidamente y es incapaz de soportar una adhesión estable, por lo que las plaquetas requieren la contribución de otras interacciones entre ligando y receptor para obtener una adhesión firme [102]. La unión de las plaquetas al colágeno está mediada por la GPVI [103,104] y la integrina $\alpha_2\beta_1$ [105], mientras que la fibronectina y la laminina se unen a las integrinas $\alpha_5\beta_1$ y $\alpha_6\beta_1$, respectivamente [106].

1.2.1.1. Proteínas adhesivas de la matriz extracelular subendotelial

Las condiciones reológicas del flujo influyen de forma importante en la adhesión, fundamentalmente el coeficiente de cizalladura del flujo sanguíneo [107], que mide el gradiente de la velocidad de flujo en relación con la distancia a la pared vascular, y es función directa de la velocidad del flujo sanguíneo y función inversa del diámetro transversal del vaso, expresándose en unidades de segundos inversos (s^{-1}). Estudios *ex vivo* en humanos han demostrado que la unión entre GPIIb y FVW es la principal interacción para iniciar la adhesión plaquetaria en condiciones de flujo con alto coeficiente de cizalladura ($> 1000 s^{-1}$) [107], como ocurre en la microcirculación arterial o en las arteriolas [108]. Estudios análogos en modelos murinos han revelado una dependencia del coeficiente de cizalladura comparable en la adhesión mediada por GPIIb-FVW, que se produce en condiciones de alto ratio de cizalladura [109]. En presencia de una significativa reducción de la luz vascular por trombosis vascular, arteriosclerosis o vasoconstricción, el coeficiente de cizalladura del flujo sanguíneo puede incrementarse sustancialmente, y la interacción GPIIb-FVW convertirse en predominante [110,111]; en cambio, en situaciones con bajo coeficiente de cizalladura, como ocurre en las venas o en las grandes arterias, las plaquetas se adhieren fundamentalmente al colágeno, la fibronectina y la laminina.

• **Factor von Willebrand.** El FVW es una proteína multimérica sintetizada por las células endoteliales y los megacariocitos; se almacena en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales, en los gránulos α de las plaquetas, y en forma soluble se encuentra en el plasma, así como en la matriz extracelular subendotelial [112]. El FVW inmovilizado en el subendotelio es suficiente para iniciar la adhesión plaquetaria bajo condiciones de flujo, aunque la cinética de esas interacciones varía según las condiciones hidrodinámicas. El papel preferencial del FVW en su interacción con las plaquetas en situaciones de flujo de alta velocidad, se debe en parte a que el alto flujo facilita cambios conformacionales en la estructura globular del FVW, que aumentan su capacidad de unión al receptor

[113]. Además de su papel en la mediación de la interacción entre plaqueta y pared vascular, el FVW también funciona como molécula portadora del factor VIII de la coagulación. La relevancia del FVW en la hemostasia se pone de manifiesto en la Enfermedad de von Willebrand, una diátesis hemorrágica hereditaria caracterizada por diferentes defectos relacionados con el FVW [114]. De manera similar, en ratones con deficiencia de FVW genéticamente inducida, se demuestra una disminución de la interacción entre plaquetas y endotelio tras la lesión vascular [115, 116].

• **Colágeno.** Las células endoteliales proporcionan una barrera que evita la interacción de las plaquetas circulantes con los diferentes tipos de colágeno presentes en la matriz extracelular subendotelial [117]. Cuando esta barrera se rompe, los receptores plaquetarios GPVI e integrina $\alpha_2\beta_1$ median en la unión al colágeno subendotelial, aunque estas interacciones requieren la captura previa de las plaquetas mediante la unión entre GPIIb α y FVW. Tanto la GPVI como la integrina $\alpha_2\beta_1$ intervienen en la activación plaquetaria inducida por colágeno bajo condiciones de flujo, si bien la secuencia precisa de tales interacciones no es completamente conocida. Algunos estudios en plaquetas humanas *ex vivo* sugieren que la unión inicial del complejo GPIIb α al FVW induce un cambio conformacional de la subunidad α de la integrina $\alpha_2\beta_1$, aumentando su afinidad al colágeno [118], y en consecuencia, permitiendo la interacción entre la GPVI y el colágeno. Otros estudios sugieren un papel fundamentalmente cooperativo de la GPVI y la integrina $\alpha_2\beta_1$ en su participación en la adhesión al endotelio dañado, comenzando con la unión a la GPVI y posterior activación de la integrina $\alpha_2\beta_1$ [119]. Estudios en modelos murinos con deficiencia genética de integrina $\alpha_2\beta_1$ han mostrado resultados discordantes [119,120]. La contribución relativa de la GPVI y la integrina $\alpha_2\beta_1$ a la interacción de las plaquetas con el colágeno, y su relación con la adhesión mediada por GPIIb-FVW, aún no ha sido completamente dilucidada.

• **Otros componentes subendoteliales.** El subendotelio contiene otros sustratos diferentes capaces de unirse a la plaquetas participando en su activación, como laminina, trombospondina, fibronectina y vitronectina, entre otros [121]. Estos sustratos pueden unirse a varias β_1 y β_3 integrinas. El peso relativo de cada uno de estos componentes en la hemostasia y trombosis no es bien conocido.

1.2.1.2. Activación plaquetaria inducida por adhesión al colágeno

La unión inicial de la GPIIb α al FVW es insuficiente para conseguir una adhesión estable, pero mantiene a las plaquetas, siguiendo la dirección del flujo sanguíneo, en estrecho contacto con la superficie dañada. A este movimiento giratorio de las plaquetas sobre la superficie se le denomina rodamiento

(*rolling*). Al girar, establecen contacto con el colágeno subendotelial expuesto a través del receptor GPVI y la integrina $\alpha_2\beta_1$. Por tanto, el FVW contribuye a la captura inicial de plaquetas sobre la superficie vascular lesionada, y el colágeno establece puentes estables con las plaquetas [122]. La unión de diferentes proteínas de la matriz extracelular subendotelial con integrinas β_1 media la adhesión firme al colágeno; la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ interviene a través de la interacción con la fibronectina y el FVW unido al colágeno. (Tabla 4).

Tabla 4. Principales receptores y ligandos involucrados en la adhesión

Receptor	Nomenclatura previa	Ligando
Complejo GPIIb/IX/V	GPIIb	FVW
Subunidad GPIIba		P- selectina
Subunidad GPIIb β		Trombospondina Colágeno Trombina Factores IX y XII, cininógeno Integrina leucocitaria Mac-1
GPVI		Colágeno Laminina
GPIV	CD36	Colágeno
Integrina $\alpha_2\beta_1$	GPIa/IIa VLA-2 CD49b/CD2a	Colágeno
Integrina $\alpha_5\beta_1$	VLA-5	Fibronectina
Integrina $\alpha_6\beta_1$		Laminina
Integrina $\alpha_v\beta_3$		FVW Fibronectina Vitronectina Osteospondina
Integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$	GPIIb/IIIa	FVW Fibrinógeno Fibronectina Vitronectina Trombospondina

La unión de la GPVI al colágeno induce una cascada de señalización intracelular que conduce al incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ y desencadena la activación de las plaquetas [123]. La activación plaquetaria consiste en una compleja serie de cambios morfológicos y bioquímicos que dan lugar al cambio de forma y la expansión de las plaquetas (*spreading*) sobre las fibras de colágeno expuestas en la zona lesionada, a la liberación local de agonistas plaquetarios solubles como ADP y TxA_2 , y a la expresión en la superficie de las plaquetas de diferentes moléculas adhesivas capaces de atraer y reclutar nuevas plaquetas y otras células, como los leucocitos, que se adhieren unas a otras formando agregados.

1.2.2. Amplificación y agregación

Supone el reclutamiento y activación de nuevas plaquetas sobre la monocapa inicial de plaquetas activadas, debido a la liberación local de agonistas plaquetarios solubles [98]. Estos agonistas, junto con la trombina generada localmente, estimulan receptores que se acoplan a proteínas G e inducen diferentes vías de señalización que actúan sinérgicamente para inducir la activación de las plaquetas vecinas. La amplificación de la activación plaquetaria conduce a la liberación de más agonistas plaquetarios solubles; de este modo, un gran número de plaquetas adicionales se adhieren a la monocapa inicial de plaquetas activadas y se activan a su vez. Estos cambios son imprescindibles para la formación de agregados plaquetarios estables.

Aunque la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ es la molécula mas ampliamente estudiada como mediadora en la formación de puentes entre plaquetas y en la estabilización del trombo, otras moléculas se han propuesto recientemente para ejercer esta función. Entre ellas se incluyen las moléculas de adhesión miembros de la superfamilia de las Igs denominadas JAM (*Junctional adhesion molecule*), la familia de proteínas SLAM (*Signaling lymphocyte activation molecule*) y el ligando CD40 [124–126]. Su papel específico en la agregación plaquetaria no esta claramente definido.

1.2.2.1. Agonistas plaquetarios solubles

Una gran variedad de agonistas plaquetarios solubles juegan un papel crítico en la activación plaquetaria [127]; unos son liberados desde células lesionadas (ADP procedente de la fragmentación de los eritrocitos), otros son producto del proceso de la coagulación (trombina) o de la inflamación (*Platelet-activating factor*, PAF), o forman parte de las placas de ateroma (ácido lisofosfatídico). Pero la mayoría proceden de las propias plaquetas tras su activación, bien del metabolismo del ácido

araquidónico (TxA₂), bien de la secreción de los gránulos densos plaquetarios (ADP, serotonina), y su liberación permite amplificar la activación plaquetaria y reclutar plaquetas circulantes.

La Tabla 5 recoge los principales agonistas solubles y la proteína adhesiva fundamental, el colágeno, implicados en la activación plaquetaria. A continuación se describen los agonistas solubles mas importantes.

Tabla 5. Principales agonistas implicados en la activación plaquetaria

Agonistas	Receptores	Función en la plaqueta
Colágeno	GPIIb (alto flujo vía FVW) $\alpha_{IIb}\beta_3$ (alto flujo vía FVW) $\alpha_2\beta_1$ (bajo flujo) GPVI (bajo flujo)	Activación de Integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ Liberación de ADP y TxA ₂ <i>Spreading</i> Agregación plaquetaria Actividad procoagulante (vía liberación de Ca ²⁺)
Trombina	PAR-1 PAR-4	Agregación plaquetaria Liberación de ADP, epinefrina y serotonina Activación/movilización de ligando CD40 y P-selectina Actividad procoagulante Liberación de ADP y TxA ₂
ADP	P2Y ₁ P2Y ₁₂	Cambio de forma de la plaqueta Agregación transitoria Liberación de TxA ₂ Agregación sostenida Liberación de TxA ₂ Expresión de P-selectina Reclutamiento de plaquetas Actividad procoagulante
TxA₂	TPα TP β	Reclutamiento y agregación en el tapón hemostático primario
Epinefrina	α_{2a}	Suplementa actividad de P2Y ₁₂
Serotonina	5HT-2a	Reclutamiento de plaquetas Actividad procoagulante (vía retención de fibrinógeno y trombospondina en la superficie plaquetaria)

• **Trombina:** La trombina es el componente clave del sistema de la coagulación sanguínea y el más potente agonista fisiológico plaquetario. La respuesta de las plaquetas a la trombina está mediada parcialmente por el complejo GPIb/IX/V, y principalmente por GPCRs activados por proteasas o PAR. Los PAR son únicos entre los GPCRs, ya que su activación se produce a través de la proteólisis de un fragmento extracelular del extremo amino del receptor por la trombina, lo que genera un nuevo extremo amino que muestra un ligando SFLLRN (en el PAR-1) y AYPGKF (en el PAR-4) que activará cada receptor [128]. La trombina, a través de PAR-1 o PAR-4, induce activación plaquetaria, cambio de forma y secreción de gránulos. Un péptido sintético, denominado péptido agonista del receptor de la trombina o TRAP (*Thrombin-receptor agonist peptides*), es capaz de mimetizar el nuevo extremo amino y activar de forma potente al receptor de la trombina, desencadenando las mismas respuestas que la trombina, independientemente de la proteólisis del receptor. Las respuestas dependiente de PAR-1 son evidentes a concentraciones mucho más bajas de trombina que las inducidas por PAR-4 [129], pero para prevenir la activación plaquetaria asociada a trombina, hay que inhibir a ambos. En modelos murinos, la respuesta a trombina es mediada por PAR-3 y PAR-4 [129,130]. Las plaquetas humanas también expresan PAR-3, aunque no parece contribuir a la respuesta plaquetaria a la trombina [129,131]. Actualmente, los antagonistas de los receptores de la trombina son objeto de estudios clínicos avanzados, y representan una nueva diana terapéutica en el tratamiento antitrombótico [137].

Las vías de señalización intracelular de PAR-1 y PAR-4 en plaquetas humanas no son completamente conocidas. Ambos se acoplan a proteínas G, concretamente G_q y G_{12}/G_{13} [132], y posiblemente a G_i [133,134], **Fig.3**. A través de G_q provocan activación de PLC, movilización del Ca^{2+} y activación de proteína cinasa C (PKC) [135]. Mediante G_{12}/G_{13} , la trombina activa también miembros de la superfamilia Ras, como Rac, Rho y Rap1B, con un importante papel en la reorganización del citoesqueleto y el cambio de forma de la plaqueta. Por último, a través de G_i la trombina inhibe la actividad de la adenilato ciclasa (AC), productora del AMPc, que mantiene a las plaquetas circulantes en un estado inhibido, poco propenso a la activación [136].

• **Adenosina difosfato.** El ADP fue identificado en la década de los 60 como un factor derivado de los eritrocitos implicado en la hemostasia y trombosis [138]. Estudios posteriores demostraron que se almacena en los gránulos densos plaquetarios a concentraciones cercanas al rango molar, y es liberado cuando las plaquetas son estimuladas por otros agonistas, como trombina o colágeno, reforzando y amplificando la agregación [139]. El ADP es un agonista plaquetario débil, pero un coactivador esencial para que la respuesta del resto de agonistas plaquetarios, incluso los más débiles, como serotonina o epinefrina, sea eficaz [140].

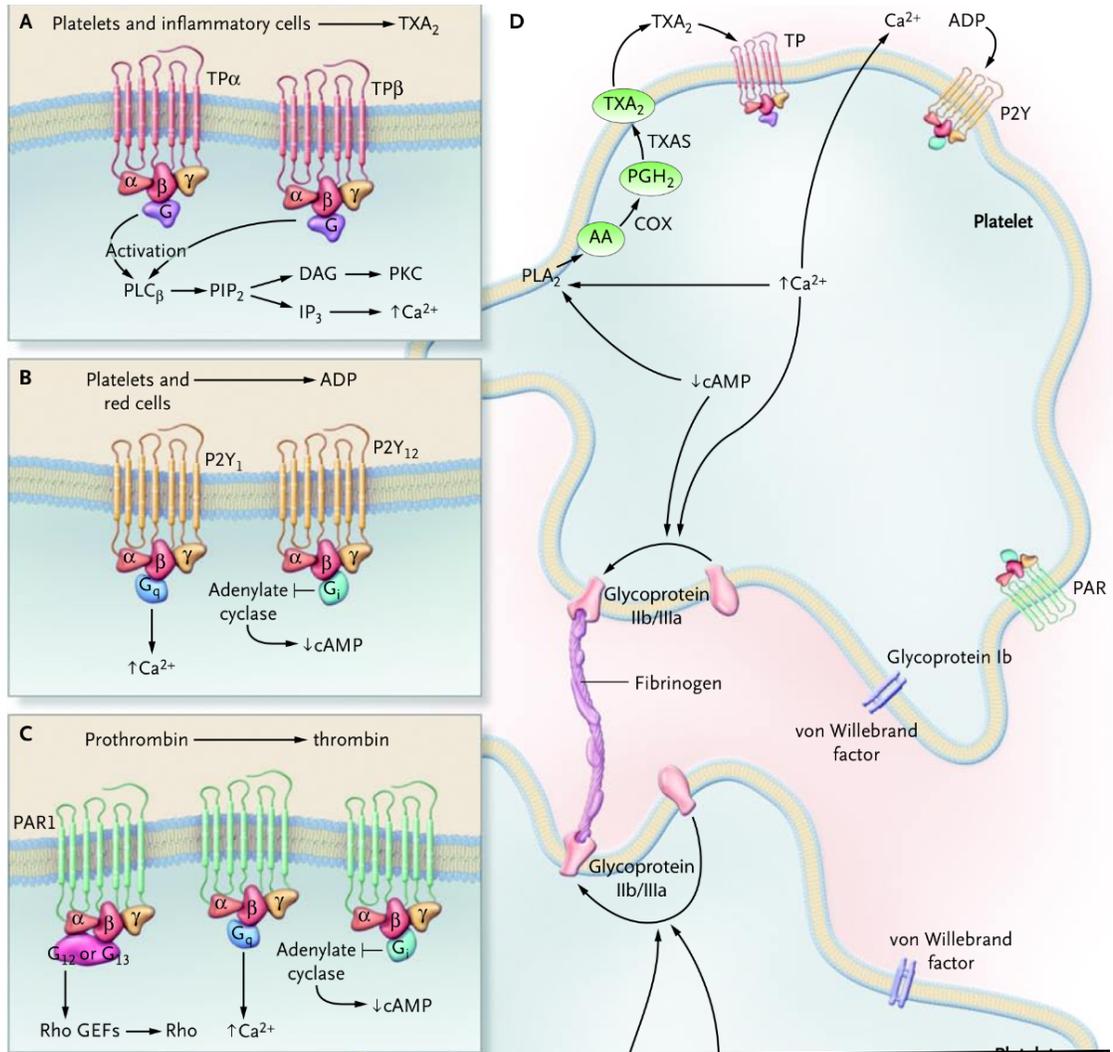


Figura 3. Vías de señalización intracelular de los principales agonistas plaquetarios solubles.
Fuente: ref. 127

El ADP induce la formación de Tx_{A2}, la fosforilación de proteínas, el aumento de la [Ca²⁺]_c debido a una movilización de Ca²⁺ muy rápida y transitoria desde los depósitos intracelulares, y la correspondiente entrada de Ca²⁺ extracelular [141], el cambio de forma, la agregación y la secreción, e inhibe la formación de AMPc. El ADP actúa a través de dos receptores purinérgicos acoplados a proteína G, P2Y₁, acoplado a G_q, y P2Y₁₂, acoplado a G_i [24,30], **Fig.3**. P2Y₁ activa la isoforma β de la PLC, conduciendo a la formación de los segundos mensajeros D-1,2-diacilglicerol (DAG) e IP₃, que activan a la PKC y movilizan Ca²⁺, respectivamente. P2Y₁₂ inhibe la AC y la producción de AMPc, y activa la enzima fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K). En esta última función se cree que subyace la capacidad de sinergia del receptor P2Y₁₂ con otros movilizadores de Ca²⁺, como P2Y₁, receptores del Tx_{A2} o la integrina α_{IIb}β₃ [142].

El ADP activa también a la fosfolipasa A₂ (PLA₂) liberando ácido araquidónico (AA), lo que lleva a la producción de TxA₂. Paradójicamente, se ha observado que el ADP es capaz de estimular una agregación sostenida, con una marcada secreción de gránulos densos, en plasma citratado con niveles micromolares de Ca²⁺, mientras que solo induce una agregación transitoria, que no es capaz de estimular la secreción de los gránulos densos, en presencia de concentraciones fisiológicas milimolares de este catión. Esta diferencia parece asociarse con el incremento de la síntesis de TxA₂ en plasma citratado, sugiriendo que el Ca²⁺ extracelular inhibe la formación de TxA₂ inducida por ADP [142]. Por su importante participación en la agregación plaquetaria, la inhibición del receptor P2Y₁₂ es una efectiva estrategia terapéutica antiagregante [143]. Por otra parte, se han descrito mutaciones en el receptor P2Y₁₂ que se asocian a trastornos hemorrágicos hereditarios [144].

- **Tromboxano A₂.** El TxA₂ es un producto del metabolismo del AA; se han descrito dos isoformas de receptores del TxA₂, TPA y TPβ, aunque TPA es la isoforma predominante expresada en plaquetas humanas [145,146]. El TxA₂ activa a las plaquetas a través del receptor H₂ para TxA₂/PG, que se acopla a G_q y G₁₃ [29,30], dando lugar a la activación de PLC y RhoGEF (*Guanine nucleotide exchange factor for Rho/Rac/Cdc42-like GTPases*) [147]. El TxA₂ es liberado desde diversas células, incluidas las plaquetas, sobre las que actúa de forma autocrina y paracrina. El TxA₂ interviene en el cambio de forma, la agregación, y la secreción de los gránulos plaquetarios, e incrementa la respuesta de otros agonistas plaquetarios, por tanto, amplifica la activación plaquetaria.

Estos fenómenos se acompañan de incrementos en la [Ca²⁺]_c y de la activación de PLC, con la consecuente producción de IP₃ y DAG, de la activación de la PKC, de la fosforilación de la pleckstrina, de la estimulación de la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK), de la activación de PLA₂, que producirá más AA, y, finalmente, la exposición en la membrana de los sitios de unión de la integrina α_{IIb}β₃ [148]. Aunque el incremento en la [Ca²⁺]_c y el cambio de forma se producen independientemente de la acción de otros agonistas, para que la plaqueta se agregue completamente bajo la acción del TxA₂, necesita de la colaboración de ADP y epinefrina [149]. La inhibición de la producción de TxA₂ por inhibición de COX-I es uno de los mecanismos de acción de la aspirina, un agente antiagregante de uso habitual [150], y se evalúa en la actualidad el potencial terapéutico de los inhibidores directos de TPA [151].

- **Epinefrina:** Se considera un agonista débil que amplifica el efecto de otros estímulos. La epinefrina actúa a través de los receptores α₂A-adrenérgicos movilizando Ca²⁺ y facilitando la agregación en

plaquetas preactivadas con trombina, incluso con concentraciones tan bajas como 0,21 nM. [152], mediante su capacidad para inhibir la formación de AMPc [153], tras la unión del receptor α_2A -adrenérgico a G_z , otro subtipo de G_i [31].

1.2.2.2. Activación de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$

La integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ se encuentra normalmente en estado de reposo o de "baja afinidad" en las plaquetas circulantes, pero sufre un cambio conformacional a un estado "activado" o de "alta afinidad" tras la activación plaquetaria [154]. La integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ activada adquiere la capacidad de unirse a sus ligandos (fibrinógeno, FVW, y muchas proteínas de la matriz extracelular que contienen secuencias *RGD-like* [tipo arginina-glicina-aspartato]), y media en la adhesión plaquetaria estable, la agregación plaquetaria y la formación del trombo [155].

Los ligandos ejercen diferentes funciones dependiendo de la fuerza de cizalladura a la que está expuesto el vaso lesionado. En situaciones de flujo con bajo coeficiente de cizalladura, el fibrinógeno actúa como ligando dominante en la agregación. Sin embargo, cuando se incrementa la velocidad de flujo ($> 1000 \text{ s}^{-1}$), el inicio de la agregación depende del FVW y la fibronectina [107]. La molécula de fibrinógeno puede unirse simultáneamente a dos moléculas de integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, y por tanto funcionar como un puente entre plaquetas, lo que inicia el proceso de la agregación plaquetaria. Cada plaqueta contiene de 40.000 a 80.000 copias de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ en su superficie, por tanto, grandes agregados de plaquetas pueden llegar a reunirse sobre la capa inicial de plaquetas activadas, adheridas al endotelio lesionado.

Los mecanismos de señalización *inside-out* de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ inducen cambios en los dominios extracelulares de unión al fibrinógeno, u otros ligandos, transformando el estado de "baja afinidad" a un estado activado [154]. La señalización *inside-out* requiere la unión de dos proteínas expresadas en la matriz extracelular, talina y kindlina, al dominio citoplasmático de β_3 [156-158], pero la relación entre talina y kindlina en este mecanismo aún debe ser aclarada [159-161]. Después de unirse a sus ligandos, la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ sufre un cambio conformacional inducido por la unión al ligando que puede propagarse por un mecanismo *outside-in* al dominio citoplasmático [162]. Sin embargo, aunque los cambios conformacionales de $\alpha_{IIb}\beta_3$ inducidos por la unión al ligando se producen tanto con macromoléculas multiméricas, como el fibrinógeno, como con péptidos monoméricos, solo se observa

una respuesta celular significativa cuando se trata de ligandos macromoleculares multiméricos, sugiriendo que el tipo de ligando puede ser esencial para la transmisión de señales *outside-in* [163].

El primer evento de señalización que ocurre después de la unión de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ con sus ligandos es la unión de la subunidad $G_{\alpha 13}$ de la proteína G al dominio citoplasmático de β_3 [163]. La interacción de $G_{\alpha 13}$ con β_3 estimula la activación de proteínas tirosina cinasas [163], particularmente la unión de β_3 con proteínas tirosina cinasas de la subfamilia Src (SFK) [164]. Las SFKs median en la señalización *outside-in* a través de numerosos mecanismos [165]. Estas señales conducen a la reorganización del esqueleto, la formación y estabilización de grandes agregados, y a la retracción del coágulo.

1.2.3. Estabilización del trombo

Las plaquetas también juegan un papel importante en la hemostasia secundaria, proporcionando una superficie catalítica altamente efectiva para el desarrollo de las reacciones de la coagulación. Cuando las plaquetas son activadas, los fosfolípidos cargados negativamente se mueven desde la cara interna de la bicapa de la membrana plasmática a la cara externa [165]. El movimiento transmembrana de fosfolípidos aniónicos se asocia con la formación y liberación de vesículas procoagulantes ricas en fosfolípidos aniónicos, denominadas microvesículas [98]. Tanto la superficie de las plaquetas activadas como las microvesículas proporcionan sitios de unión para enzimas y cofactores del sistema de la coagulación, permitiendo una eficiente generación de trombina, la única proteasa capaz de actuar sobre el fibrinógeno para formar fibrina.

Los mecanismos biológicos que regulan la función procoagulante de las plaquetas no son bien conocidos; en las plaquetas en reposo los fosfolípidos de membrana están asimétricamente distribuidos, pero tras la estimulación por agonistas potentes, esta asimetría se pierde por la activación de escramblasa, un transportador bidireccional de fosfolípidos dependiente de Ca^{2+} que conduce a la expresión de fosfolípidos cargados negativamente, como fosfatidilserina, en la cara externa de la membrana plasmática [98]. Los defectos en la expresión de fosfatidilserina son raros y se traducen en una diátesis hemorrágica denominada síndrome de Scott [166]. Estudios recientes han identificado en la membrana plasmática a la proteína transmembrana 16F (TMEM16F), que participa en el intercambio de fosfolípidos dependiente de Ca^{2+} , y se ha demostrado una mutación en el gen TMEM16F en pacientes con síndrome de Scott [167].

Por último, las plaquetas activadas y agregadas están interconectadas, directa o indirectamente, por diferentes moléculas de adhesión (P-selectina, fibrinógeno, FVW), pero separadas por hendiduras de unos 50 nm entre ellas, lo que facilita la acción autocrina y paracrina de moléculas liberadas por las propias plaquetas, pero impide la difusión de factores plasmáticos, y por tanto, previene la fibrinólisis prematura del colágeno por acción de la plasmina [17]. La retracción del coágulo ayuda a estrechar esas hendiduras e incrementa la concentración local de agonistas solubles [168]. La acción conjunta de todos estos mecanismos estabiliza el tapón hemostático.

1.2.4. Regulación de la activación plaquetaria

La activación plaquetaria adecuada limita la hemorragia y promueve la reparación de los tejidos lesionados sin causar oclusión vascular. La activación plaquetaria inadecuada, sin embargo, puede conducir a la oclusión arterial, la isquemia y la lesión tisular [98]. Por este motivo, la activación plaquetaria es un proceso finamente regulado, con objeto de alcanzar un equilibrio entre activadores e inhibidores que limite la formación del trombo al lugar de la lesión.

Aunque ratios de flujo patológicamente elevados pueden llegar a activar directamente a las plaquetas, en el contexto de la respuesta hemostática adecuada a la pérdida de la integridad del endotelio, las plaquetas son activadas por la exposición de los componentes adhesivos de la matriz extracelular subendotelial, como el colágeno, por la generación de agonistas plaquetarios a través del proceso de la coagulación, como la trombina, o por factores liberados desde las células endoteliales u otras plaquetas activadas, como ADP, TxA₂ o FVW.

Pero las plaquetas no son solo activadas por el endotelio denudado, sino que también pueden ser activadas por un endotelio inflamado intacto, como ocurre en la arteriosclerosis. Las interacciones entre el endotelio inflamado y las plaquetas parecen estar mediadas por el incremento de la expresión de las moléculas de adhesión endoteliales, como P-selectina, ICAM (*Intercellular cell adhesion molecule*) o VCAM (*Vascular cell adhesion molecule*). Estas moléculas sirven para localizar a las plaquetas, activándolas e induciendo la expresión de moléculas de adhesión en la superficie plaquetaria, como P-selectina e integrinas, y la secreción del contenido de los gránulos plaquetarios ricos en agonistas plaquetarios, pero también ricos en citocinas y quimiocinas, que pueden activar y reclutar leucocitos distantes del lugar de lesión, lo que perpetúa el ciclo de interacciones inflamatorias entre plaquetas, células endoteliales y leucocitos [98].

Las células endoteliales activadas participan en este proceso mediante varios mecanismos: favoreciendo la generación de trombina y el depósito de fibrina, al ayudar a ensamblar los complejos de los factores de la coagulación activados; suprimiendo la activación plaquetaria mediante la liberación de inhibidores como PGI_2 , que aumenta los niveles del AMPc, óxido nítrico (NO), que reduce el catabolismo del GMPc, o CD39, una ectoADPasa de la superficie de las células endoteliales que puede hidrolizar pequeñas cantidades de ADP (que de otro modo podrían producir una activación inadecuada de las plaquetas); o promoviendo la activación de la proteína C, un inhibidor fisiológico de la formación de trombina [98].

1.2.5. Vías de señalización de la activación y agregación plaquetaria

Desde que se produce el estímulo de la plaqueta por un agonista hasta la respuesta de ésta, ocurren un gran número de eventos intracelulares que requieren de la participación de diferentes vías de señalización, que involucran, de forma directa o a través de segundos mensajeros, una compleja maquinaria celular altamente interrelacionada.

El evento central de la activación plaquetaria es el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ que actúa como integrador de las diferentes vías de señalización desencadenadas por los diferentes agonistas, **Fig.4**. Las rutas de transducción de señales utilizan diferentes proteína cinasas para la modificación de la función de las proteínas a través de su fosforilación. La mayoría de las vías de fosforilación proteína G dependientes (activación inducida por agonistas solubles) activan isoformas de la $\text{PLC}\beta$, mientras que las integrinas $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ y $\alpha_2\beta_1$, y los receptores que contienen ITAM (activación inducida por proteínas adhesivas), activan principalmente isoformas de la $\text{PLC}\gamma$. Ambas dan lugar a la producción de dos segundos mensajeros, DAG e IP_3 , que en último término conducen al aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ a través de la ECC [17]. La Fosfolipasa A_2 (PLA_2) es otra vía de señalización inducida por los GPCRs, **Fig. 3**, y se ha asignado un importante papel a las vías de activación a través de PI3K, inducidas por GPCRs, receptores que contienen ITAM, o integrinas, como P2Y_{12} , GPVI e integrina $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, respectivamente.

El incremento transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ desencadenado por estas vías, junto con la activación de otras cascadas de señalización, estimula múltiples vías efectoras, tanto Ca^{2+} dependientes como Ca^{2+} independientes, como la activación de PKC desencadenada por DAG, que conducen finalmente al cambio de forma, secreción granular e incremento de la adhesión y agregación plaquetarias. A continuación se describen las principales moléculas implicadas en las diferentes vías de señalización.

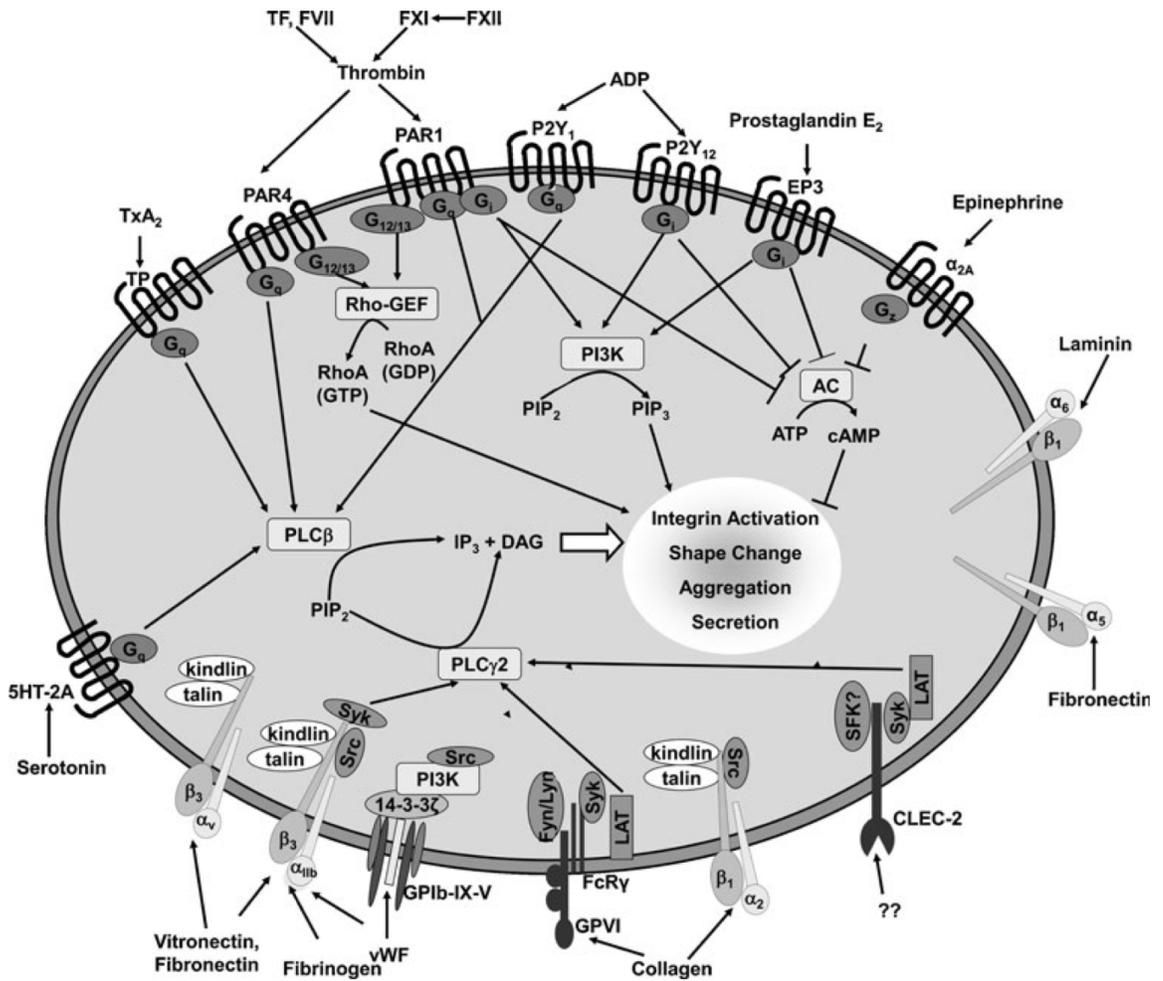


Figura 4. Modelo simplificado de las principales vías de activación plaquetaria. Fuente: Ref. 21

• **Fosfolipasa A₂ (PLA₂).** Esta enzima de 85 kDa, es responsable de la producción de la mayoría del AA, derivado de la estimulación plaquetaria por agonistas fisiológicos. El AA es un ácido graso que se almacena en las membranas de fosfolípidos, principalmente en la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina y el fosfatidilinositol. Cuando la plaqueta es activada, la PLA₂ hidroliza el AA (aunque también puede hidrolizar otros fosfolípidos con otras cadenas acilos) [169], **Fig.3**. En células nucleadas de mamíferos, la PLA₂ es transferida desde el citosol hacia la región perinuclear, donde se encuentran situados el núcleo, el RE y el aparato de Golgi. No existen pruebas de la translocación de PLA₂ hacia los sistemas de membrana (STD y SCA) en las plaquetas, aunque parece lógico suponer esto ya que tanto COX-I como la tromboxano sintetasa se localizan en el STD [75].

La activación de la PLA₂ puede producirse tanto por un aumento en la [Ca²⁺]_c, como por fosforilación [169]. En cuanto a su regulación por Ca²⁺, la PLA₂ posee un dominio C2 en su extremo N terminal que constituye el elemento de unión de la fosfolipasa a los ligandos de una manera dependiente de Ca²⁺, en respuesta a incrementos muy pequeños (de orden nM) en la [Ca²⁺]_c. Así, la mayoría de los agonistas que incrementan la [Ca²⁺]_c vía inositol 1,4,5-trifosfato (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, incrementando la producción de AA. Existen también otras vías de entrada de Ca²⁺ donde los canales están regulados por tirosina cinasas [170]. Numerosos estudios han demostrado 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 la enzima. De tal forma que la actividad de PLA₂ es hasta tres veces mayor cuando ésta se encuentra fosforilada completamente. Cabe destacar que la fosforilación por sí misma no es capaz de activar la PLA₂, aunque incrementa la respuesta de ésta a los aumentos de la [Ca²⁺]_c [169].

• **Fosfolipasa C (PLC).** (~150 kDa). La familia de las PLC, con numerosas isoformas, de las cuales las subfamilias β y γ son las más importantes en las plaquetas, juega un papel esencial en la activación de las plaquetas mediada por receptor. La PLC es una enzima hidrolítica, dependiente de Ca²⁺, con marcada preferencia por el fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) al cual hidroliza generando dos de los mensajeros intracelulares más importantes, el IP₃ y el DAG [73]. Además de la generación de estos dos mensajeros, la hidrólisis de PIP₂ por la PLC tiene otras consecuencias. PIP₂ es el sustrato preferido de la enzima PI₃K, que es activada tras la estimulación de las plaquetas por un agonista y cambia un fósforo del PIP₂ a la 3^a posición del anillo generando el segundo mensajero fosfatidil inositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃); por tanto, la activación de la PLC disminuye el sustrato de la PI₃K afectando a las vías de señalización de esta cinasa [171]. Otra de las repercusiones de la hidrólisis de PIP₂ es la liberación de las proteínas profilina y gelsolina, involucradas en la regulación de la polimerización de actina, y que se encuentran secuestradas en la membrana, unidas al PIP₂, en las plaquetas en reposo [172]. Por último, la hidrólisis de PIP₂ mediada por PLC, bien por la activación plaquetaria 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 neurológico (NGF), permite el reciclado de los fosfoinosítidos [173].

Todas las PLC están compuestas de distintos dominios. En el extremo N tienen un dominio de homología a pleckstrina (PH), seguido de cuatro dominios *EF-hand* (que unen Ca²⁺). El dominio PH es capaz de interactuar con las membranas, por lo que se cree que puede estar involucrado en la translocación de la

PLC a las membranas y su interacción con las proteínas de membrana [174]. El dominio catalítico de la PLC varía en función de la isoforma y está formado por dos regiones designadas X e Y, separadas por más o menos aminoácidos (50-70 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, que es necesario para la activación de la PLC en plaquetas. Existen pruebas de que otras proteínas con el dominio PH pueden inhibir la hidrólisis de PIP₂ inducida por agonistas [175].

La única isoforma de PLC regulada por proteínas G es la PLC β , que es activada por distintos agonistas fisiológicos, como la trombina, el ADP y el TxA₂. Las principales isoformas expresadas en plaquetas 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 mecanismo predominante 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 [174]. La activación de la PLC γ_2 mediada por colágeno en plaquetas, requiere la contribución de numerosas moléculas, incluyendo las tirosina cinasas Fyn, Lyn, Syk y Btk, que median la fosforilación de los residuos de Tyr753 y Tyr759 [176], la proteína adaptadora LAT, las proteínas SLP-76 y PIP₃ [174].

- **Inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃).** Es un segundo mensajero soluble que promueve de manera muy rápida el vaciamiento de los depósitos intracelulares de de Ca²⁺, mediante la activación y cambio conformacional de su receptor (IP₃R). Una ruta alternativa para el IP₃ es su fosforilación, que lo convierte en inositol 1,3,4,5-tetrakisfosfato (IP₄). Aunque el IP₄ no moviliza Ca²⁺ desde los depósitos intracelulares, puede actuar regulando los flujos de Ca²⁺ [177].

- **D-1,2-diacilglicerol (DAG).** Es un segundo mensajero de naturaleza lipídica y unido a la membrana, que media la translocación y la activación de la PKC, que fosforila residuos de serina y treonina. El DAG también puede servir de segundo mensajero para la apertura de canales no capacitivos en la membrana plasmática. El DAG es inactivado rápidamente mediante fosforilación por la DAG cinasa, que lo transformará en ácido fosfatídico (PA), un precursor de la biosíntesis de los fosfolípidos.

- **Proteínas Serina/Treonina (Ser/Thr) cinasas.** Los mecanismos utilizados por esta familia de proteínas para el reconocimiento de su sustrato específico se han descrito recientemente. Estas cinasas dependen del anclaje mediante interacciones directas con el sustrato, utilizando lugares diferentes a la secuencia fosfoaceptora. Las interacciones que se dan al anclarse con el sustrato también contribuyen

a la especificidad y la regulación de la actividad cinasa. El análisis de su estructura indica que los lugares utilizados para el anclaje de los sustratos pueden también unir extensiones N y C terminales al centro catalítico de la cinasa, y participar en la regulación de su actividad [178]. Las principales proteínas Ser/Thr cinasas incluyen:

- **Proteína cinasa A (PKA).** Es una proteína heterotetramérica regulada por AMPc y formada por dos subunidades catalíticas y dos subunidades reguladoras que suprimen la acción de las catalíticas. Así, cuando las subunidades reguladoras se unen a AMPc, las proteínas catalíticas son liberadas permitiéndoles realizar su función fosforilando residuos de Ser/Thr. Esta cinasa contribuye al estado de reposo de las plaquetas mediante su papel en la regulación de la homeostasis del Ca^{2+} en las plaquetas humanas y megacariocitos. Incrementos en la concentración de AMPc estimulados por PG, activan la PKA, que fosforila a su vez los receptores de IP_3 , disminuyendo la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares mediada por IP_3 . La PKA no sólo inhibe la liberación de los depósitos sino que regula de forma negativa la actividad tanto de la PLC, reduciendo la formación de IP_3 y DAG, como de la PLA_2 , e incluso la polimerización de actina [179]. Además de su efecto sobre la liberación de Ca^{2+} , PKA regula la maquinaria que contribuye a reducir la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ tanto en el RE como en la membrana plasmática. Así, PKA regula la bomba ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA) [180] y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) en la membrana [181], e inhibe a fosfolamban, una proteína de membrana que reduce la actividad de la bomba ATPasa de Ca^{2+} del RE (SERCA) [182]. Finalmente la PKA tiene un efecto regulador sobre Rap-1b, GP1ba, VASP (*Vasodilator-stimulated phosphoprotein*), MLCK, y sobre proteínas unidas a actina (ABP) [183]. Además de ser activada por AMPc, la PKA puede ser activada de forma AMPc independiente mediante su unión a I κ B. I κ B forma parte del complejo NF κ B-I κ B, que juega un papel importante en la diferenciación y maduración megacariocítica. En plaquetas activadas por colágeno o trombina, I κ B se disocia del complejo NF κ B-I κ B y se une a PKA, activándola, lo que a su vez fosforilará a VASP y otras dianas de la PKA, participando así en un mecanismo inhibitorio, que reduce la activación plaquetaria tras un estímulo débil [184].

- **Proteína cinasa C (PKC).** Esta familia de cinasas desempeña un papel muy importante en la transducción de señales tras la activación de receptores por sus agonistas. La PKC fosforila numerosas proteínas en residuos de Ser/Thr fundamentales para muchos procesos fisiológicos en las células, como la diferenciación o la proliferación celular; en las plaquetas, regulan varias funciones como la agregación, el vaciamiento del contenido de los gránulos, la movilización del Ca^{2+} intracelular y el cambio de forma de la célula. Los miembros de la familia de la PKC son activados de forma

reversible por el segundo mensajero DAG, tras la activación de la PLC mediada por receptores de membrana [185].

La PKC parece estar involucrada en gran variedad de respuestas inhibitorias en las plaquetas, fosforilando diversas proteínas y reduciendo su actividad, como la PLC, la AC, la PLA₂, la PI3K y la MLCK. La fosforilación e inhibición de esta batería enzimática conduce a alteraciones en la liberación de Ca²⁺, la producción de AMPc y la generación de AA [186,187,185]. Además, la PKC es la encargada de la desensibilización de los receptores, vía fosforilación, una vez que estos han sido activados por sus agonistas; por ejemplo, del receptor del TxA₂ (TP), del que sólo se ha descrito la isoforma TPα en plaquetas, y que es fosforilado por la PKC inmediatamente después de su activación [188]. La PKC es fundamental para la agregación plaquetaria, porque su inhibición previene la agregación en respuesta a la mayoría de los agonistas. Se ha demostrado que la activación de la PKC sucede en paralelo a la activación de la integrina α_{IIb}β₃ para unir fibrinógeno y favorecer la agregación [189], y que la inhibición de la PKC por un inhibidor específico, bloquea la activación de α_{IIb}β₃ y su capacidad para unir fibrinógeno [190]. Por último, la PKC está involucrada en la secreción de los gránulos densos y los gránulos α, de manera independiente de la agregación. Aunque los mecanismos por los que interviene en la secreción plaquetaria no son bien conocidos, el uso de inhibidores específicos de la PKC bloquea la secreción tras el estímulo con agonistas como la trombina [191,185].

Las plaquetas expresan varias isoformas de la familia PKC, que incluyen las isoformas clásicas de PKC α y β (Ca²⁺ y DAG dependientes), las nuevas isoformas PKC δ, θ, y η (DAG dependientes y Ca²⁺ independientes), y la isoforma atípica PKC ζ (Ca²⁺ y DAG independiente) [192-196]. Otra nueva PKC, PKC ε, se ha detectado en plaquetas murinas, pero no en plaquetas humanas [197]. Las PKCs clásicas, sobre todo PKC α, juegan un papel crítico y fundamental en la secreción de los gránulos plaquetarios y en la agregación dependiente de secreción. PKC δ y θ promueven la secreción de los gránulos densos en respuesta a los agonistas del receptor de la trombina [192,194,195]; sin embargo, la función de ambas PKC en la secreción y agregación mediada por GPVI es controvertida. Para algunos la PKC δ podría regular negativamente la secreción de gránulos densos inducida por GPVI [192,195], mientras que para otros su acción carece de efecto [196]. También se ha descrito que la PKC θ podría promover la secreción de los gránulos plaquetarios y la agregación dependiente de GPVI [195], pero otros grupos proponen una regulación negativa sobre la activación plaquetaria y la secreción de gránulos plaquetarios mediada por GPVI [198,199]. La proteína pleckstrina es un sustrato de la PKC que posiblemente esté involucrado en la regulación del citoesqueleto [200].

- **Proteína cinasa G (PKG).** Es una proteína homodimérica formada 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 incluso ser activada por AMPc, inhibiendo la activación plaquetaria [201]. La PKG actúa en muchas ocasiones de forma coordinada y sinérgica con la PKA, por lo que resulta difícil distinguir su acción de la de esta última. La PKG inhibe la función de la PLC, la liberación de Ca^{2+} a través del IP_3R y la VASP [183].

- **Cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK).** La actividad de la MLCK se encuentra regulada principalmente por la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, aunque su activación también se produce por trombina y PAF a concentraciones basales de Ca^{2+} intracelular. A su vez, la fosforilación de las cadenas ligeras de miosina actuaría sobre el aparato contráctil de plaquetas participando en la organización de los gránulos de secreción.

- **Ser/Thr cinasas Akt (PKB).** Otra molécula que se encuentra directamente relacionada con los 3-fosfoinositoles es la serina/treonina cinasa Akt. Esta cinasa es activada por el PDGF en un proceso que requiere PI3K unida a sitios específicos del receptor del PDGF. El IP_3 interacciona con un dominio PH de Akt estimulando su actividad cinasa.

• **Proteínas tirosina cinasa (PTKs).** Estas enzimas catalizan la transferencia de un fosfato desde una molécula de ATP a un residuo de tirosina en la molécula seleccionada, en lo que constituye uno de los procesos básicos y fundamentales en el control, la integración y la amplificación de las señales intracelulares de las respuestas fisiológicas. Las PTKs pueden dividirse en dos grandes familias, los receptores tirosina cinasa (RTKs) situados en la membrana plasmática, y las tirosina cinasa no receptores (NRTKs), libres en el citoplasma. Las plaquetas humanas contienen gran número de PTKs, con una proporción muy baja de RTK en sus membranas, entre las que cabe destacar el receptor de PDGF, siendo la mayoría de la familia NRTKs, dentro de la que podemos citar a las Src, las Syk y las cinasas de adhesión focal (FAK). Miembros destacados de la familia Src son la pp60-src, la pp60fyn, pp54,58lyn, pp61hck y pp62c-yes [203]. La fosforilación en residuos de tirosina se encuentra implicada en varias respuestas funcionales de las plaquetas, incluyendo 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 numerosas interacciones entre FAK con diversas proteínas del citoesqueleto, lo que conlleva a una agregación irreversible [204].

• **Proteínas tirosina fosfatasa (PTP).** Las plaquetas también poseen una elevada concentración de proteínas con actividad tirosina fosfatasa [205]. Como la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina es el resultado del balance de dos acciones opuestas, tirosina cinasa y tirosina fosfatasa, el bloqueo de la actividad fosfatasa mediante inhibidores produce agregación plaquetaria con solo una fosforilación transitoria de proteínas en residuos de tirosina [206]. La multiplicidad de señales generadas por el aumento de la fosforilación en tirosina en plaquetas humanas, como la activación de PLC, se produce por la interacción con sus dominios SH-1 y SH-2 [207], sitios específicos de reconocimiento que se encuentran asociados con residuos de fosfotirosina, y permite señalar enzimas como PLC- γ , PI₃K y NRTKs [208]. Además las PTP tienen un papel relevante en la Entrada Capacitativa de Calcio (ECC) en plaquetas humanas. Tras su estimulación con trombina, o tras la inducción del vaciamiento de Ca²⁺ de los depósitos, la proteína α -actinina asociada al canal capacitativo TRPC1, sufre una desfosforilación seguida de una rápida fosforilación necesaria para la activación de la ECC [54].

• **Proteínas Ser/Thr fosfatasa (PP).** Las plaquetas expresan numerosas Ser/Thr fosfatasa. PP₁, la fosfatasa más estudiada, regula procesos celulares como la adhesión plaquetaria, a través de su interacción con la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. Cuando PP₁ está inactiva, su subunidad catalítica se une directamente a la subunidad α_{IIb} de la integrina, y tras la activación plaquetaria, se disocia y desfosforila la miosina de cadena larga, lo que es necesario para la despolimerización y reorganización del citoesqueleto [209,210]. Además, la proteína cofilina es regulada por una Ser/Thr fosfatasa en el residuo Ser3; al ser desfosforilada, se une al citoesqueleto de actina y reduce la longitud de los filamentos de actina, siendo esta despolimerización necesaria para la ECC [211].

En resumen, tanto las proteínas adhesivas como los agonistas solubles inducen una señal de transducción en la plaqueta a través de sus receptores específicos. Los diferentes mecanismos de señalización de la activación plaquetaria específicos de cada receptor, convergen en eventos comunes de señalización que conducen al cambio de forma de la plaqueta, la secreción de los gránulos plaquetarios y, en última instancia, los mecanismos de señalización *inside-out* que provocan el cambio conformacional de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ y activan la función de unión a sus ligandos específicos. La unión de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ a sus ligandos media en la adhesión y la agregación plaquetaria, y desencadena un mecanismo de señalización *outside-in*, que resulta en la expansión de las plaquetas sobre la zona lesionada, la secreción adicional de gránulos plaquetarios, la estabilización de la adhesión y agregación plaquetarias, la expresión de actividad procoagulante en la superficie de la plaqueta y la retracción del coágulo [155]. Por tanto, una respuesta común inducida por los diferentes agonistas es la secreción de los gránulos plaquetarios.

1.3. Secreción plaquetaria

La función plaquetaria en su conjunto está mediada por la liberación de diferentes moléculas desde las plaquetas; algunas de estas moléculas son generadas en las propias plaquetas, como el TxA_2 , derivado del metabolismo del AA, que participa, además de en la hemostasia, en la producción de moléculas proinflamatorias o antiinflamatorias [213]; otras son sintetizadas mediante los mecanismos extranucleares "señal dependientes" que conducen a la traducción del RNAm plaquetario en proteínas como interleucina-1b y factor tisular, que enlazan hemostasia e inflamación [213]; pero la mayoría son moléculas almacenadas en los gránulos plaquetarios y liberadas por un mecanismo de exocitosis, diferente en varios aspectos del proceso clásico de exocitosis de las células nucleadas, y aún no completamente dilucidado [63]. Muchas de estas moléculas participan en la hemostasia, pero otras pueden modificar el desarrollo del trombo, regular la proliferación celular, modular la respuesta inmune y contribuir a diferentes eventos de adhesión celular [2]. Esta capacidad de las plaquetas para almacenar y liberar mediadores bioactivos constituye el proceso denominado secreción plaquetaria.

Durante la secreción plaquetaria, el contenido de los gránulos de las plaquetas activadas es liberado a la circulación sanguínea, o bien es translocado a la superficie plaquetaria, alterando la composición de la membrana externa mediante la expresión de moléculas poco representadas en la superficie de la plaqueta en reposo, como P-selectina, especialmente importante en la interacción entre leucocitos y plaquetas activadas, o incrementando el número de moléculas presentes habitualmente en la membrana externa de la plaqueta, como integrina $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, esencial para la agregación plaquetaria [214]. Las plaquetas actúan como eficientes vehículos de transporte capaces de liberar su carga de forma inmediata, en cualquier punto del organismo donde sean activadas [215].

La función secretora se inicia con el desarrollo de los gránulos, que comienza en vesículas del aparato de Golgi de los megacariocitos. Mientras que la formación de los lisosomas plaquetarios es similar a la observada en otros tejidos [216], los gránulos α y densos, en cambio, son transferidos directamente a los cuerpos multivesiculares, estructuras endosómicas que contienen numerosas vesículas formadas con la membrana limitante de endosomas, donde maduran y pueden interactuar con vesículas de endocitosis [63]. El proceso de secreción culmina cuando los diferentes agonistas interactúan con sus receptores específicos en la superficie de la plaqueta, activando a la plaqueta y desencadenando la liberación del contenido de sus gránulos [63]. En contraste con la visión simplista de una secreción granular uniforme que ha prevalecido durante décadas, recientes estudios sugieren que los gránulos α

son heterogéneos, y esta heterogeneidad podría conducir a una secreción diferencial de su contenido [78,79].

Además de la secreción de sus gránulos, las plaquetas activadas liberan otras dos poblaciones diferentes de vesículas con membrana, microvesículas derivadas de la superficie celular, y exosomas de origen endosomal. Las microvesículas tienen un contenido protéico similar al de la membrana plasmática y una función procoagulante e inflamatoria. Los exosomas son endosomas contenidos en los gránulos α durante su maduración en los cuerpos multivesiculares megacariocíticos, que en algunos casos persisten en los gránulos α maduros y son secretados tras fusionarse con los gránulos α durante la activación plaquetaria; su función aún no es bien conocida [217,218].

La importancia de la secreción plaquetaria en patología humana, se pone de manifiesto en las trombopatías por deficiencia en la secreción de los gránulos o SPD (*Storage Pool Deficiencies*), que originan trastornos hemorrágicos significativos. En cambio, apenas existen evidencias acerca de las consecuencias de una inapropiada distribución del contenido de los gránulos α [219].

1.3.1. Mecanismo molecular de la fusión de membranas

La secreción de los gránulos plaquetarios es un mecanismo dependiente de energía. Es bien conocido el papel de la fusión de membranas en este proceso, pero solo recientemente, este mecanismo está siendo investigado a nivel molecular. El mecanismo de fusión de membranas en la plaqueta comprende componentes lipídicos de la bicapa de la membrana plasmática, proteínas transmembrana denominadas SNARE y proteínas chaperonas que interactúan con las proteínas SNARE.

Esta maquinaria de fusión de membranas está regulada, a su vez, por cambios en la organización del citoesqueleto dependientes de la activación plaquetaria, por los niveles de $[Ca^{2+}]_c$, por la actividad cinasa y por la actividad de proteasas intracelulares. A través de estos mecanismos, la interacción de diferentes ligandos con sus receptores correspondientes en la superficie celular es transmitida a la maquinaria de fusión de membranas, facilitando dicha fusión y la secreción del contenido de los gránulos plaquetarios [63].

1.3.1.1. Lípidos de membrana

La formación de un poro para la secreción de los gránulos plaquetarios necesita la fusión de dos membranas lipídicas. La fusión de bicapas lipídicas contrapuestas en un ambiente acuoso precisa de energía suficiente para superar las fuerzas hidroelectrostáticas repulsivas entre las dos membranas [220]. Esto sugiere que la composición lipídica de la zona de fusión podría ser un determinante crítico del proceso. Se conoce relativamente poco acerca de los lípidos específicos que se requieren para la fusión de membranas plaquetarias. Dos componentes lipídicos, ácido fosfatídico (PA) y PIP₂, se han estudiado en este contexto. Existen evidencias experimentales de la función de ambos componentes lipídicos en la fusión de membranas.

- **Acido fosfatídico.** Las plaquetas contienen fosfolipasa D (PLD) que cataliza la hidrólisis de fosfatidilcolina para generar el segundo mensajero PA. Estudios *in vitro* han mostrado que la síntesis de PA se correlaciona con el incremento de la secreción granular. Además, la inhibición de la síntesis de PA por alcoholes primarios, que parece afectar a la actividad de la fosfolipasa D, inhibe tanto la producción de PA como la secreción de gránulos densos [221]. A esto se suma que tanto PA como sus análogos aumentan la secreción de gránulos densos inducida por la activación de la PKC y por GTP- γ -S [222]. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en otras células secretoras como células neuroendocrinas o neuronas [223]. El papel exacto de PA en la fusión de membranas no está bien definido, se ha propuesto que podría alterar la curvatura de la membrana, favoreciendo la conformación de sitios para la fijación de proteínas involucradas en la fusión [221,222].

- **Fosfatidil inositol 4,5 bifosfato.** El papel de PIP₂ en la regulación de la secreción fue demostrado inicialmente en células neuroendocrinas [223]. En plaquetas, PIP₂ es sintetizado por PIPKs tipo I y tipo II tras la activación plaquetaria [224,225]. El papel de PIP₂ en la secreción de los gránulos plaquetarios se ha estudiado en diferentes experimentos *in vitro*, que han demostrado su contribución a la secreción de los gránulos inducida por agonistas [226,227]. El papel de PIP₂ en la secreción plaquetaria está mediado por la acción de PLC que lo hidroliza en DAG e IP₃. DAG estimula a la PKC, que facilita la secreción de los gránulos a través de diferentes vías efectoras. IP₃ induce la liberación de Ca²⁺ de los depósitos intracelulares, lo que significa un potente estímulo para la secreción de los gránulos plaquetarios. Además PIP₂ puede unirse a numerosas proteínas involucradas en el tráfico de membranas y en la reorganización del citoesqueleto, lo que puede influir en la secreción granular [228–230].

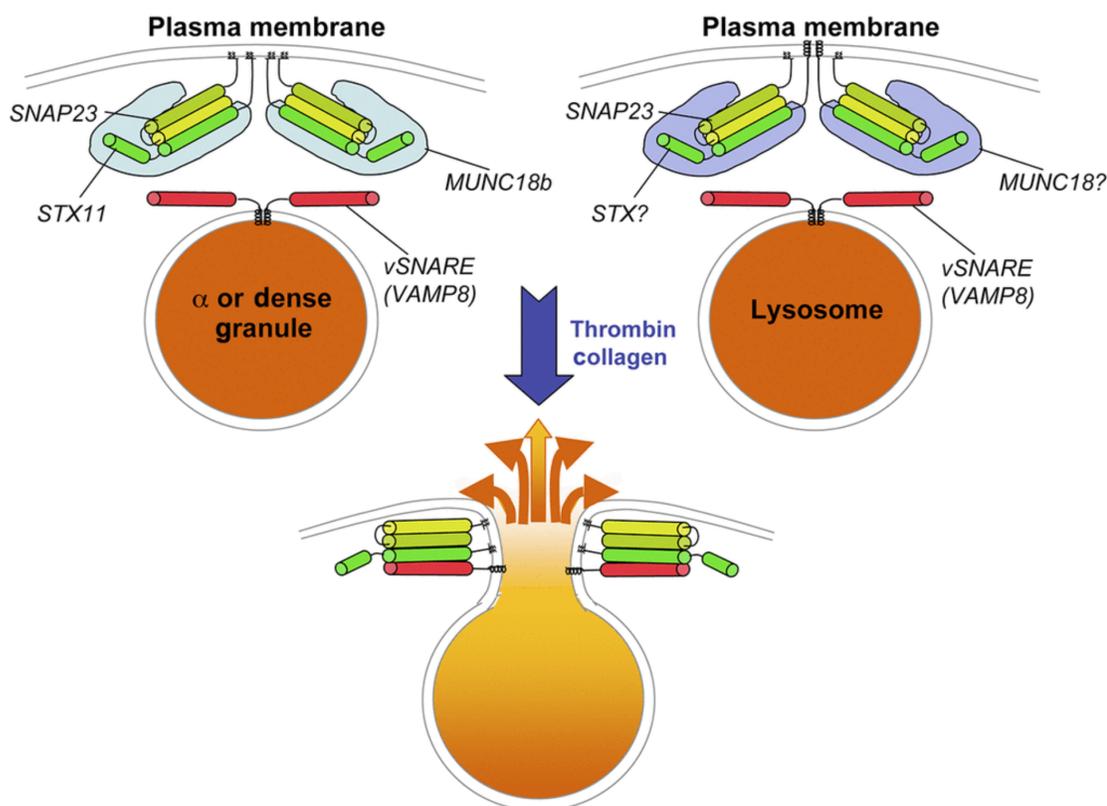


Figura 5. Fusión de gránulos plaquetarios con la membrana plasmática externa por un mecanismo SNARE dependiente, tras la estimulación de la plaqueta con agonistas. Fuente : ref. 234.

1.3.1.2. Proteínas SNARE

La regulación de la fusión de membranas en cualquier célula no se controla exclusivamente por los lípidos de la membrana. En las últimas décadas se ha estudiado detalladamente la maquinaria proteica responsable de controlar la formación de poros, en particular, un componente crítico de esta maquinaria, las proteínas SNARE, descritas originalmente en neuronas [231], que han demostrado tener un papel central en la fusión de membranas en plaquetas. Las proteínas SNARE son proteínas integrales de membrana orientadas hacia el citosol. La hipótesis original SNARE proponía que las proteínas v-SNARE, localizadas exclusivamente en las membranas de vesículas o gránulos, interactuaban con las proteínas t-SNARE, localizadas exclusivamente en la membrana diana (*target*), que en plaquetas se corresponde con la membrana plasmática externa. Posteriormente se ha comprobado que esta localización no es tan restrictiva [232].

Las v-SNAREs y t-SNAREs contienen dominios citoplasmáticos *coiled-coil* [233] mediante los que interactúan, proporcionando la base molecular para explicar la fusión de las membranas de los gránulos con la membrana plaquetaria externa o la membrana del SCA. Dentro de las proteínas v-SNAREs se describieron originalmente las proteínas VAMPs (*Vesicle-associated membrane protein*), y entre las t-SNAREs, sintaxina y SNAP-23. La fusión requiere la interacción entre los dominios citoplasmáticos de las proteínas SNARE. Tres dominios *coiled-coil* de una t-SNARE se unen a un único dominio *coiled-coil* de una v-SNARE, para formar un paquete de 4 hélices que conduce a la deformación de las membranas y a la fusión [234], **Fig.5**. Se ha demostrado la presencia de proteínas SNARE en plaquetas [236–238], y en plaquetas humanas se han descrito, entre las v-SNARE, VAMP-2/sinaptobrevina, VAMP-3/cellubrevina [239,245], VAMP-7/TI-VAMP y VAMP-8/endobrevina [240,241,242,243,219], y entre las t-SNARE, dos tipos, SNAP (se han identificado SNAP-23, SNAP-29; la presencia de SNAP-25, en cambio, es controvertida) [244], y sintaxinas (sintaxinas 2, 4, 6 y 11) [246,247].

Función de las proteínas SNARE. Varios grupos de investigación han contribuido, en la última década, al conocimiento de la función de las proteínas SNARE en la secreción de los gránulos plaquetarios. Flaumenhaft *et al.* demostraron el papel de SNAP-23 y sintaxina-4 en la secreción de los gránulos α [248] y de sintaxina-4 en la secreción lisosomal [249]. Reed GL *et al.* revelaron la presencia de VAMP-8 y VAMP-3 en plaquetas humanas [250]. Posteriormente Lemons PP *et al.* mostraron que SNAP-23 y sintaxina-2 están implicadas en la secreción de los tres tipos de gránulos [245,246,251], y Ren *et al.* revelaron que VAMP-8 es la vSNARE dominante implicada en la secreción de los gránulos α , mientras que VAMP-3, y quizás VAMP-2, juegan un papel secundario [219]. Se ha descrito recientemente que sintaxina-11 forma complejos SNARE con VAMP-8 y SNAP-23, y parece tener un papel dominante en la secreción de los gránulos α y densos en plaquetas humanas, a diferencia de las sintaxinas 2 y 4, cuya función parece secundaria [251]. **Fig.5**.

Organización del mecanismo de fusión. Los complejos triméricos de proteínas SNARE se han detectado en gránulos α tanto en conformación *cis* como *trans*. Diferentes estudios apuntan a que, aunque en la plaqueta en reposo existen complejos SNARE en ambas conformaciones, la conformación en *cis* es propia de la plaqueta no activada [254]; es posible que la estimulación de plaquetas pueda llevar a la activación de la proteína NSF, que cataliza la disociación de estos complejos *cis*, permitiendo la formación de complejos *trans* en membranas que están estrechamente asociadas. Los modelos más recientes de función de SNARE proponen al complejo de membrana *trans* formado, como el mínimo elemento requerido para la fusión de membranas [235].

Por otra parte, un detallado análisis ultraestructural de los gránulos densos ha demostrado que, aproximadamente el 70% de las membranas de los gránulos densos, están dentro de 12,5 nm de membrana conectada a la superficie por una estructura en forma de puente [253]. Esta evidencia morfológica sugiere que esta población de gránulos densos anclada a membranas conectadas a la superficie, es la secretada preferentemente durante la activación plaquetaria, pero se desconoce si además se asocian a una fusión rápida tras la estimulación de las plaquetas en reposo.

1.3.1.3. Proteínas asociadas a SNARE

Se han descrito numerosas proteínas chaperonas que se unen a proteínas SNARE e intervienen en los mecanismos de exocitosis. Algunas se han identificado en plaquetas, demostrándose su participación en la secreción de los gránulos plaquetarios.

- **Proteína NSF** (*N-ethylmaleimide-sensitive fusion*). Es una ATPasa esencial en la mayoría de los mecanismos de tráfico de vesículas, como los que regulan la secreción de gránulos [255]. Se ha demostrado que interfiere en la secreción de los gránulos α , gránulos densos y lisosomas plaquetarios [250,251,255]. Aunque se han propuesto funciones alternativas [256], el papel esencial de NSF para facilitar la secreción granular es funcionar como molécula chaperona que desensambla los complejos SNARE en conformación *cis* para que puedan interactuar en conformación *trans*. De hecho, al inhibir la proteína NSF, las proteínas SNARE son secuestradas en complejos *cis*, e incapacitadas para interactuar con otras proteínas SNARE en membranas contrapuestas. La proteína α -SNAP (*soluble NSF-attachment protein*) se une a NSF, activándola [257]. En plaquetas, se ha demostrado experimentalmente que α -SNAP incrementa la secreción de los gránulos inducida por Ca^{2+} [258].

- **Proteínas Sec-1/Munc-18**. Son una familia de proteínas que se unen a sintaxinas [259]. Se han descrito tres isoformas de Munc-18 en plaquetas humanas, Munc-18a, Munc-18b y Munc-18c. Ésta última se une a sintaxina-4, e inicialmente se sugirió que podría jugar un papel regulador esencial en la secreción plaquetaria [260]. Estudios recientes, sin embargo, parecen indicar que Munc-18b, que forma complejos con sintaxina-11, es la isoforma esencial en la regulación de la secreción de los gránulos α y densos [234], **Fig. 5**.

- **CDCrel-1.** Es otra proteína de unión a syntaxina-4 identificada en plaquetas, que es fosforilada tras la activación plaquetaria [261]. Estudios en modelos murinos han mostrado que CDCrel-1 interviene en la regulación de la secreción de los gránulos plaquetarios.

- **Proteínas Rab.** Estas proteínas y sus efectores son capaces de acoplar membranas contrapuestas y parecen modificar la función de proteínas SNARE. Las proteínas Rab constituyen la rama más amplia de la superfamilia ras GTPasa. Las plaquetas contienen Rab-1a, 1b, 3B, 4, 6c, 8, 11, 27a, 27b y 31 [262–264]. Rabs 3b, 6c, y 8 son fosforiladas tras la activación plaquetaria [263,265]. Evidencias experimentales [266] apuntan a la posibilidad de que Rab-4 es requerida para la secreción de los gránulos α pero no para la de los gránulos densos. En células nucleadas, se ha demostrado que las proteínas Rab se unen a grandes proteínas efectoras que parecen interactuar con las proteínas SNARE, bien directamente, bien a través de proteínas reguladores como NSF y Munc-18c, que median la función de proteínas SNARE [267]. Las proteínas Rab efectoras, aún no se han identificado en plaquetas.

1.3.2. Regulación de la secreción de los gránulos plaquetarios

La secreción plaquetaria parece regulada por las proteínas SNARE a través de cascadas de señalización como la activación de la PKC o la elevación de la $[Ca^{2+}]_c$. Junto con estas dos vías, se han propuesto al propio citoesqueleto plaquetario y a algunas enzimas proteolíticas como partícipes de esta regulación [63].

1.3.2.1. Influencia del citoesqueleto

Se ha demostrado en estudios ultraestructurales que la secreción de los gránulos plaquetarios es fundamentalmente diferente de la observada en células nucleadas. En las plaquetas activadas los gránulos α confluyen en el centro de la plaqueta, se fusionan con el SCA y con la membrana plasmática, y liberan su contenido al espacio extracelular y a la luz del SCA [268-271]. La centralización de los gránulos sucede concurrentemente con el cambio de forma inducido por la activación y precede a la secreción granular. Por tanto, es posible que los cambios morfológicos inducidos por la reorganización del citoesqueleto tras la activación plaquetaria contribuyan a la secreción de los gránulos plaquetarios.

Sin embargo, la influencia del citoesqueleto en la secreción granular es objeto de debate. Diferentes observaciones apuntan a la posibilidad de que el citoesqueleto de actina pueda actuar como barrera

que debe ser superada por las plaquetas para la secreción de sus gránulos [272-273]. Las evidencias moleculares que puedan explicar este mecanismo se han propuesto desde diferentes trabajos de investigación con escinderina, una proteasa de F-actina Ca^{2+} dependiente [274]. La escinderina recombinante aumenta la secreción de los gránulos densos, mientras que su inhibición disminuye la secreción granular inducida por Ca^{2+} en plaquetas permeabilizadas [274]. Además, estudios con la proteína MARCKS (*myristoylated alanine-rich C kinase substrate*), que une y se une a actina [275], y es inactivada por la fosforilación de PKC después de la activación plaquetaria, sugieren que la polimerización de actina podría actuar más como barrera, que como facilitadora de la fusión de membranas [276]. Las cinasas involucradas en las vías de señalización que llevan a la contracción de actomiosina también pueden contribuir a la secreción de gránulos [277-282]. La fosforilación de la cadena ligera de la miosina aumenta la actividad de la ATPasa de miosina activada por actina, y estimula el movimiento de la miosina a lo largo de la actina polimerizada. En células neuroendocrinas se ha propuesto a la miosina como mediador del movimiento de vesículas, desde el *pool* de reserva, al *pool* de vesículas dispuestas para ser liberadas de forma inmediata [283,284]. El papel de la contracción de actomiosina en la secreción de los gránulos plaquetarios, sin embargo, no está bien dilucidado.

1.3.2.2. Proteínas ligadoras de calcio

Existe una amplia evidencia acerca del papel del Ca^{2+} en la secreción granular de múltiples tipos celulares. Un aumento en la concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ acompaña a la secreción de los gránulos plaquetarios, y la secreción puede desencadenarse en plaquetas permeabilizadas por elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ [285]. Varias líneas de investigación actuales tratan de identificar las proteínas que median en los diferentes efectos de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ sobre la secreción de los gránulos plaquetarios. Las proteínas ligadoras de Ca^{2+} involucradas en la secreción pertenecen a dos categorías generales, proteínas *EF hand* y proteínas ligadoras de Ca^{2+} /fosfolípidos [286]. Dos de las proteínas *EF hand* implicadas en la secreción y que se han identificado en plaquetas incluyen la calmodulina y calciclina [287]. La calmodulina se une a los gránulos α de las plaquetas [288]. Varias evidencias farmacológicas sugieren que la fosforilación de la cadena ligera de la miosina dependiente de Ca^{2+} /calmodulina mediante MLCK, contribuye a la secreción de los gránulos plaquetarios [277-284]. El mecanismo por el que MLCK interviene en la secreción en células nucleadas, parece ser la unión específica de calmodulina a VAMP-8 [289], que media directamente en la secreción granular [290], pero esto no se ha demostrado en plaquetas. Sintaptotagmina, una proteína que enlaza Ca^{2+} /fosfolípidos y actúa como sensor del Ca^{2+} , se ha identificado en plaquetas, pero no se conoce su función en las mismas. Las proteínas ligadoras de Ca^{2+} ,

escinderina y calpaina, también parecen tener alguna función en la secreción de los gránulos plaquetarios [274,289-291].

1.3.2.3. Actividad cinasa

La PKC está involucrada en la secreción granular por una vía Ca^{2+} dependiente. Los eventos de señalización, desencadenados por la unión de los receptores de superficie con sus ligandos correspondientes, que producen la activación de PKC están bien establecidos [292], pero aún no se han identificado completamente los efectores de la actividad PKC. La PKC fosforila directamente ciertas proteínas SNARE y sus chaperonas. Por ejemplo, la fosforilación de Munc-18c por PKC disminuye la afinidad de Munc-18c por sintaxina 4. Este mecanismo puede liberar sintaxina 4 para que interaccione con proteínas SNARE en membranas contrapuestas [293]. La fosforilación de MARCKS por PKC disminuye la afinidad de MARCKS por PIP_2 . De este modo, PIP_2 está libre para interactuar con otros de sus ligandos.

Un conjunto de potenciales efectores de la PKC son las proteínas SNARE y sus chaperonas. Munc-18, sintaxina 4 y CDCrel-1 son fosforiladas por PKC en plaquetas [294-296]. Además, hay alguna evidencia de que la fosforilación por PKC de Munc-18c interfiere con su unión a sintaxina 4 [294], y que la fosforilación PKC de sintaxina 4 inhibe su unión a SNAP-23 [296]. La proteína MARCKS es otro potencial efector. Estudios cinéticos han demostrado que la fosforilación de MARCKS por PKC precede a la secreción de los gránulos plaquetarios [297], y la inhibición de la fosforilación de MARCKS, inhibe la secreción de gránulos. La proteína MARCKS no fosforilada se une estrechamente a PIP_2 en membranas y lo protege de la degradación por PLC [298]. Cuando se fosforila por PKC, la afinidad de MARCKS por PIP_2 disminuye sustancialmente [299] permitiendo a otros ligandos de PIP_2 unirse a él. Como PIP_2 media en la secreción de los gránulos plaquetarios [300,301], la exposición de PIP_2 después de la fosforilación de MARCKS puede contribuir a la secreción de los gránulos.

PIPK tipo II representa otro potencial efector de PKC, por un mecanismo regulador negativo. La activación de plaquetas con PMA (aceto miristato de forbol, un activador de la PKC) induce la inhibición de la actividad de PIPK tipo II [301], lo que a su vez inhibe la secreción de los gránulos plaquetarios. No se ha determinado si PKC fosforila directamente a PIPK tipo II. El hecho de haber identificado tantos efectores de PKC relacionados con la secreción, enfatiza la importancia de esta cinasa en la secreción de los gránulos plaquetarios.

1.3.2.4. Actividad proteasa

Diferentes evidencias sugieren que las proteasas intracelulares influyen en la secreción de los gránulos plaquetarios. SNAP-23 es escindida por calpaína después de la activación plaquetaria [302,303]. VAMP-3 también es degradada por calpaína, pero además parece susceptible a otras proteasas plaquetarias [291]. En contraste, las sintaxinas 2 y 4 no son escindidas tras la activación plaquetaria [290,291]. Por otra parte, calpaína escinde varias moléculas de señalización, como PKC y PLC, que influyen en la señalización de la secreción de los gránulos. La regulación inducida por proteasas de la PKC parece interferir con la secreción de los gránulos densos en plaquetas intactas [301]. La inhibición específica de calpaína en plaquetas intactas inhibe la expresión en la superficie de P-selectina inducida por agonistas [289]. En contraste, la inhibición de calpaína no afecta sustancialmente la secreción del contenido de los gránulos inducida por Ca^{2+} en plaquetas permeabilizadas [290]. Por tanto, los efectos de la proteólisis de proteínas intracelulares sobre la secreción de gránulos, varían dependiendo de las condiciones experimentales.

1.3.3. Vías de señalización de la secreción plaquetaria

Múltiples vías y eventos de señalización participan de manera importante en la estimulación de la secreción de los gránulos plaquetarios [170], como la generación de TxA_2 , importante para la secreción granular inducida por ADP, FVW y colágeno; las cascadas de señalización *outside-in* de integrinas; la regulación de complejos SNARE por fosforilación dependiente de PKC; las cascadas de señalización de las pequeñas GTPasas Rac-1 y RhoA; la activación de SFKs, particularmente de Lyn [302]; y estudios recientes, involucran a las vías de señalización de varias Ser/Thr cinasas como PI3K/Akt [303,304,305], NO/cGMP/PKG [306,307] y las isoformas de MAPK p38, ERK y JNK [308,309], sugiriendo que la SFK Lyn activa la vía PI3K/Akt, y PI_3K y Akt median en la secreción granular principalmente por activación de la vía NO/cGMP/PKG, lo que estimularía la secreción de los gránulos a través de la activación de MAPKs y la fosforilación de las proteínas SNARE.

Finalmente, un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ acompaña a la secreción de los gránulos plaquetarios, aunque los mecanismos a través de los cuales el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ se acopla a los eventos de secreción son poco conocidos [233]. Los dos principales modelos propuestos son la activación de la PKC [310], que fosforila proteínas que intervienen en la despolimerización de actina, y la acción de proteínas ligadoras de Ca^{2+} , como escinderina, sobre el citoesqueleto.

1.4. Homeostasis del Ca^{2+} en plaquetas humanas

El ión Ca^{2+} es uno de los mensajeros intracelulares más extendido en el reino animal. En términos generales, los agonistas celulares modulan la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ para regular diversas funciones celulares, como la contracción muscular, la secreción, la proliferación y el crecimiento celular, la expresión de genes o la agregación plaquetaria. Las células pueden aumentar su $[\text{Ca}^{2+}]_c$ liberando Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares y permitiendo la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular a través de la membrana plasmática. Además, las células cuentan con mecanismos para reducir la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, reintroduciendo este ión en los depósitos intracelulares o bombeándolo al medio extracelular a través de la membrana plasmática, mediante el uso de transportadores que necesitan ATP para realizar esta función [311].

Una célula en reposo mantiene la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ muy baja (~ 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 genera un fuerte gradiente electroquímico que las células deben regular a través de una maquinaria muy sofisticada que retiene el Ca^{2+} en los depósitos intracelulares, o lo expulsa al exterior de la célula mediante el uso de ATPasas. Además, las células poseen también mecanismos que permiten la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares o el paso de Ca^{2+} extracelular a través de las membranas, por canales más o menos específicos para Ca^{2+} y otros cationes, que se encuentran cerrados cuando las células están en reposo, evitando así el incremento de Ca^{2+} en el citoplasma que conduciría a la apoptosis y muerte celular.

1.4.1. Mecanismos que incrementan la $[\text{Ca}^{2+}]_c$

Se pueden dividir a su vez en dos subgrupos. Los que liberan Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares y los que permiten la entrada de Ca^{2+} desde el exterior.

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

Cuando un agonista se une a su receptor en la membrana plasmática se produce la activación de la PLC, que genera dos segundos mensajeros intracelulares, el IP_3 y el DAG. El IP_3 se une a su receptor en el RE, lo que induce un cambio de conformación del mismo que permite la salida masiva de Ca^{2+} al citoplasma. El DAG activa la PKC [311].

• **Receptores de IP₃ (IP₃R).** Descritos por primera vez por Furuichi [312], están situados en el RE y sufren un cambio conformacional cuando son activados por el IP₃, permitiendo la liberación de Ca²⁺ de los depósitos intracelulares [313]. Presentan 3 dominios diferentes: el dominio de unión N terminal al IP₃; el dominio regulador con un lugar de unión para ATP y residuos susceptibles de fosforilación; y, finalmente, un dominio carboxilo terminal con 6 regiones transmembrana, responsables de la agregación de las cuatro subunidades necesarias para formar el canal activo [314,315]. Una concentración de Ca²⁺ elevada en lumen del RE hacen que el IP₃R sea muy sensible a IP₃, y esta sensibilidad disminuye tras el vaciamiento de los depósitos [316]. Además, estos canales están regulados por la [Ca²⁺]_c, de tal manera que, con incrementos en la [Ca²⁺]_c (300-600 nM), el IP₃R se abre y permite la liberación de Ca²⁺ [317]. Finalmente, el ATP tiene un efecto dual sobre el IP₃R, actuando como coactivador hasta una concentración de ATP de 4 nM, e inhibiendo la apertura de los mismos a concentraciones de ATP superiores, probablemente por competición con el sitio de unión del IP₃ [318]. Se han descrito tres subtipos de este receptor, demostrándose la implicación del IP₃R tipo II en el mantenimiento de la apertura de los canales TRPC1 en plaquetas humanas.

• **Receptores de rianodina (RyR).** Se encuentran situados en el RE y son similares, tanto en estructura como en función, al IP₃R. Los RyR son activados por la rianodina (a concentraciones inferiores a 10 μM), la cafeína, la ADP ribosa cíclica y por el propio Ca²⁺ (a concentraciones menores de 1 mM), dando lugar a un proceso de liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺ (CICR). La calmodulina actuaría como modulador de este canal llegando incluso a anular el efecto conjunto de la rianodina, el ADP y la cafeína [319]. Hasta el momento, esos receptores no se han descrito en plaquetas humanas.

• **Receptores del nicotinato de adenina dinucleótido fosfato (NAADP).** El NAADP, un derivado desaminado del nicotinadenín dinucleótido fosfato (NADP), se ha presentado recientemente como un mensajero capaz de liberar Ca²⁺ de depósitos ácidos (endosomas, lisosomas y vesículas secretoras). El NAADP libera Ca²⁺ de manera independiente del IP₃ y el ADP [320] a través de sus receptores, identificados recientemente como los canales con dos dominios de poro o TPC (*Two pore channels*) [321].

• **Canal liberador de Ca²⁺ sensible a esfingolípidos (SCAMPER).** Este canal liberador de Ca²⁺ intracitoplasmático responde a lípidos derivados de la esfingosina, cuya concentración aumenta ante factores de crecimiento como el PDGF. Se desconocen las funciones fisiológicas que desencadenan su apertura [322].

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

La activación completa de muchas funciones celulares mediante la generación de la señal de Ca^{2+} , precisa el aumento sostenido y prolongado de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, que en muchos casos no es posible alcanzar solo con el Ca^{2+} almacenado en los depósitos. Por este motivo la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular a través de canales en la membrana es fundamental. Según el tipo celular existen distintos mecanismos para la entrada de Ca^{2+} .

- **Entrada de Ca^{2+} activada por voltaje (VOC).** Se produce fundamentalmente en células eléctricamente excitables, como las neuronas, las células musculares y muchas células endocrinas, donde su apertura responde a una despolarización de la membrana que permite la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular. Estos canales se encuentran regulados por receptores y mensajeros intracelulares [323]. Un estudio reciente ha puesto de manifiesto que el canal activado por voltaje Cav1.2, es además regulado por la región SOAR del sensor de Ca^{2+} del RE, 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+} [324].

- **Entrada de Ca^{2+} activada por segundos mensajeros (SMOC).** En células no excitables, la entrada de Ca^{2+} puede producirse a través de canales iónicos activados por segundos mensajeros. De forma fisiológica, algunos segundos mensajeros desencadenan la apertura de canales sensibles a moléculas generadas tras la activación de un receptor en la membrana, que permiten el flujo de cationes monovalentes o divalentes. Entre estas moléculas podemos destacar el IP_4 en células endoteliales, la PKC en plaquetas o el DAG en muchos tipos celulares [325,326,327].

- **Entrada de Ca^{2+} activada por receptor (ROC).** Se produce por la unión de un agonista, normalmente neurotransmisores como el glutamato, ATP o ADP, al dominio extracelular del receptor de tipo ionotrópico. Ejemplos clásicos de ROC son los receptores del ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), que se abren en respuesta al glutamato [328], o los receptores purinérgicos de las plaquetas P2X_1 , que se abren tras su activación por ATP [145].

- **Entrada de Ca^{2+} activada por el vaciamiento de los depósitos intracelulares (SOC).** Se produce tras el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} , y es uno de los principales mecanismos de

entrada de Ca^{2+} en las células no excitables. Está regulado por el estado de relleno de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} . Fue descrita por Putney en 1986, quien observó que, tras el vaciamiento de los reservorios de Ca^{2+} intracelulares, se produce la apertura de canales de Ca^{2+} en la membrana, canales que habían permanecido cerrados mientras la célula estaba en reposo, y que permiten una entrada masiva de Ca^{2+} al citoplasma y el relleno de los depósitos de Ca^{2+} , lo que conduce de nuevo al cierre de los canales bloqueando la entrada de Ca^{2+} [329]. Se denomina Entrada Capacitativa de Calcio o ECC, y se han propuesto, hasta el momento, cuatro modelos que pretenden explicarla:

- **Modelo difusible.** Se basa en que el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} provoca la apertura de los canales en la membrana y la ECC a través de alguna molécula difusible aún no caracterizada. Se han postulado varias posibles vías, entre las que destacan cambios en la concentración citosólica de GMPC, algunas tirosina cinasas o pequeñas proteínas unidas a GTP, productos derivados del metabolismo mitocondrial, algunas vías de Ca^{2+} dependientes de calmodulina o el denominado factor del influjo de Ca^{2+} (CIF) [330]. Este modelo se ha ido abandonando paulatinamente al no conseguir identificarse ninguna molécula que lo explique.

- **Modelo del acoplamiento conformacional constitutivo.** Este modelo sugiere que se produce un contacto físico entre los IP_3R , en el RE, y los canales de la membrana plasmática tras el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} . El RE debe estar situado cerca de la membrana plasmática para que se produzca esta interacción [68].

- **Modelo del acoplamiento conformacional “de novo”.** Rosado *et al.* han propuesto una modificación del modelo del acoplamiento conformacional en el que participan los mecanismos de tráfico de membranas en las células. Así, tras el vaciamiento de los depósitos intracelulares, el RE, que no se encuentra situado en las cercanías de la membrana plasmática, se acerca a la membrana plasmática con ayuda del citoesqueleto de actina y se produce la interacción entre los IP_3R y los canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática [331].

- **Modelo de secreción.** Propone que tras el vaciamiento de los almacenes de Ca^{2+} se produce la translocación e inserción de canales ya formados desde el RE hasta la membrana plasmática [332]. Esta hipótesis se apoya en distintos trabajos que demuestran que la ECC necesita de la colaboración de proteínas involucradas en el tráfico y fusión de vesículas con la membrana plasmática [333].

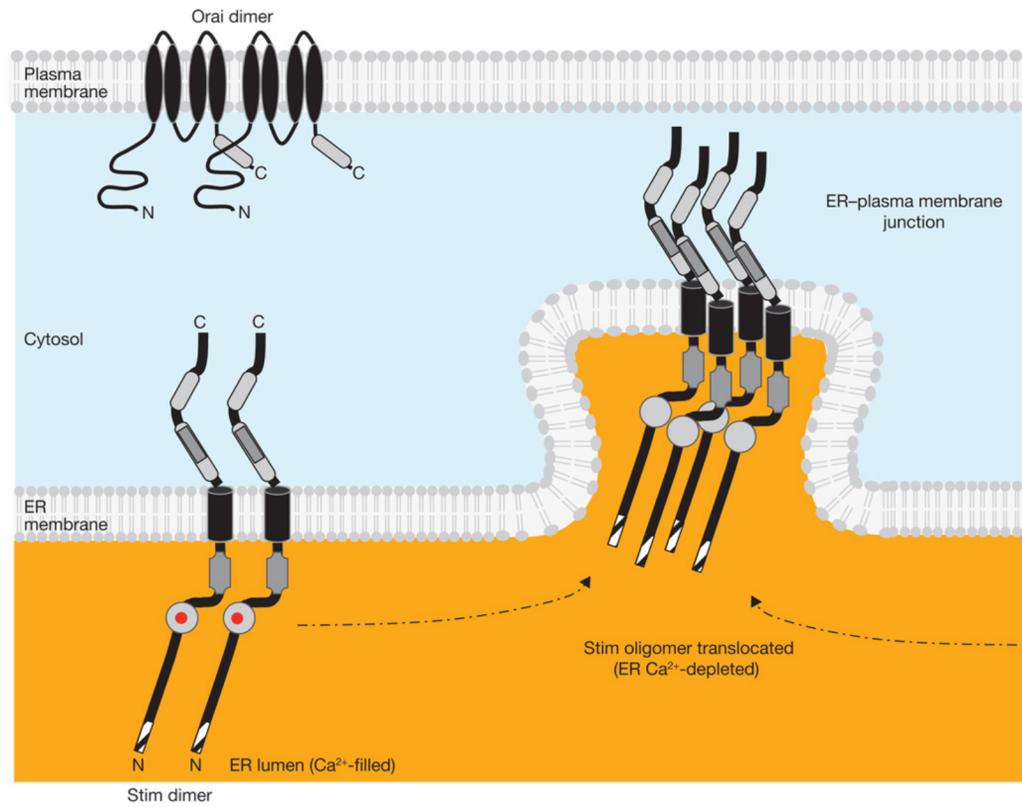


Figura 6. Modelo de multimerización de STIM1 e interacción con Orai1. Fuente: ref.438.

En los últimos años se han ido identificando diversas proteínas involucradas directamente en la ECC y en el paso de información desde el RE hasta los canales en la membrana plasmática, las principales se describen a continuación.

- **STIM1** (*Stromal interaction molecule 1*). (685 aa). Fue identificada como el sensor de Ca^{2+} del RE en 2005 [334,335], y se expresa en la mayoría de las células animales. STIM1 tiene un dominio *EF-hand* capaz de ligar Ca^{2+} , que se sitúa en el lumen del RE y comprende los aminoácidos 76-87. La afinidad de este dominio por el Ca^{2+} es muy baja (0.5–1 mM) [336], de modo que con los depósitos llenos, la concentración elevada de Ca^{2+} favorece la unión, pero tras el vaciamiento de los depósitos, la disminución de la concentración de Ca^{2+} deja libre el dominio *EF-hand*. Cuando esto sucede, STIM1 sufre un cambio conformacional que le permite unirse y activar los canales en la membrana plasmática [337], **Fig.6**. La mutación de este dominio (D76A) conduce a la incapacidad para unir Ca^{2+} a través de la ECC, lo que puede ser letal para la célula [338].

Además del dominio *EF-hand*, STIM1 posee un dominio alfa estéril (SAM) en el extremo amino (N) situado en el lumen del RE, mediante el que STIM1 forma homodímeros u homotetrámeros [339]. Esta pequeña proteína de poco más de 75 kDa, tiene solo una región transmembrana altamente conservada. En el extremo carboxilo (C), situado en el citoplasma, STIM1 posee varios dominios importantes. En primer lugar cabe destacar dos 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 de manera independiente, con la capacidad de activar la ECC sin necesidad del vaciamiento de los depósitos. Esta pequeña región se denomina SOAR (*STIM1 Orai1-activating region*) y comprende los aa 344-442 [340], OASF (*Orai1-activating small fragment*) comprendida entre los aa 233-474 [341] y CAD (*CRAC-activating domain*) entre los aa 342-448 [342].

STIM1 también posee el dominio CMD (*CRAC-modulatory domain*), que interacciona con un sitio de unión para calmodulina en el extremo N de Orai1 [343], y con residuos de glutamato conservados en el extremo C de los tres Oraís, que regula la inactivación rápida de Orai1 por Ca^{2+} [344,340]. 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 que se caracterizó, y la más ampliamente estudiada por técnicas electrofisiológicas [335,340]. La secuencia rica en Ser/Thr de STIM1 ha sido identificada recientemente como un sitio de multimerización e interacción con Orai1 [345], **Fig.6.**

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 plástica [346] y activa la apertura de los canales TRPC [347]. Finalmente, STIM1 tiene numerosos 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, donde la fosforilación de STIM1 inhibe la ECC [348]. STIM1 también puede ser fosforilada por la cinasa regulada extracelularmente ERK1/2, que puede ejercer un control en la interacción entre STIM1 y Orai1 [349].

- **TRPs.** (*Transient receptor potential*). En la década de los 90 se propusieron a los homólogos en mamíferos de los receptores de potencial transitorio, TRPs, de *Drosophila*, como candidatos para mediar la ECC [350,351]. El nombre de estos canales se debe a que se identificó una mutación en los mismos que daba lugar a una respuesta no sostenida a la exposición a la luz (potenciales transitorios), en lugar de los potenciales sostenidos observados en canales no mutados [352]. Se han identificado diferentes subfamilias de TRP en mamíferos: TRPC, TRPA, TRPV, TRPM, TRPML, TRPP; cada subfamilia está constituida por distintas isoformas (por ejemplo, los canales TRPC1-TRPC7 son activados tras la

hidrólisis de PIP₂, tras la estimulación con diversos agonistas en distintos tipos celulares y tejidos) [353,354]. No todos los TRPCs contribuyen a la ECC, algunos funcionan como canales en otro tipo de mecanismos 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⁺ denominada *I*_{SOC} (*store-operated Ca²⁺ current*) [354].

- **TRPC1** (793 aa). Es el TRP más estudiado y varios grupos apoyan su participación en la ECC como uno de los principales componentes de la misma en una gran variedad de células, como las glándulas salivales, queratinocitos, musculares, HEK293 y plaquetas humanas, entre otras [355-360], mientras otros grupos disienten de esta afirmación [361-364]. El TRPC1 fue el primer homólogo mamífero del TRP identificado en humanos por dos grupos en 1995 [365,366].

La estructura del TRPC1 es muy similar al del resto de la familia TRPC. En su extremo N citosólico posee 4 dominios repetidos de ankirina necesario para la formación de la unidad heteromérica con otros TRPCs y un dominio *coiled-coil*, necesarios para la unión entre TRPC1. Además posee un sitio de unión para caveolina1 (Cav1), una proteína adaptadora y reguladora que sirve como nexo entre las interacciones de las proteínas en la membrana plasmática y los lípidos [367]. El TRPC1, como el resto de miembros de la familia de canales TRP, atraviesa la membrana 6 veces (6 dominios transmembrana), y el poro para el paso de cationes se sitúa entre los dominios 5^o y 6^o. En su extremo C, también citosólico, el TRPC1 posee la secuencia característica de los TRP (EWKFAR); un dominio rico en prolina altamente conservado, donde se insertan un sitio de unión a la proteína FKBP52, una inmunofilina que regula el plegado y el tráfico de proteínas, y otro sitio de unión para Homer1, una proteína de soporte, que facilita la interacción entre proteínas. Finalmente, tiene un dominio de unión a calmodulina e IP₃R denominado CIRB, que modula la activación del TRPC1 en función de la [Ca²⁺]_c [368], y dos dominios *coiled-coil*, en los que se encuentra insertado un segundo dominio de unión a calmodulina, que está involucrado en la inactivación del TRPC1 dependiente de Ca²⁺ [369]. El TRPC1 presenta una selectividad pNa⁺/pCa²⁺ 1:1. El TRPC1 forma diferentes canales con diferente selectividad para Ca²⁺, desde algo selectivo hasta nada selectivo (midiendo la permeabilidad de Ca²⁺ frente a la de Na⁺). Esta variación en la selectividad del canal es debida a que los monómeros de TRPC1 forman heterotetrámeros, por lo general dos TRPC1 y otros dos TRPCs, variando la selectividad en función del heterotetrámero formado [358,370]. Hasta la fecha, se ha comprobado que el TRPC1 forma canales con TRPC4/TRPC5 [371] con TRPC3/TRPC7 [372]; sin embargo no hay pruebas concluyentes de que forme un canal homotetramérico.

- **TRPC3** (848 aa). Se encuentra situado en la membrana plasmática y colabora principalmente en la Entrada no Capacitativa de Calcio (ENCC). Estructuralmente es muy similar a los demás TRPCs, con algunas particularidades. Ambos extremos, N y C, se encuentran situados en el citoplasma, y posee los 6 dominios transmembrana, situándose el poro entre el 5º y el 6º. En su extremo N, posee los 4 dominios repetidos de ankirina, el dominio *coiled-coil*, y el sitio de unión a caveolina, pero además tiene un sitio de unión con la PLC γ en el primer dominio de ankirina y una unión para VAMP-2 entre los dominios de ankirina 3 y 4. En su extremo C tiene el dominio EWKFAR, un dominio rico en prolina donde se inserta un sitio de unión para FKBP12 pero no para Homer1, y el dominio CIRB, acabando en un dominio *coiled-coil* [373]. El TRPC3 presenta una selectividad pNa^+/pCa^{2+} 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 la hidrólisis de PIP₂ generando DAG que activará el canal. Se ha demostrado que en algunos tipos de célula, el TRPC3 puede ser activado por el vaciamiento de los depósitos [350,353,374].

- **TRPC6** (931 aa). Presenta la estructura típica de los TRPCs, con los extremos N y C en el citoplasma, la estructura EWKFAR y los seis 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 el TRPC1 y 3, no tiene sitios de unión para la Cav1. En el extremo C tiene el dominio rico en prolina con un sitio de unión para FKBP12, el CIRB y un dominio *coiled-coil* final [373]. El TRPC6 presenta una selectividad pNa^+/pCa^{2+} 1:5. El canal TRPC6 es regulado por muchas señales, como el segundo mensajero DAG, la fosforilación en residuos de serina o tirosina, el PIP₂ e incluso el vaciamiento de los almacenes de Ca²⁺ intracelulares [375,327].

• **Orai1** (301 aa). Esta proteína, también denominada CRACM1, se caracterizó durante el estudio de una mutación en la posición R91W del gen FLK14466 del cromosoma 12 humano, que suprime la entrada de Ca²⁺ y las corrientes I_{CRAC} en células T; esta mutación se ha asociado con un síndrome de inmunodeficiencia severa combinada en dos pacientes no relacionados [376]. 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⁺ [354]. Orai1 forma complejos de canales de iones multiméricos en la membrana plasmática, regulados por el vaciamiento de los depósitos de Ca²⁺ intracelular, y mediado por la participación de STIM1 [377]. Orai1 es una pequeña proteína de membrana, (~38 kDa), con ambos extremos N y C, en el citoplasma. Presenta 4 dominios transmembrana y el poro se encuentra situado entre los dominios 2º y 3º. En su extremo N posee dos dominios ricos en prolina, uno rico en arginina, y otro muy cercano al primer dominio transmembrana,

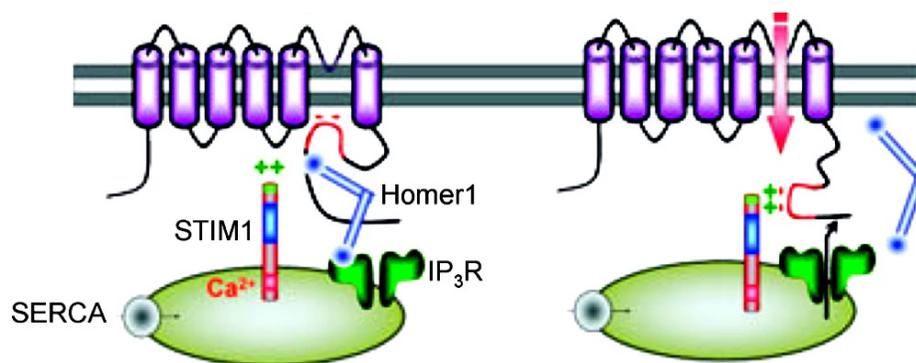


Figura 7. Modelo de regulación de la apertura y cierre del canal TRPC con la participación de Homer1 y STIM1. Fuente: ref.379.

rico en arginina/lisina. Además presenta un sitio de unión a calmodulina, que al unirse provoca inactivación del canal [343]. En su extremo C posee un dominio *coiled-coil* por el que se une al extremo C de STIM1 [340-342].

Orai1 contiene dominios estructurales que pueden formar un canal de Ca^{2+} muy selectivo ($\text{pNa}^+/\text{pCa}^{2+} \sim 1000$), y pequeñas mutaciones pueden alterar su selectividad por los cationes. Se ha sugerido que la región 106-114 aa, de composición muy ácida, con un glutamato en posición 106 crucial para definir la selectividad a Ca^{2+} del canal, una glutamina en posición 108, y tres residuos de aspartato en posiciones 110, 112 y 114, puede ser la región formadora del poro.

- **Homer.** Las proteínas Homer son una familia de proteínas citoplasmáticas adaptadoras, Homer1, Homer2 y Homer3, con numerosas isoformas, que juegan diferentes papeles en la función celular, [377]. La única isoforma monomérica, Homer1a, contiene un extremo C-terminal corto, mientras que el resto, formas largas de Homer, tienen en dicho extremo un dominio *coiled-coil* con el que forman tetrámeros, y dos motivos cremallera de leucina. Las Homer tetraméricas son necesarias para formar complejos con otras proteínas de soporte, que agrupan proteínas de señalización del Ca^{2+} en microdominios celulares. Todas las proteínas Homer contienen un dominio EVH1 (*Ena VASP Homology 1*), con el que interactúan con el dominio PPXXF, presente en varias proteínas que intervienen en la homeostasis del Ca^{2+} , como IP_3R o TRPC, regulando su actividad. Homer1a parece actuar como un regulador negativo de las formas largas de Homer, que tienen diferentes papeles en las vías de señalización del Ca^{2+} [378,379]. La función de Homer1, la mejor conocida y documentada hasta el momento, parece ser participar en los mecanismos moleculares que regulan la apertura y el cierre de los canales TRPC. **Fig.7.** Todos los

canales TRPC contienen dominios de unión para Homer1 y STIM1, separados entre sí solo por cuatro residuos aminoácidos. Recientemente se ha propuesto un mecanismo molecular por el que Homer1 interviene en el acoplamiento de los canales TRPC con el IP₃R, lo que mantiene estos canales cerrados. La disociación de los complejos TRPCs-Homer-IP₃Rs, permite el acceso de STIM1 a su dominio de unión a los TRPCs, lo que facilitaría la apertura del canal [378,379].

1.4.1.3. Mecanismo de la entrada de Ca²⁺

Tras la unión de un agonista a su receptor de membrana acoplado a proteínas G, o acoplado a ITAM, se produce la activación de PLC, que hidroliza PIP₂ y lo transforma en IP₃ y DAG. Por un lado, el IP₃ se une a su receptor en el RE, lo que provoca que éste sufra un cambio conformacional que permitirá la salida de Ca²⁺ al citoplasma y desencadenará la activación de diferentes rutas [68]. La liberación de Ca²⁺ en los depósitos provoca que el Ca²⁺ unido al dominio *EF-hand* de STIM1 se libere, con lo que STIM1 sufre un cambio conformacional que le permite activar a los canales de Ca²⁺ en la membrana plasmática.

En estado de reposo, STIM1 tiene ocultos los dominios *coiled-coil*, con los que se activa a Orai1, y el dominio rico en prolina que activa el TRPC1. En primer lugar, este cambio conformacional, habilita a STIM1 para formar homodímeros u homotetrámeros con otras moléculas de STIM1, y heterodímeros o heterotetrámeros con moléculas de STIM2. Estas uniones se producen mediante el dominio SAM que se encuentra en el extremo N de las STIMs [380].

Tras el vaciamiento de los reservorios de Ca²⁺, ambas proteínas se reorganizan en zonas concretas de la membrana plasmática que poseen un alto contenido en colesterol, denominadas balsas lipídicas [381]. La interacción de 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 menos de 100 nm (regiones *puncta*) [327,382]. 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 y permite la entrada de Ca²⁺ desde el exterior celular [340]. Además STIM1 se une a la membrana por su dominio K en el extremo C, para estabilizar las uniones con las proteínas de membrana y activa el canal TRPC1 [383]. En plaquetas humanas, el vaciamiento de los depósitos intracelulares incrementa la interacción entre STIM1 y hTRPC1 en un 50%; este incremento puede ser inhibido por la electrotransfección de un anticuerpo anti-STIM1 [384], bloqueando también la interacción entre hTRPC1 y el IP₃R que se produce tras el vaciamiento de los

almacenes de Ca^{2+} [357]. Esta interacción entre el TRPC1 y los IP_3Rs tiene un papel fundamental en la ECC en varias líneas celulares [357,385,386].

Por otro lado, se ha descrito que STIM1 se transloca a la membrana plasmática tras el vaciamiento de los depósitos [325], y que la presencia de STIM1 en la membrana plasmática es necesaria para las corrientes I_{CRAC} en células T Jurkat, y la ECC en HEK293 [387]. En plaquetas humanas, se ha demostrado que esta translocación requiere de los filamentos de actina [141]. Sin embargo existen autores contrarios a la idea de la translocación de STIM1 a la membrana plasmática, sugiriendo que, como la distancia entre las membranas del RE y de la membrana plasmática es muy pequeña (100 nm), STIM1 actuaría como si se encontrara en la membrana plasmática cuando en realidad se halla en el RE [388,389].

Además de la apertura de los canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática, el vaciamiento de los depósitos por IP_3 , y el consiguiente incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ desencadena la aperturas de otros canales de Ca^{2+} en los depósitos, como los receptores de rianodina, en un fenómeno conocido como liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR) [390]. Por otra parte, el DAG actuará como segundo mensajero activando canales permeables a Ca^{2+} , entre los que destacan TRPC3 y TRPC6, no involucrados en la ECC (canales SMOG), contribuyendo con ello al aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ necesario para la función celular.

Recientemente, se ha identificado una nueva familia de proteínas denominadas factor de intercambio de nucleótidos de guanina regulado por Ca^{2+} y DAG (CalDAG-GEF/RasGRP), con una serie de dominios estructurales, tipo *EF-hand* de unión a Ca^{2+} y de unión a DAG, que sugieren que estas proteínas podrían estar involucradas en la regulación de las señales mediadas por Ca^{2+} y DAG. Un estudio reciente ha demostrado que la proteína CalDAG-GEFI activa a Rap1, una GTPasa monomérica que participa en activación rápida de las plaquetas activada por Ca^{2+} dentro de un complejo formado por CalDAG-GEFI, la PKC y el receptor purinérgico P2Y_{12} [391]. Además, el DAG activa la PKC, que tiene un efecto inhibitorio sobre la PLC, la AC, la PLA_2 , la IP_3K y la MLCK [186,187,185].

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

Una vez que la célula ha llevado a cabo la función fisiológica que requería los incrementos de Ca^{2+} , la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ debe retornar a su estado basal, porque un exceso de Ca^{2+} en el citoplasma puede ser tóxico

para la célula y activar mecanismos que conducen a la apoptosis y muerte celular. Los mecanismos que disminuyen la $[Ca^{2+}]_c$ se pueden englobar en dos grandes grupos, aquellos que retornan el Ca^{2+} a los depósitos intracelulares y aquellos que lo expulsan al exterior. Todo transporte de Ca^{2+} citoplasmático requiere del uso de bombas e intercambiadores [68].

• **Bomba ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarco/endoplásmico (SERCA).** La proteína SERCA, de ~100 kDa, se encuentra en las membranas de los depósitos intracelulares y se encarga de “secuestrar” el Ca^{2+} citosólico y reintroducirlo en los almacenes, en un proceso en contra de gradiente y que consume ATP. Está codificada por tres genes diferentes, generando mediante *splicing* alternativo una gran cantidad de isoformas, englobando cada isoforma distintos subtipos [392]. La estructura de SERCA es bastante compleja, consistente en 3 dominios citoplasmáticos (A, ejecutor, que será donde se una el Ca^{2+} ; N, el sitio de unión con los nucleótidos (ATP); y P, el sitio de fosforilación, en los residuos Asp351 y Asp703), 10 dominios de hélices transmembrana, y pequeños dominios luminales en forma de lazo. Su funcionamiento, en cambio, es sencillo: cuando SERCA une 2 iones de Ca^{2+} en su lado citosólico, se produce un cambio estructural que permite que el ATP done un fósforo al residuo Asp351, lo que induce el cambio conformacional de SERCA, quedando el dominio A en el lumen del depósito de Ca^{2+} , y perdiendo los sitios de unión a Ca^{2+} su afinidad por éste, liberándolo. La disociación de los iones de Ca^{2+} provocan la hidrólisis del fósforo en el residuo de aspartato, produciéndose un nuevo cambio en la estructura de la proteína, y el dominio A vuelve a situarse en el citoplasma [393].

SERCA está regulada por una proteína de membrana, fosfolamban, que inhibe su actividad reduciendo su afinidad por Ca^{2+} [394]. Fosfolamban es inhibida por PKA o proteína cinasas dependientes de Ca^{2+} y calmodulina [182]. Además SERCA puede estar regulada por una pequeña proteína, regulada a su vez por una GTPasa, denominada Rap-1b, que, cuando se activa por un incremento en la $[Ca^{2+}]_c$, se une a SERCA3b inhibiéndola, favoreciendo el aumento de Ca^{2+} en el citoplasma tras el estímulo. Cuando Rap-1b es fosforilada por la GTPasa, se desacopla de SERCA3b que incrementa su actividad secuestradora de Ca^{2+} [395]. Por último, SERCA puede ser inhibida por agentes farmacológicos como, la tapsigargina (TG) - que bloquea SERCA en el estado conformacional E2, en el cuál el sitio de unión a Ca^{2+} se encuentra situado en el lumen del RE [396,397] - el ácido ciclopiazónico y la 2,5-di(ter-butil)-1,4,-hidroquinona (TBHQ) [398].

• **Bomba ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA).** La PMCA utiliza la energía procedente de la hidrólisis de ATP para transportar Ca^{2+} contra el enorme gradiente electroquímico que existe en la

membrana plasmática [399]. Con una estructura y un modo de acción similar a SERCA, la PMCA posee 10 dominios transmembrana y los extremos N y C situados en el citoplasma. En el extremo C, existe una larga cola de aminoácidos (entre 70 y 200 aa), con diferentes dominios, tanto de unión a moléculas como de fosforilación, por los cuales la PMCA es regulada. Entre estos reguladores se incluyen calmodulina, fosfolípidos acídicos y proteína cinasas como la PKA y la PKC [400].

- **Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX).** Se encuentra en la membrana plasmática y utiliza la energía almacenada en forma de gradiente electroquímico de Na^+ para extraer 1 ión de Ca^{2+} por cada 3 de Na^+ del medio extracelular. El NCX (~108 kDa), está formado por un péptido inicial (M0), seguido de 5 regiones transmembrana (M1-M5), un bucle intracelular muy grande, donde se encuentran 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 situado en el citoplasma. El NCX está regulado por proteína cinasas de las familias de la PKA y la PKC [177]. Por último, el NCX puede actuar de manera inversa, introduciendo Ca^{2+} al interior de la célula, como sucede con el potencial de acción cardiaco, durante el cual se produce un incremento transitorio en la concentración de Na^{2+} cercana a la membrana plasmática, haciendo que el NCX expulse Na^+ y reintroduzca Ca^{2+} [177].

1.4.3. Finalización de la señal de Ca^{2+}

Para el buen funcionamiento celular, después de un estímulo con la consiguiente movilización de Ca^{2+} y la respuesta, es necesario que la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ disminuya (20 nM), que los reservorios de Ca^{2+} se rellenen para poder responder al próximo estímulo, y que el exceso de Ca^{2+} sea expulsado al medio extracelular. Pero además de la puesta en marcha de esta maquinaria, que reducirá la concentración de Ca^{2+} , es necesario que se interrumpa la señal que ha producido el vaciamiento de los depósitos y la apertura de los canales.

El IP_3 ha de ser metabolizado, y para ello la célula usa dos vías, defosforilación a IP_2 por una enzima 5-fosfatasa, o fosforilación por una enzima 3-cinasa transformándose en IP_4 . El DAG es inactivado rápidamente mediante fosforilación por la DAG-cinasa, que lo transformará en ácido fosfatídico (PA), un precursor de la biosíntesis de los fosfolípidos implicado en los mecanismos SNARE de la secreción plaquetaria.

Tras la activación de la célula por un agonista y el incremento de la $[Ca^{2+}]_c$, se inhibe la AC, con la consecuente disminución de AMPc [401]. Al finalizar el estímulo y la señal de Ca^{2+} , la AC comienza a sintetizar AMPc rápidamente, se activa la PKA que inhibirá a la PLC, la PLA_2 y la polimerización de actina [195]. De manera conjunta, comienza la síntesis de GMPc por NO, que activará la PKG y trabajando de forma sinérgica junto a PKA, regularán la función plaquetaria [402]. Finalmente, la expresión de la enzima CD39 en las células del endotelio vascular degradará ATP y ADP reduciendo la activación plaquetaria [175,403].

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

La homeostasis del Ca^{2+} en las plaquetas es similar a la de otros tipos celulares, con algunas peculiaridades derivadas de las características propias de las plaquetas. Las plaquetas humanas poseen varios compartimentos intracelulares que almacenan Ca^{2+} , fundamentalmente el STD, que hace las veces de RE, y varias organelas. El STD es el mejor estudiado y funciona como el reservorio de Ca^{2+} principal en las mayorías de las células [404]. Además del STD, las plaquetas presentan varias organelas que almacenan y liberan Ca^{2+} tras su activación por un agonista, los lisosomas y los gránulos de secreción. Estos reservorios son conocidos como depósitos ácidos de Ca^{2+} . El Ca^{2+} es introducido en estos depósitos por un gradiente de protones (H^+), que es generado por la bomba de H^+ vacuolar ($H^+ATPasa$) [405-407]. Finalmente, aunque existen numerosos estudios que demuestran la importancia de las mitocondrias en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en diferentes tipos celulares [408-409], su papel en la homeostasis del Ca^{2+} en plaquetas no está definitivamente establecido, y no parecen tener una función relevante en la ECC en plaquetas [410], posiblemente debido a su escaso número, unas 7 mitocondrias por plaqueta.

Los dos reservorios principales de Ca^{2+} en plaquetas, el STD y los depósitos ácidos, son vaciados mediante la activación por los agonistas de sus receptores en la membrana plasmática. Estos reservorios presentan distinta sensibilidad al vaciamiento estimulado por agonistas, de tal manera que el vaciamiento del STD está principalmente mediado por la activación de GPCRs, 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 estos gránulos, TPC [320,321]. También se ha observado diferente sensibilidad cuando se trata de diferentes receptores para un mismo agonista: la trombina, al activar los receptores PAR-1 y PAR-4, libera Ca^{2+} del STD y ejerce alguna acción, aunque pequeña, sobre los almacenes ácidos, mientras que cuando activa el dominio de alta afinidad para la trombina del complejo GPIb/IX/V, actúa solo sobre los gránulos ácidos [411].

La entrada de Ca^{2+} en plaquetas en respuesta a agonistas no depende únicamente del vaciamiento de los depósitos. Se ha demostrado recientemente que el vaciamiento de los almacenes de Ca^{2+} por sí sólo, en un medio libre de Ca^{2+} , no produce agregación; sin embargo, este mismo vaciamiento en un medio con Ca^{2+} , induce agregación plaquetaria, lo que pone de manifiesto que no es el vaciamiento de los depósitos lo que conduce a la agregación, sino que se alcance una $[\text{Ca}^{2+}]_c$ determinada [411].

Para alcanzar la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ necesaria para la activación de la agregación, las plaquetas cuentan con distintos mecanismos que permiten la entrada de Ca^{2+} en la célula, los canales ROC, SMOC y SOC; hasta el momento, no se han descrito canales activados por voltaje en plaquetas humanas. El canal ROC mejor estudiado en plaquetas es el receptor purinérgico de tipo P2X_1 , activado por ATP, y que permite la entrada de Ca^{2+} y Na^+ [45]. La activación de canales de Ca^{2+} por segundos mensajeros, SMOC, también es bien conocida en las plaquetas, por ejemplo, el DAG, producto de la hidrólisis del PIP_2 , parece activar canales TRPs en la membrana, en concreto TRPC3 y TRPC6, e interactuar para formar el complejo CalDAG-GEF/RasGRP.

Sin embargo, el mecanismo de entrada de Ca^{2+} más importante en las plaquetas es la ECC y sus canales SOC. Este mecanismo, similar al del resto de las células, requiere de la participación de STIM1 - el sensor de Ca^{2+} en el RE y del que recientemente se ha descrito que actúa también como sensor de Ca^{2+} en los gránulos acídicos [412] - los canales SOC, las proteínas Orai y distintos miembros de la familia TRPC, los receptores de IP_3 , y la bomba ATPasa de Ca^{2+} SERCA [384,413,414].

Al igual que en otros tipos celulares, todo este mecanismo está soportado por el citoesqueleto [357,415,416], y se realiza en lugares específicos de la membrana que poseen un contenido en colesterol muy alto, conocidos como balsas lipídicas, que favorecen la interacción entre proteínas. En plaquetas humanas, a diferencia de otros modelos celulares, no ha sido descrita la activación de la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} , CICR, mediada por los receptores de rianodina, hasta hoy no identificados en plaquetas; sin embargo incrementos en la concentración de Ca^{2+} localizados en las cercanías de los IP_3R , pueden activar su apertura [317]. Finalmente, el Ca^{2+} también puede escapar de los reservorios a través de los translocones, proteínas de membrana que participan en el transporte de polipéptidos.

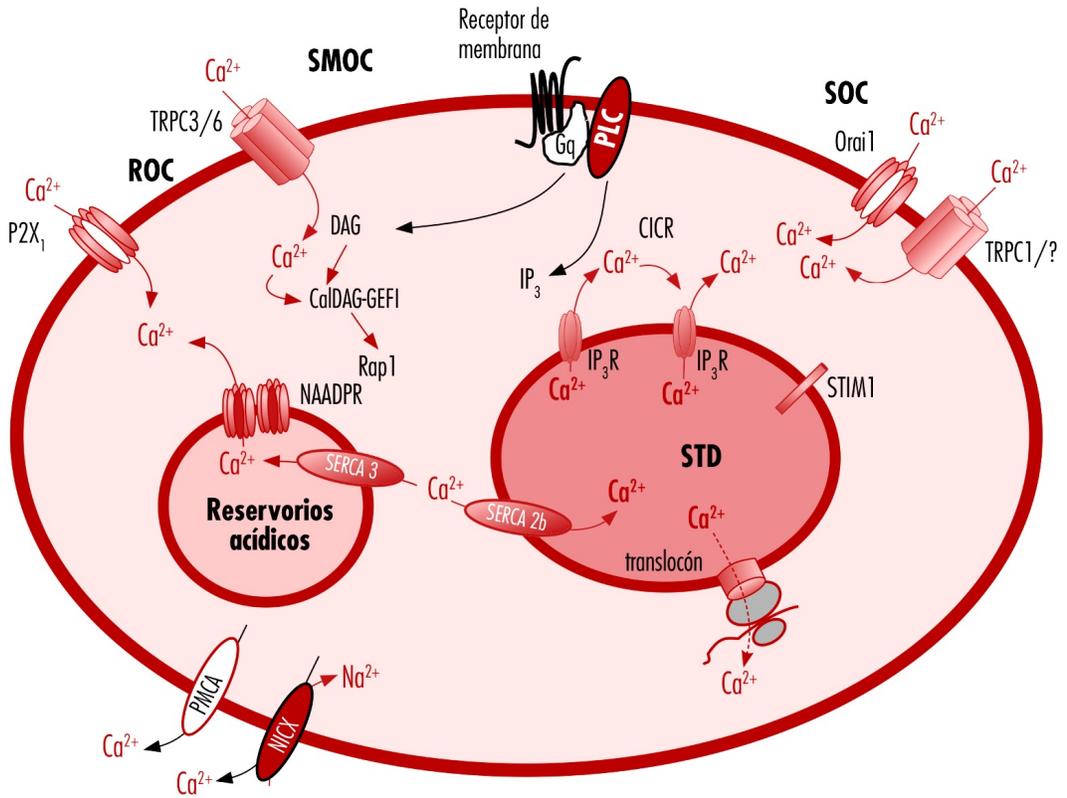


Figura 8. Mecanismos reguladores de la homeostasis del $[Ca^{2+}]_c$ en plaquetas humanas.

En resumen, la entrada de Ca^{2+} en plaquetas humanas se puede producir por los canales ROC, como $P2X_1$ activado por ATP, por los canales SMOC, activados por segundos mensajeros como el DAG, que activa la entrada por TRPC3/TRPC6, y, finalmente, por los canales SOC, donde STIM1 interacciona con los canales de membrana Orai1 y TRPC1 permitiendo el paso de Ca^{2+} . La maquinaria enzimática necesaria para la reducción de la $[Ca^{2+}]_c$ comprende las bombas ATPasas del RE, SERCA2b, y de los gránulos ácidos, SERCA3, que reintroducirán el Ca^{2+} dentro de los depósitos, y la PMCA en la membrana plasmática, que expulsa el Ca^{2+} al exterior. Además, el NCX colabora en la expulsión del Ca^{2+} al exterior celular, intercambiando Ca^{2+} por Na^+ . **Fig.8.**

Por otra parte, siendo el incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ crítico para la activación plaquetaria, la intensidad de la agregación desencadenada por la entrada de Ca^{2+} varía en función del agonista que estimule la plaqueta. El efecto de la entrada de Ca^{2+} sobre la agregación inducida por trombina, supone un 10-20 % del total de la respuesta. Sin embargo, con otros agonistas como el ADP, el efecto de la entrada de

Ca^{2+} sobre la agregación es mucho mayor, y la reducción de la entrada de Ca^{2+} inhibe la agregación de forma prácticamente completa. Así, el bloqueo de la interacción entre STIM1 y los canales SOC, inhibe completamente la agregación inducida por ADP y reduce la inducida por trombina [417]. Estas observaciones ponen de manifiesto el importante papel funcional de la ECC en plaquetas humanas.

En conclusión, en las últimas décadas se han realizado significativos progresos en el conocimiento de la homeostasis del Ca^{2+} en plaquetas en general y de los mecanismos de entrada del Ca^{2+} en plaquetas en particular, especialmente en lo relativo al papel clave de STIM1 y Orai1 en la ECC. Sin embargo, muchas cuestiones permanecen abiertas, como determinar los mecanismos que están implicados en la regulación de la activación de STIM1 en plaquetas humanas, analizar el papel de Homer en la formación de complejos STIM1-Orai1 y de complejos IP_3R tipo II -TRPC1, así como en la agregación y secreción plaquetarias, estudiar el papel de la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos densos en la secreción de los gránulos α , o caracterizar la secuencia de la secreción de gránulos α y densos tras la estimulación de la plaqueta por sus agonistas. La respuesta a éstas y otras cuestiones ayudará a comprender la función plaquetaria en su complejidad.

2. Objetivos

- Comprobar si el vaciamiento de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} ocasiona la fosforilación de STIM1 en residuos de tirosina en plaquetas humanas, y su papel en la activación de la entrada capacitativa de Ca^{2+} .
- Caracterizar el papel de las proteínas adaptadoras de la familia Homer en la entrada capacitativa de Ca^{2+} y la asociación de los elementos capacitativos en las plaquetas humanas.
- Analizar si los incrementos en la concentración de Ca^{2+} citosólica mediados por la liberación de Ca^{2+} desde depósitos acídicos o el sistema tubular denso, o por la entrada de Ca^{2+} , son necesarios para la secreción de gránulos α y densos en las plaquetas humanas.

3. Material y métodos

3.1. Reactivos.

- 1-oleoil-2-acetil-sn-glicerol (OAG) - Calbiochem (Madrid, España).
- 2,5-di-(tert-butil)-1,4-hidroquinona (TBHQ) - Axxora (Nottingham, UK).
- Ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-etan-sulfónico (HEPES) - Sigma (Madrid, España).
- Ácido etilén-glicol-tetraacético (EGTA) - Sigma (Madrid, España).
- Adenosina difosfato (ADP) - Sigma (Madrid, España).
- Albúmina de suero bovino (BSA) - Sigma (Madrid, España).
- Anticuerpo anti-CD41-a PerCP (clona HIP8) - Becton Dickinson Biosciences (CA, USA).
- Anticuerpo anti-CD62P - Becton Dickinson Biosciences (CA, USA).
- Anticuerpo antiinmunoglobulina G de burro conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) - Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).
- Anticuerpo antiinmunoglobulina G de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) - Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).
- Anticuerpo antiinmunoglobulina G de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) - Amersham Biosciences (Arlington Heights, IL, USA).
- Anticuerpo antiinmunoglobulina G de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) - GE Healthcare (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK).
- Anticuerpo anti-Btk (N-20) - Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).
- Anticuerpo anti-c-Src - Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).
- Anticuerpo anti-fosfotirosina (Clon 4G10) - Millipore (California, USA)
- Anticuerpo anti-Homer1 - Sigma (Madrid, España).
- Anticuerpo anti- IP₃RII tipo II C terminal (C-20) -Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).
- Anticuerpo anti-Orai (C terminal) - Sigma (Madrid, España).
- Anticuerpo anti-STIM1 - BD Transduction Laboratories (Madrid, Spain).
- Anticuerpo policlonal anti-hTRPC1 - Alomone Laboratories (Jerusalem, Israel).

- Anticuerpo anti -TRPC1 -Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).
- Apirasa (grado VII) - Sigma (Madrid, España).
- Aspirina - Sigma (Madrid, España).
- Bafilomycin A1 - Sigma (Madrid, España).
- Bosutinib (SKI-606) - LC Laboratories (Woburn, Massachusetts, USA).
- Calceina acetilmetil éster (AM) - Molecular Probes (Leiden, Holanda).
- Citrato sódico - Sigma (Madrid, España).
- D- glucosa - Sigma (Madrid, España).
- Dietilestilbestrol (DES) - Sigma (Madrid, España).
- Dimetil BAPTA-AM (1,2-bis [o-aminofenoxi] etano-N,N,N',N'-ácido tetraacético) - Molecular Probes (Leiden, Holanda).
- Dimetil sulfóxido (DMSO) - Sigma (Madrid, España).
- Ditioneitol (DTT) - Sigma (Madrid, España).
- Dodecilsulfato sódico (SDS) - Sigma (Madrid, España).
- Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) - Sigma (Madrid, España).
- Fura-2-acetilmetil éster (Fura-2/AM) - Molecular Probes (Leiden, Holanda).
- Hiperfilms de revelado quimioluminiscente (ECL) - GE Healthcare (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK).
- Inhibidor de proteasas - Roche
- Ionomicina - Calbiochem (Madrid, España).
- LFM-A13 - Toscris Bioscience (Bristol, UK).
- Mepacrine®- Sigma (Madrid, España).
- Na₃VO₄

- Péptido sintético anti- IP₃RII N terminal ELNPDYRDAQNEGKTVRD (péptido correspondiente a los aa 317-334 de IP₃BD [dominio de unión a IP₃] del IP₃RII [péptido IP₃RII C]) - Affinity Bioreagents (CO, USA).
- Péptido PPKKRR - Immunostep (Salamanca, España).
- Péptido PPKKFR - Immunostep (Salamanca, España).
- Paraformaldehído - Sigma (Madrid, España).
- Proteína agarosa A - Upstate Biotechnology Inc. (Madrid, España) y Millipore (California, USA).
- Reactivos de revelado quimioluminiscente (ECL) - Pierce (Cheshire, UK).
- Tapsigargina (TG) - Sigma (Madrid, España).
- Trombina - Sigma (Madrid, España).

El resto de reactivos utilizados, de grado analítico, fueron suministrados por Panreac (España).

3.2. Preparación de las plaquetas.

3.2.1. Selección de los individuos susceptibles de investigación

Las muestras de sangre se obtuvieron de voluntarios sanos mediante punción venosa humeral en la Clínica Juan Manuel Hernández Cruz (San Antón 10, Cáceres), o bien de concentrados de plaquetas procedentes de donantes de sangre, cedidas para la investigación por el servicio de Hematología del Hospital San Pedro de Alcántara (Avenida Pablo Naranjo s/n, Cáceres), de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki, y los Comités de Bioética del Hospital San Pedro de Alcántara y de la Universidad de Extremadura.

3.2.2. Preparación de la suspensión de plaquetas

La sangre obtenida mediante punción venosa fue mezclada cuidadosamente con una solución de dextrosa citrato ácida (ACD), cuya composición se detalla en el Anexo (Tabla 6), en una proporción de 1 a 6 en relación al volumen de sangre extraído, para evitar de esta forma la activación plaquetaria y la

coagulación de la sangre. A continuación las muestras se centrifugaron a 700 *g* durante 5 minutos a 20°C para obtener plasma rico en plaquetas (PRP).

Al PRP se le añadió aspirina (100 µM), para inhibir la COX-I plaquetaria, evitar la liberación de PG e impedir la agregación plaquetaria espontánea, y apirasa (40 µg/mL), que actúa defosforilando el ADP y el ATP a través de su actividad di/trifosfatasa, e impide la activación plaquetaria mediada por estos agonistas. El PRP, tras cinco minutos de reposo, y los concentrados de plaquetas, se centrifugaron 350 *g* durante 20 minutos a 20 °C, obteniéndose un *pellet* de color blanco, las plaquetas, y un sobrenadante, el plasma pobre en plaquetas (PPP), desechado. Tras retirar el PPP, las plaquetas se resuspendieron en un medio tampón HEPES salino (HBS), cuya composición se muestra en el Anexo (Tabla 7). Esta suspensión de plaquetas se mantuvo 15 minutos en reposo antes de comenzar los experimentos.

3.3. Métodos de medición de la viabilidad celular

La viabilidad celular se comprobó mediante dos técnicas, azul de tripán y calceína, obteniéndose un 95% de supervivencia plaquetaria, lo que demuestra que este método de aislamiento de las plaquetas es adecuado para la obtención de plaquetas viables.

3.3.1. Tinción con Azul de Tripán

Esta tinción se basa en la capacidad que tienen las células de expulsar del interior de su citoplasma el colorante Azul de Tripán [418]. Las células incubadas con Azul de Tripán se observan al microscopio óptico (x40), y se hace el recuento de las células vivas, que permanecen con el citoplasma transparente, y las células muertas, cuyo citoplasma se tiñe de azul. Luego se calcula el porcentaje de viables y no viables frente al total de las células.

3.3.2. Calceína

La calceína-AM es una sonda no fluorescente que entra dentro de la célula, donde es escindida por esterasas transformándose en calceína, que emite en la longitud de onda del verde (535 nm). Esta emisión se recoge en un espectrofluorímetro en unidades arbitrarias. Cuando la célula está muerta, la sonda no es escindida, y no se emite ninguna señal. Las células del PRP se incubaron con 5 µM de

calceína-AM durante 30 minutos a 37° C, se centrifugaron y se resuspendieron en tampón HBS. La fluorescencia fue registrada mediante un espectrofotómetro Cary Eclipse (Varian Ltd., Madrid, España) a partir de alícuotas de 2 mL. Las muestras se excitaron a 494 nm y la emisión fue recogida a 535 nm.

3.4. Técnica para la determinación de la $[Ca^{2+}]_c$. Fluorimetría

3.4.1. Fura-2/AM

El fura-2/AM es un fluoróforo de Ca^{2+} permeable a la membrana plasmática que, una vez se introduce en el interior celular, sufre la acción de esterasas citosólicas que liberan fura-2, el cual no es capaz de atravesar la membrana. Este fluoróforo presenta una K_d para el Ca^{2+} de 120-250 nM, en función de la temperatura, lo que permite determinar concentraciones de Ca^{2+} de rango nanomolar [419]. La ventaja de esta sonda con respecto a otras en el estudio de los movimientos de Ca^{2+} , se debe a su carácter ratiométrico, esto es, 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 $[Ca^{2+}]_c$, evitando errores derivados de una distribución no homogénea en el citosol celular, carga deficiente del marcador u otros posibles artefactos originados durante la manipulación experimental [420]. Otra cualidad importante de esta sonda es que presenta el punto isobéptico (punto de isofluorescencia) a 360 nm, lo que resulta útil a la hora de monitorizar los cambios en la fluorescencia no dependiente de Ca^{2+} o para apreciar el apagamiento de la fluorescencia cuando la molécula se une a algunos metales pesados, como el Mn^{2+} [421].

3.4.2. Carga del indicador

La suspensión de plaquetas se incubó en presencia de fura-2/AM a una concentración de 2 μ M durante 45 min, a 37°C y en oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación las células se centrifugaron a 350 g, durante 20 minutos a 20°C, y después el sobrenadante, con el fura-2 AM sobrante no introducido en las células, fue desechado. Las plaquetas obtenidas se resuspendieron en HBS al que se añadió glucosa (1,80 mg/mL) y BSA (1 mg/mL) el mismo día del experimento. A la suspensión de plaquetas se añadió 40 μ g/mL de apirasa, obteniéndose así una suspensión de plaquetas lista para su estudio.

3.4.3. Determinación de la $[Ca^{2+}]_c$ mediante métodos fluorimétricos

Los movimientos de Ca^{2+} en las plaquetas se registraron usando un espectrofotómetro Cary Eclipse (Varian Ltd., Madrid, Spain). Alícuotas de 1 mL de la suspensión de plaquetas descrita previamente se depositaron en las cubetas de cuarzo del sistema, provisto de un dispositivo de microagitación y termostatación para mantener las células en suspensión y atemperadas a 37°C. Todos los agentes aplicados durante la realización de los experimentos se añadieron directamente en la cubeta del espectrofluorímetro, en función del volumen de la suspensión celular, para poder obtener la concentración final deseada. Las variaciones en la $[Ca^{2+}]_c$ se monitorizaron y 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 [419], según la siguiente fórmula:

$$[Ca^{2+}]_c = Kd + [(R - Rmin) / (Rmax - R)] + (Sf/Sb)$$

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

R = ratio de la muestra.

$Rmin$ = ratio mínimo.

$Rmax$ = ratio máximo.

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

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

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

Para estimar la liberación de Ca^{2+} en plaquetas se utilizaron diferentes inductores: TG, sola o asociada al ionóforo de Ca^{2+} ionomicina, TBHQ, o trombina. La liberación de Ca^{2+} inducida por TG (10 nM, 200 nM y 1 μ M), TG (1 μ M) + Ionomicina (50 nM), TBHQ (20 μ M), o trombina (1 U/mL), se determino analizando el área bajo la curva del incremento de la $[Ca^{2+}]_c$, durante los 3 minutos posteriores a la adición del estímulo, en un medio libre de Ca^{2+} , corregida 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 [331].

La entrada de Ca^{2+} que se produce tras la adición de 300 μM o 1 mM de CaCl_2 , se calculó también como el área bajo la curva del incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ durante los 3 minutos siguientes de la misma, corregida con la resta del promedio de la concentración de Ca^{2+} post-estímulo [422]. Los movimientos de Ca^{2+} inducidos por OAG (un análogo del DAG), fueron calculados mediante el mismo método, en un medio con 1 mM CaCl_2 [423].

3.4.5. Determinación de la entrada de manganeso (Mn^{2+})

El Mn^{2+} , que compite con el Ca^{2+} para entrar en las células a través de los canales ROC, se utiliza habitualmente para monitorizar la entrada de cationes divalentes, dada su capacidad para fijarse a la sonda fura-2/AM, cuyo punto isobéptico a 360 nm permite apreciar la pérdida de fluorescencia cuando se une a cationes diferentes al Ca^{2+} . Los movimientos del Mn^{2+} en las plaquetas se registraron en un espectrofotómetro Cary Eclipse, utilizando alícuotas de 1 mL de la suspensión de plaquetas (2×10^8 células/mL) a 37°C y en agitación. La entrada de Mn^{2+} se calculó mediante la integral del cambio de fluorescencia a 360 nm en 2.5 minutos, tomando una muestra por segundo después de la estimulación con TG, y el cálculo se corrigió mediante la sustracción del cambio de fluorescencia observado antes de añadir TG.

3.4.6. Determinación de la movilización del Ca^{2+} intracelular. *Stopped-flow*

La cinética de los cambios de fluorescencia de las plaquetas cargadas con fura-2 se investigó en un fluorímetro *stopped-flow*. El sistema *stopped-flow* es un espectrómetro con un sistema óptico especialmente diseñado para la medida de cinéticas rápidas. Emplea una lámpara de Xe o Xe(Hg) de 150 W unida a un monocromador manual en un módulo óptico. La conexión con el instrumento de *stopped-flow* se realiza mediante fibras ópticas especialmente diseñadas para las medidas de las cubetas del sistema. La señal se detecta mediante un fotomultiplicador montado directamente sobre el *stopped-flow* y conectado a su unidad de control. El fotomultiplicador puede ubicarse tanto a 90° como a 180°, en relación con la radiación incidente, para permitir tanto medidas de absorbancia como de fluorescencia, o ambas a la vez si se emplea un segundo detector opcional. Para las medidas de fluorescencia se pueden emplear filtros estándar delante del fotomultiplicador.

Para medir la movilización de cationes en el interior celular, las plaquetas se incubaron a 37°C durante 45 minutos con fura-2/AM, y los cambios en su fluorescencia se registraron usando un fluorómetro Hi-Tech Scientific SF-61SX2 Single-Mixing Stopped-Flow System (Hi-Tech Ltd., Salisbury, Wilts., UK), con

una excitación de 340 y 360 nm, y una emisión de 500 nm, dependiendo si se determinaba la movilización de Ca^{2+} o Mn^{2+} , respectivamente. En el módulo de manipulación se cargaron las jeringas, una con la suspensión celular (100 ml) y la otra con TG. Para la determinación del tiempo de inicio de la ECC, se empleó Mn^{2+} como sustituto del Ca^{2+} , ya que posee propiedades fisiológicas similares al Ca^{2+} , pero además posee la ventaja de disminuir o apagar la fluorescencia del fura-2/AM a la longitud de onda isosbética de 360 nm, evitando la posible interferencia en la fluorescencia que provoca la salida de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares.

3.5. Técnica para el aislamiento y cuantificación de proteínas.

3.5.1. Obtención de lisados celulares

Las plaquetas resuspendidas en HBS con apirasa, se distribuyeron en alícuotas de 500 μL a una concentración de 4×10^8 plaquetas/mL y se dejaron reposar durante 30-60 minutos para obtener plaquetas no activadas, evitando la posible, aunque mínima, activación inducida por la centrifugación celular. A continuación las plaquetas fueron tratadas a 37°C , bien con agonistas, tanto fisiológicos como farmacológicos, bien con activadores o inhibidores de los distintos procesos a estudiar. Para la fijación celular se añadieron 500 μL de la solución de Laemmli (LB)-2x, cuya composición se explica en el anexo (Tabla 8), enriquecida con ditioneitol (DTT) al 5%, para obtener una concentración final de plaquetas de 2×10^8 plaquetas/mL. Tras una pequeña agitación para homogeneizarlas, las muestras se calentaron en un termobloque a 70°C durante 10 min y se centrifugaron a 9.300 g durante 1 minuto, para que todos los restos celulares se depositaran en el fondo y no ensuciaran la muestra; finalmente, las muestras se cargaron en un gel de electroforesis.

3.5.2. Tratamiento y fijación de las muestras mediante la técnica *Quench flow*

Para el estudio del patrón temporal de activación de STIM1, el tratamiento y fijación de las muestras se realizó mediante la técnica *Quench flow*, una técnica empleada para estudiar reacciones rápidas.

El estudio se realizó en un Hi-Tech Scientific RQF-63, Dimension D1 Rapid Quench Flow System (Hi-Tech Ltd., Salisbury, Wilts., UK). Este instrumento cuenta con una unidad electrónica de control que permite fijar el volumen suministrado, el caudal y el tiempo de fijación de las muestras de 5 milisegundos a 100 segundos. La unidad de manejo contiene una serie de circuitos que permite la mezcla de las soluciones, todo atemperado gracias a un termostato de flujo. Esta unidad de manejo

consta de 3 jeringas interconectadas, de las que la primera contiene la solución de células (*Reagent A*), la central la solución de parada (*Quench Solution*), y la última, posicionada a la izquierda, el agonista (*Reagent B*). En las jeringas A y B las soluciones se cargan al doble de concentración, mientras que en la solución de *Quench* debe ser el triple, de modo que cuando se produzca la mezcla de las tres obtengamos una solución con la concentración final de células y agonista deseada. Para la realización de los disparos, los circuitos se cargan con las soluciones de las jeringas y se acciona un motor que en dos pulsos va a mezclar, primero las células con el agonista y, tras el retraso fijado en el módulo electrónico y predeterminado por el investigador según requiera el experimento, la solución de células estimuladas con la solución de parada, consiguiendo así la fijación de las muestras.

En el estudio del patrón temporal de STIM1 se empleó como *Reagent A* la suspensión de plaquetas, preparada tal y como se indica en el apartado 2.2, bajo tres condiciones diferentes: con el Ca^{2+} extracelular quelado, añadiendo 100 μM de EGTA; con el Ca^{2+} extracelular y el Ca^{2+} intracelular quelados, mediante células cargadas con dimetil-BAPTA (tras incubación durante 30 min con 10 μM de dimetil-BAPTA) en HBS, y en presencia de 100 μM de EGTA; y en medio rico en Ca^{2+} , añadiendo 500 μM de CaCl_2 . Como *Quench Solution* se utilizó una solución con detergente RIPA, cuya composición se especifica en el anexo (Tabla 9), y que contiene: RIPA (3x) + Inhibidor de fosfatasa (30 $\mu\text{l/ml}$) + Na_3VO_4 (30 $\mu\text{l/ml}$). Y, como *Reagent B*, TG (400 nM), de modo que al producirse la mezcla se alcanzó una concentración final de TG de 200 nM. Las muestras fijadas se mantuvieron en hielo 10 minutos y a continuación se determinó la concentración de STIM1 mediante una variación de la técnica clásica de inmunoprecipitación, que se describe en el apartado 5.2.1.

3.5.3. Inmunoprecipitación

Es una técnica con la que se puede aislar una proteína determinada de un lisado celular usando un anticuerpo que se une de forma específica a la proteína diana.

Las células de nuestra solución [2×10^9 plaquetas/mL] se lisaron usando el detergente RIPA en una proporción 1:1 (500 μL Plaquetas: 500 μL RIPA 2x [para una concentración final de RIPA de 1x, y de plaquetas 1×10^9 plaquetas/mL]), se mantuvieron 10 minutos en hielo, para evitar proteólisis, defosforilación y desnaturalización de las proteínas (estos procesos comienzan inmediatamente después del lisado, y mantener la suspensión celular a 4°C, junto con la adición de inhibidores específicos, hace que se detengan, o al menos que se ralenticen, estas reacciones).

A continuación las muestras se centrifugaron a 16.100 *g*, a 4°C durante 15 minutos, para eliminar restos celulares no deseados, como el citoesqueleto. Tras retirar el sobrenadante, las muestras se incubaron durante toda la noche 4°C, en un rotor con agitación constante, 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] de la cadena pesada de las Igs). De esta forma el anticuerpo se une a la proteína y a la bola de agarosa.

Pasado el periodo de incubación, las muestras se centrifugaron durante un 1 minuto a 9.300 *g* a 4 °C, y el sobrenadante se desechó (las bolas de agarosa se depositan en el fondo con el anticuerpo y la proteína unidos). Después se lavaron con tampón salino fosfato (PBS) (cuya composición se detalla en el anexo, Tabla 10), se agitaron y de nuevo se centrifugaron. Este proceso se repitió 2 veces. En el último centrifugado, el sobrenadante se retiró sin añadir PBS, para que, al volver a centrifugar, la bolas se quedaran empaquetadas en el fondo. Los restos de sobrenadante se retiraron por aspiración, y se añadió LB para su posterior resolución en un gel SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate – PoliAcrylamide Gel Electrophoresis*).

3.5.3.1. Protocolo de inmunoprecipitación de STIM1 de la membrana plasmática

Como se ha descrito previamente, la proteína STIM1 está localizada tanto en el RE como en la membrana plasmática. Para aislar la porción de STIM1 situada en la membrana plasmática, se realizó una variación al clásico protocolo de inmunoprecipitación.

Las muestras fueron alicuotadas en 500 μ L, estimuladas y fijadas a sus respectivos tiempos (0, 0.8, 3, 10, 30 y 60 segundos) con paraformaldehído (1,5% en PBS) y colocadas en hielo durante 10 minutos. Pasado este tiempo, las muestras se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en medio HBS, donde se incubaron durante 2 horas con el anticuerpo anti-STIM1 (25–139), que reconoce la región N terminal de la proteína situada en el exterior de la membrana plasmática. Transcurridas 2 horas, las muestras se lavaron dos veces con PBS, para retirar el exceso de anticuerpo no unido a proteínas, se lisaron con RIPA (1 \times), se mantuvieron 10 minutos en hielo y se centrifugaron a 16.100 *g* a 4°C durante 15 minutos. El sobrenadante se depositó en tubos con 25 μ L de bolas de agarosa recubiertas por proteína A, y se dejaron en el rotor a 4°C durante toda la noche. El resto del proceso es igual al descrito anteriormente, las muestras se lavaron, se resuspendieron en tampón de carga y se separaron en un gel de acrilamida para su posterior revelado.

3.5.4. Cuantificación de la concentración de proteínas

El contenido en proteína total se determinó empleando el método de Bradford [424], una técnica colorimétrica basada en la existencia de dos formas diferentes del Coomassie Brilliant Blue G-250 (una roja y otra azul), que, en contacto con las proteínas, pasa de color rojo a azul, y este cambio puede ser detectado mediante el empleo de un espectrofotómetro.

En una microplaca se mezclaron 10 μ L de las muestras y 190 μ L del reactivo de Bradford. Tras agitación para obtener una suspensión homogénea, las muestras se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 10 minutos y la lectura de la concentración de las proteínas se llevó a cabo usando un lector de microplacas Infinite M200 (Tecan, Männedorf, Switzerland). 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.

3.5.5. Western blotting

3.5.5.1. Electroforesis

Esta técnica fue desarrollada por Burnette [425], utilizando y adaptando la tecnología de Southern para la detección de ADN, y sirve para separar y analizar proteínas, siendo una de las técnicas de biología molecular más extendidas. Su principio se fundamenta en que una proteína sometida a un campo eléctrico se moverá en función de la carga neta de la misma (Z), la fuerza del campo eléctrico al que se ve sometida (E) y la resistencia de fricción (F) (tamaño y forma de la proteína). Según esto, la velocidad de migración de las proteínas se define como $V = (E \times Z)/F$. Un factor muy importante 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, se detiene, ya que el campo eléctrico no la afecta.

Para evitar esto, se ha usado el método descrito por Laemmli [426], 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; luego, las proteínas se recubren con cargas netas negativas, permitiendo que se muevan solamente en función de

su tamaño, siendo las más pequeñas las que se desplazan más en el gel. Además, el LB es un medio reductor que hará que los anticuerpos se separen de las bolas de agarosa en la técnica de inmunoprecipitación. Para asegurar la completa desnaturalización de la proteína, las muestras se calentaron durante 10 minutos a 70° C en un termobloque, y se centrifugaron 1 minuto a 9.300 g a temperatura ambiente antes de cargar las muestras en el gel de electroforesis [427,413].

Para la separación de las proteínas en función de su tamaño se utilizó el sistema de Tampón Discontinuo, que utiliza dos tipos de geles:

- **Gel de Carga.** Asegura la migración de todas las proteínas en el frente de migración, provocándose la acumulación de todas las que se han cargado en el pocillo; tiene una concentración de acrilamida y bisacrilamida muy pequeña (4%) y el pH ligeramente más ácido que el gel separador.
- **Gel Separador.** Será el soporte donde se producirá la migración y separación de las proteínas. Está formado por una mezcla de acrilamida y bisacrilamida, que forma una matriz cuya concentración variará en función del tamaño de la proteína buscada; a mayor concentración de acrilamida/bisacrilamida el poro formado disminuye; debido a esto, una concentración alta (15%) se utilizará para separar proteínas de pequeño peso molecular, y, al contrario, para separar proteínas de gran tamaño se usarán bajas concentraciones de acrilamida y bisacrilamida (8%).

Las proteínas se sometieron a un campo eléctrico de 30 mA durante 2 horas, y para que la corriente recorriera de forma homogénea todo el gel desde un polo a otro, se usó un tampón de electroforesis, cuya composición se muestra en el anexo (Tabla 11).

3.5.5.2. Transferencia

Este proceso consiste en pasar las proteínas separadas en el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa (un soporte más manejable), donde las proteínas conservan su antigenicidad y son sensibles a sondas. Usando el sistema de transferencia semiseca y con un voltaje de 0,8 mA × cm² durante 2 horas, se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0,2 micras (GE Healthcare). El paso de la corriente se produce a través del tampón de transferencia, cuya composición se explica en detalle en el anexo (Tabla 12).

3.5.5.3. Bloqueo

Una vez transferidas las proteínas a la membrana, deben evitarse las interacciones inespecíficas que pueda ocasionar la incubación con anticuerpos. Para ello, se cubrió toda la membrana con una solución de bloqueo (su composición se muestra en el anexo, Tabla 13) que cubre las zonas conocidas como "sitios de unión inespecífica". Esta solución 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, dejando la solución 1 hora en agitación a temperatura ambiente, o dejándola una noche completa (8 horas mínimo) sin agitación y a 4°C.

3.5.5.4. Incubación con anticuerpos

La membrana se incubó con diferentes anticuerpos primarios dirigidos, de forma específica, a una secuencia concreta de la proteína diana a detectar. Dependiendo del anticuerpo, los tiempos de incubación variaron desde 1 hora hasta toda la noche. La concentración del mismo también varió en función de la especificidad del anticuerpo (según la casa comercial). Pasado el tiempo de incubación con el anticuerpo primario, éste se retiró y el exceso de anticuerpo primario no unido de forma específica a la proteína, se eliminó mediante sucesivos lavados, hasta 6 veces durante 5 minutos cada vez, con TBST, una solución salina de trizma (TBS) con detergente (Tween), cuya composición se detalla en el anexo (Tabla 14). Seguidamente se incubaron con una IgG específica del tipo animal del que se obtuvo el anticuerpo primario, que reconocerá la Fc del anticuerpo primario y se unirá a ella. El tiempo de incubación de todos los anticuerpos secundarios fue de 1 hora a temperatura ambiente, con una concentración del anticuerpo de 1:10.000. Terminada la incubación del secundario, la membrana se lavó para retirar el exceso de anticuerpo secundario que no se hubiera unido.

3.5.5.5.Revelado

Los anticuerpos secundarios están conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP), que combinado con un reactivo comercializado por Pierce (Solución ECL), genera una reacción quimioluminiscente, que se detecta por una película fotográfica con una sensibilidad muy alta. Al exponer la película fotográfica a esta reacción lumínica, se obtienen unas manchas (*blot*) que se corresponden con la proteína buscada. Estas manchas se analizaron con un densitómetro óptico (Sun Microsystem, Inc, Mountain View, CA) y el programa informático Image J (N.I.H), expresando los resultados como diferencias en los porcentajes de densidad.

3.6. Técnica para la introducción de moléculas en las células. Electroporación Reversible

La electroporación es una técnica usada para introducir ácidos nucleicos y complejos macromoleculares en una célula. Se basa en la aplicación de un campo eléctrico sobre las células, que provoca la apertura de poros transitorios en la membrana plasmática [428].

Las plaquetas se electroporaron para poder introducir un anticuerpo con el fin de bloquear la acción de la proteína diana o su interacción con otras proteínas. Una solución de plaquetas a una concentración de 4×10^8 /mL, resuspendidas en un tampón que intenta emular las condiciones del medio celular interno, el Tampón de Electroporación (cuya composición se desglosa en el anexo, Tabla 15), y a las que se añadió el anticuerpo concreto a una concentración final de 2 μ g/mL, se electroporaron en un sistema de electroporación Bio-Rad Gene Pulser Xcell Electroporation System.

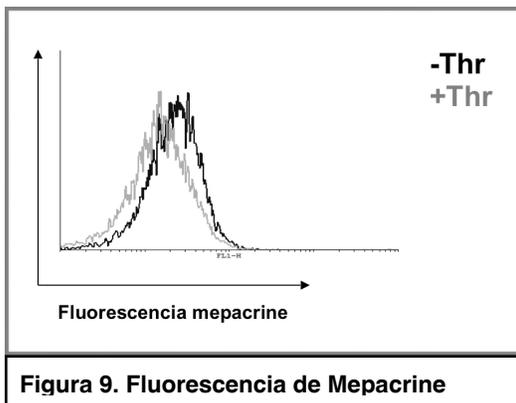
Las células resuspendidas se sometieron a 7 pulsos de milisegundos, con un voltaje de 4 kV/cm y 25 μ Faradios de capacitancia, en cubetas de electroporación (Sigma) de 4 mm (distancia entre los electrodos). Tras la electroporación, las células se incubaron durante 1 hora a 37°C (el tiempo estimado para el cierre de los poros). A continuación, el tampón de electroporación se suplementó con un nuevo tampón Post Electroporación (su composición se detalla en el anexo, Tabla 16), para alcanzar las condiciones del tampón HBS descritas anteriormente. Después, las células se centrifugaron durante 20 minutos a 350 *g* (para eliminar el exceso de anticuerpo que no hubiera entrado en la célula) y se resuspendieron en HBS suplementado con apirasa [384].

3.7. Determinación de la secreción por Citometría de flujo

La citometría de flujo es un método que permite analizar múltiples parámetros celulares, como tamaño (FSC, *Forward scattering complexity*) y complejidad (SSC, *Side scattering complexity*), y cualquier componente celular o función susceptible de ser marcado con un fluorocromo, en células o partículas suspendidas en líquido, que pasan alineadas y de una en una, por delante de un haz luminoso. Proporciona dos tipos fundamentales de información: la generada por la dispersión de la luz, y la relacionada con la emisión de luz por los fluorocromos, presentes en la célula o partícula, al ser excitados por el rayo luminoso. Las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales, que son procesadas en un ordenador.

Se utilizaron sondas de fluorescencia específicas para detectar los gránulos α y densos, y su secreción se determinó mediante el registro de los cambios de fluorescencia en plaquetas seleccionadas en un citómetro de flujo (FASCcan cytometer, Becton-Dickinson, CA). Aproximadamente 1×10^6 plaquetas lavadas, obtenidas tal y como se describe en el apartado 2.1, se suspendieron en 50 μ l HBS y se marcaron con anti-CD41, anticuerpos anti P-selectina (CD62P) y 10 μ M de la sonda de fluorescencia Mepacrine® a 37° C durante 30 minutos. Posteriormente fueron estimuladas con diferentes agonistas (0.01, 0.1 y 0.5 U/mL de trombina, 10 nM y 1 μ M de TG, 10 μ M de ADP, 1 μ M de Bafilomycin A, un inhibidor específico de la H⁺-ATPasa, y 120 μ M de TBHQ) en ausencia (100 μ M EGTA) o presencia de Ca²⁺ extracelular (CaCl 1.2 mM). La reacción se detuvo 10 min después de la estimulación de las plaquetas con PBS a 4°C, y las muestras se analizaron por FACS.

Las plaquetas se seleccionaron primero por tamaño (FSC) y complejidad (SSC) y posteriormente por la presencia de CD41 en la superficie de las células, ya que este antígeno solo se expresa en megacariocitos y plaquetas, por lo que es ampliamente utilizado como marcador específico de la línea megacariocítica [3].



La secreción de los gránulos densos se evaluó mediante el registro de la fluorescencia de mepacrine®, un fluoróforo que se incorpora a estos gránulos. La disminución de la fluorescencia con mepacrine® en plaquetas es indicativa de la secreción de los gránulos densos, y se expresa como intensidad de fluorescencia media o MFI (*mean fluorescence intensity*), que es el resultado del cálculo: MFI = fluorescencia de plaquetas marcadas con mepacrine® menos fluorescencia endógena, **Fig.9.**

La secreción de los gránulos α se detectó mediante el empleo de un anticuerpo específico anti-P-selectina (anti-CD62P-PE), que detecta únicamente la P-selectina expresada en la membrana externa

de la plaqueta. Es una medida indirecta de la secreción de los gránulos α , ya que la P-selectina se expresa en la membrana de estos gránulos en plaquetas en reposo, pero cuando se activan, los gránulos α liberan su contenido y su membrana se fusiona con la membrana externa plaquetaria, que desde ese momento expresará P-selectina, **Fig.10**.

3.8. Agregometría plaquetaria

El PRP obtenido tal y como se describe en el apartado 2.2, pero sin añadirle aspirina ni apirasa, se centrifugó a 350 *g* durante 20 minutos, eliminándose el PPP y obteniéndose alícuotas de 400 μ l de plaquetas lavadas. La agregación plaquetaria inducida por trombina, añadida en una proporción de 1 UI por cada mL de la suspensión de plaquetas, se midió en un agregómetro Chronolog (Havertown®, Pa, USA) a 37°C y en agitación a 1200 r.p.m. Se determinaron el porcentaje de agregación, estimado como la diferencia en la transmisión de la luz (transmitancia) entre la suspensión de plaquetas y medio HBS libre de plaquetas, y el *delay-time*, considerado como el tiempo requerido para alcanzar el máximo porcentaje de agregación de cada suspensión de plaquetas analizada.

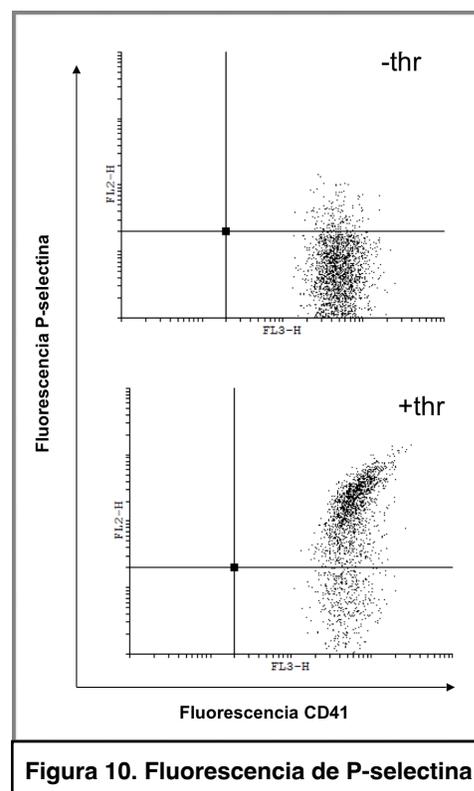


Figura 10. Fluorescencia de P-selectina

3.9. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos se utilizaron como métodos estadísticos el análisis de la varianza de una vía o ANOVA, cuando los grupos experimentales a comparar eran más de dos, o el test *t*-Student cuando la comparación era solo entre dos grupos. Los resultados obtenidos se consideraron estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$.

3.10. Anexo

Tabla 6. Solución ACD (pH: 7,46 mezclado con la sangre)

Reactivos	Concentración (mM)	Composición (g/L)
Ácido cítrico	85	12.5
Citrato sódico	78	7.5
Glucosa	111	10

Tabla 7. Tampón HEPES salino (HBS) (pH ajustado a 7.4 con NaOH 1N)

Reactivos	Concentración (mM)	Composición (g/L)
HEPES	10	2.383
Cloruro sódico	145	8.468
Cloruro potásico	5	0.374
Sulfato de magnesio	1	0.264
Glucosa	10	1.80 (mg/mL)
BSA	0.1%	1.00 (mg/mL)

Tabla 8. Solución de Laemmli

Reactivos	Concentración (mM)	Composición (g/100 mL) 4x
TRIS	280	3.40
Glicerol	40%	40 mL
Bromofenol- blue	0.008%	0.008
SDS	8%	8

Tabla 9. Tampón RIPA (2x) (pH 7.2)

Reactivos	Concentración (mM)	Composición (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 10. Tampón PBS (pH 7.2)

Reactivos	Concentración (mM)	Composición (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		1L

Tabla 11. Tampón de electroforesis

Reactivos	Concentración (mM)	Composición (g/L) 5x
TRIS	124	15
Glicina	126	77
SDS	0.5%	5

Tabla 12. Tampón de transferencia

Reactivos	Concentración (mM)	Composición (g/L)
TRIS	25	3.03
Glicina	150	8.5
MeOH	20 %	200 mL

Tabla 13. Solución de bloqueo

Reactivos	Concentración (mM)	Composición (g/250 mL)
TBST		250 mL
BSA	10%	25
SDS	0.02%	0.05

Tabla 14. Solución de lavado TBS

Reactivos	Concentración (mM)	Composición (g/L) 10x
TRIS	200	24.2
NaCl	137	80

Tabla 15. Tampón de electroporación

Reactivos	Concentración (mM)	Composición (g/L)
Glutamato potásico	15	30.50
HEPES	2	4.766
Diacetato magnésico	0.7	1.50
EGTA	0.1	0.38

Tabla 16. Tampón de post electroporación

Reactivos	Concentración (mM)	Composición (g/L) 10x
HEPES	6.7	1.59
NaCl	190	11.10

4. Resultados

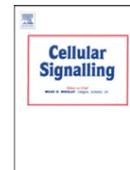
4.1. La fosforilación de STIM1 en residuos de tirosina es requerida para la asociación entre STIM1 y Orai1 en plaquetas humanas.



Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://SciVerse.ScienceDirect.com)

Cellular Signalling

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



STIM1 tyrosine-phosphorylation is required for STIM1-Orai1 association in human platelets

Esther Lopez ^a, Isaac Jardín ^a, Alejandro Berna-Erro ^a, Nuria Bermejo ^c, Ginés M. Salido ^a, Stewart O. Sage ^b, Juan A. Rosado ^a, Pedro C. Redondo ^{a,b,*}

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

^b Department of Physiology, Development and Neuroscience, University of Cambridge, CB3 9DQ Cambridge, United Kingdom

^c Hematology Department of San Pedro de Alcantara Hospital, 10003, Cáceres, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 December 2011

Received in revised form 16 February 2012

Accepted 16 February 2012

Available online 25 February 2012

Keywords:

STIM1

SOCE

Tyrosine phosphorylation

Human platelets

ABSTRACT

Stromal interaction molecule 1 (STIM1) is a key element of the store-operated Ca^{2+} entry mechanism (SOCE). Recently, regulation of STIM1 by glycosylation and phosphorylation on serine/threonine or proline residues has been described; however other modes of phosphorylation that are important for activating SOCE in platelets, such as tyrosine phosphorylation, have been poorly investigated. Here we investigate the latency of STIM1 phosphorylation on tyrosine residues during the first steps of SOCE activation.

Human platelets were stimulated and fixed at desired times using rapid kinetic assays instruments, and immunoprecipitation and western blotting techniques were then used to investigate the pattern of STIM1 tyrosine phosphorylation during the first steps of SOCE activation. We have found that maximal STIM1 tyrosine phosphorylation occurred 2.5 s after stimulation of human platelets with thapsigargin (Tg). STIM1 localized in the plasma membrane were also phosphorylated in platelets stimulated with Tg. By using chemical inhibitors that target different members of the Src family of tyrosine kinases (SKFs), two independent signaling pathways involved in STIM1 tyrosine phosphorylation during the first steps of SOCE activation were identified. We finally conclude that STIM1 tyrosine phosphorylation is a key event for the association of STIM1 with plasma membrane Ca^{2+} channels such as Orai1, hence it is required for conducting SOCE activation.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) is a mechanism by which cells regulate the opening of plasma membrane Ca^{2+} channels upon depletion of intracellular Ca^{2+} stores [1–3]. In human platelets, we have described a *de novo* conformational coupling model as a SOCE-activating mechanism where the movement of portions of the endoplasmic reticulum (ER) to the plasma membrane allows the contact between signaling molecules located in the ER, like the type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP₃R) and stromal interaction molecule 1 (STIM1), and Ca^{2+} channels in the plasma membrane, hTRPCs and Orai1 [4–6]. Among these elements, STIM1 has been identified as a

crucial factor sensing Ca^{2+} in the ER and communicating the intraluminal Ca^{2+} levels to channels located in the plasma membrane [7,8].

Homozygous nonsense mutation of *STIM1* gene was found in two patients suffering immunodeficiency and autoimmunity syndrome, thus revealing the significant contribution of STIM1 and, subsequently, SOCE to human healthy status [9]. Both patients presented, among other symptoms, thrombocytopenia [9]. STIM1 presents several functional domains: an N-terminal domain, facing the lumen of the Ca^{2+} stores or the extracellular medium depending on the location of STIM1 in the Ca^{2+} pools or in the plasma membrane, respectively, which contains the EF-hand domain (the Ca^{2+} -binding site) and a SAM domain; the N-terminal region is followed by the transmembrane region that lacks relevant function described nowadays; and finally, the cytosolic C-terminal domain, which contains coiled-coil regions (protein–protein interaction regions) required for the association with other proteins, such as Orai1 [10,11].

The regulation of STIM1 activity includes several events, but the major regulatory mechanism is Ca^{2+} dissociation from the EF-hand domain, which evokes STIM1 dimerization and subsequent activation [12]. Furthermore, STIM1 function has been reported to be influenced by post-translational modifications, such as glycosylation at the SAM domain and phosphorylation of several amino acidic residues in the

Abbreviations: STIM1, Stromal interaction molecule 1; SOCE, operated Ca^{2+} entry mechanism; SERCA2b, sarco-endoplasmic Ca^{2+} -ATPase isotype 2b; IP₃R II, inositol triphosphate receptor; TRPC, transient receptor potential channel; SKFs, Src family of tyrosine kinases; Btk, Bruton's tyrosine kinase; ER, endoplasmic reticulum; $[\text{Ca}^{2+}]_i$, cytosolic calcium concentration; Tg, thapsigargin; SKI-606, bosutinib; DTT, dithiothreitol; PBS, phosphate-buffered saline; HBS, HEPES-buffered saline; BSA, bovine serum albumin; TBST, Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20.

* Corresponding author at: Department of Physiology, Veterinary Faculty, University of Extremadura, 10003 Cáceres, Spain. Tel.: +34 927257106x5 15 22; fax: +34 927257110.

E-mail address: pcr@unex.es (P.C. Redondo).

C-terminal region [13–15]. The understanding of STIM1 regulatory mechanisms might provide important information concerning SOCE activation. Although phosphorylation of STIM1 at Ser/Thr or Pro residues, located in the C-terminal region, has been recently described, the pathways involving these post-translational modifications remain largely elusive. Taking into account that treatment of human platelets with either tyrosine kinase inhibitors or tyrosine phosphatase inhibitors dramatically impairs the activation of SOCE [16–19], we aimed the present study to elucidate whether STIM1 undergoes tyrosine phosphorylation during the activation of SOCE in human platelets.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Fura-2 acetoxyethyl ester (Fura-2/AM) was from Molecular Probes (Leiden, The Netherlands). Apyrase (grade VII), aspirin, bovine serum albumin (BSA), dithiothreitol (DTT), thapsigargin (Tg), thrombin (Thr) and anti-Orai 1 antibody were from Sigma (Madrid, Spain). Bosutinib (SKI-606) was from LC Laboratories (Woburn, Massachusetts, USA). LFM-A13 was from Tocris Bioscience (Bristol, UK). Mouse monoclonal anti-GOK/STIM1 antibody was from BD Transduction Laboratories (Madrid, Spain). Mouse monoclonal anti-phosphotyrosine (Clone 4G10) antibody and agarose beads conjugated with protein A were from Millipore (California, USA). Anti-BTK (N-20) antibody and anti-c-Src antibody were from Santa Cruz (Santa Cruz, CA, U.S.A.). Enhanced chemiluminescence detection reagents were from Pierce (Cheshire, United Kingdom). All other reagents were of analytical grade.

2.2. Platelet preparation

Platelet-rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation (5 min at 700 \times g) of blood samples drawn from healthy volunteer (according to Helsinki Declaration and University of Extremadura Ethical Committee) and mixed with acid/citrate dextrose anticoagulant. Platelet-rich plasma was supplemented with aspirin (100 μ M) and apyrase (40 μ g/ml). Platelets were then collected from PRP by centrifugation at 350 \times g for 20 min and finally, isolated platelets were 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 bovine serum albumin and (40 μ g/ml) apyrase. Fura-2-loaded platelets were prepared by incubating PRP for 45 min at 37 °C with 2 μ M fura2-AM, centrifuged as previously described, and resuspended in HBS.

2.3. Stopped-flow kinetic measurements

The kinetics of fluorescence change from fura-2-loaded platelets was investigated by stopped-flow fluorimetry at 37 °C using a Hi-Tech Scientific SF-61SX2 Single-Mixing Stopped-Flow System (Hi-Tech Ltd., Salisbury, Wilts., U.K.), with an excitation wavelength of 340 or 360 nm and emission at 500 nm, depending whether Ca²⁺-evoked fura-2 fluorescence changes (to monitor calcium release) or manganese-evoked fura-2 fluorescence quenching (to monitor Mn²⁺ entry) were determined, respectively. Platelets (100 μ l) and agonist solution (100 μ l, 400 nM Tg) were introduced into the sample flow circuit via separate reservoirs at the top of the sample-handling unit. Fluorescence changes were expressed as the increase in fluorescence after mixing (F_n) divided by the average of values of fluorescence of the cell suspension under resting conditions (F_0). Mn²⁺-induced quenching of fura-2 fluorescence excited at 360 nm was used as a surrogate for monitoring Ca²⁺ entry, since Mn²⁺ and Ca²⁺ share the same channels and mechanisms for entering platelets, as previously described [20].

2.4. Protein sample collection and immunoprecipitation

Cells were stimulated at 37 °C, fixed and subsequently collected using a Hi-Tech Scientific RQF-63, Dimension D1 Rapid Quench-Flow System (Hi-Tech Ltd., Salisbury, Wilts., U.K.). Briefly, the cell suspension (100 μ l) and agonist solution (100 μ l) were introduced into the sample flow circuit, via separate reservoirs at the top of the sample-handling unit, and mixed at the times indicated with RIPA (3 \times , supplemented with protease cocktail inhibitor and Na₃VO₄) for 10 min. Previously STIM1 was immunoprecipitated, the protein concentration in the platelet cytosolic samples was standardized using Bradford's technique [21]. STIM1 was isolated from the cell lysates by incubating with protein A-conjugated agarose beads and a specific anti-Gok/STIM1 antibody (2 μ g/ml) that recognized the EF-hand domain of STIM1. Samples were incubated at 4 °C overnight and then immunoprecipitated STIM1 was collected by centrifugation of the beads after washing five times in PBS freshly supplemented with Na₃VO₄. In order to determine the phosphorylation state of STIM1, immunoprecipitated samples were denatured in Laemmli's buffer containing 5% DTT and heated for 10 min at 70 °C.

2.5. Western blotting

One-dimensional SDS-electrophoresis of protein samples extracted from platelets was performed on 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels and separated proteins were electrophoretically transferred for 2 h at 0.8 mA/cm² in a semi-dry chamber onto nitrocellulose 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. Blocked membranes were then incubated with the anti-phospho-tyrosine (4G10) antibody diluted 1:1000 in blocking buffer for 1 h. Additionally, membranes were incubated for 2 h either with an anti-pp60^{src} antibody or an anti-Btk (N20) antibody, both diluted 1:1000 in blocking buffer. In the experiments where STIM1/Orai1 coupling was investigated, Western blotting was performed with a specific anti-Orai1 antibody incubated overnight at 4 °C and diluted in TBST (1:1000). Excess of primary antibody was removed from the blots by washing six times for 5 min with TBST. In order to detect the primary antibody, blots were incubated for 1 h with an appropriate horseradish peroxidase-conjugated IgG antibody diluted 1:5000 to 1:10000 in TBST. After exposure to the secondary antibodies membranes were washed six times in TBST, and exposed to an enhanced chemiluminescence reagents for 1–5 min. Blots were then exposed to photographic film and the optical density was estimated using scanning densitometry. Subsequently, membrane reprobing using the antibody against the immunoprecipitated proteins was done in order to assess that similar amounts of proteins were loaded in each gel lanes.

2.6. STIM1 surface membrane protein isolation

Dimethyl-BAPTA-loaded platelets were stimulated as required with Tg in the presence of EGTA and subsequently fixed with ice-cold para-formaldehyde (3%) for 10 min. Fixed-platelets were then washed twice with PBS prior to incubation with anti-STIM1 antibody for 2 h at room temperature. Excess antibody was removed by washing twice in PBS (supplemented with Na₃VO₄), and cell were lysed with RIPA (2 \times) supplemented with protease inhibitor cocktail and Na₃VO₄. Samples were then incubated overnight with agarose beads to isolate STIM1 bound to anti-STIM1 antibody. Samples were then washed 5 times in PBS before proteins were denatured by mixing with Laemmli's buffer containing 5% DTT and heated to 70 °C for 10 min. Subsequent Western blotting was performed to analyze the tyrosine phosphorylation state of STIM1, as previously described.

2.7. Statistical analysis

Analysis of statistical significance was performed using Student's *t*-test. For multiple comparisons, analysis of the variance was performed using one-way ANOVA combined with Tukey or Bonferroni tests. $P < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Latencies of Ca^{2+} release from intracellular stores and entry across the plasma membrane of human platelets evoked by thapsigargin

In order to determine the latency of Ca^{2+} release from intracellular Ca^{2+} stores and entry from the extracellular medium in human platelets upon treatment with thapsigargin (Tg), fura-2 loaded cells suspended in a Ca^{2+} -free HBS (100 μM EGTA was added) were mixed with Tg in a Stopped-flow system to monitor changes in fura-2 fluorescence on a sub-second time scale. Tg (final concentration 200 nM) evoked a sustained increase in the cytosolic free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) as a result of inhibition of Ca^{2+} reuptake [4]. Changes in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ became evident 2.5 ± 0.2 s after Tg addition (Fig. 1A and inset of Fig. 1A; $P < 0.01$; $n = 10$). Tg-evoked divalent cation (Mn^{2+}) entry was detected 3.2 ± 0.6 s after Tg addition ($P < 0.01$; $n = 10$; Fig. 1B and inset of Fig. 1B). Mn^{2+} can be used as a surrogate

for Ca^{2+} by monitoring fura-2 quench at the isosbestic wavelength of 360 nm [4,16].

3.2. Latency of STIM1 tyrosine phosphorylation in human platelets during the activation of SOCE by thapsigargin

As mentioned above, regulation of STIM1 by phosphorylation has previously been described [22]. However, tyrosine phosphorylation of STIM1 remains poorly investigated, although incubation of cells with tyrosine kinase antagonists, such as genistein or methyl 2,5-dihydroxycinnamate (2,5-DHC), has been reported to reduce SOCE [23–25]. In order to investigate whether STIM1 might undergo phosphorylation on tyrosine residues during SOCE activation, platelets were suspended in a free-calcium medium to which 100 μM EGTA was added, and they were stimulated with Tg (200 nM) for various times using the Quench flow system. After STIM1 immunoprecipitation and SDS-page protein isolation, subsequent Western blotting using a specific anti-phospho-tyrosine (4G10) antibody revealed that STIM1 was phosphorylated on tyrosine residues. As shown in Fig. 2A, in the absence of extracellular Ca^{2+} , STIM1 tyrosine phosphorylation reached a maximum of 2.5 ± 0.6 fold increase compared with control in platelets stimulated with Tg (200 nM) for 2.5 s ($P < 0.01$; $n = 6$). Despite STIM1 phosphorylation events that occurred previously, there were not significant levels observed in resting platelets that resulted from the statistical analysis.

3.3. Plasma membrane resident STIM1 is tyrosine-phosphorylated during SOCE activation by Thapsigargin

STIM1 has been reported at two different cellular locations, either in the plasma-membrane, with the N-terminal domain facing the extracellular medium, or in the membrane of intracellular Ca^{2+} stores, where the N-terminal domain is oriented towards the lumen of the stores [7,13–15,26]. Therefore, we investigated which STIM1 pool was phosphorylated upon platelet stimulation with Tg (200 nM). As shown in Fig. 2B, isolation of plasma membrane resident STIM1, by using the special protocol detailed in Materials and methods, and subsequent Western blotting using the anti-phospho-tyrosine (4G10) antibody, revealed that Tg enhances the phosphotyrosine content of plasma membrane STIM1 in a time-dependent manner, reaching a maximum of 1.39 ± 0.3 fold increase over control after 2.5 s of stimulation ($P > 0.05$; $n = 4$, non-significant) after which tyrosine phosphorylation decreased back to the basal level. Upon re-proving of the membranes with anti-STIM1 antibody, we did not find significant differences in plasma membrane STIM1 expression at these early time points.

3.4. Src/Abl subfamilies of Src tyrosine kinases are involved in STIM1 tyrosine phosphorylation dependent on the rises in $[\text{Ca}^{2+}]_c$

Members of the Src kinase family (SKF) of tyrosine kinases are heavily expressed in human platelets. Among them, we have previously identified pp60^{src} as a key element during the activation of SOCE [27]. In the present work we preincubated human platelets for 30 min at 37 °C with 1.5 μM bosutinib (SKI-606, a Src/Abl kinase inhibitor). SKI-606 at this concentration has been reported to block pp60^{src} activation in human colorectal cancer cell lines [28]. In dimethyl BAPTA-loaded human platelets suspended in a Ca^{2+} -free medium (100 μM EGTA was added), Tg-evoked STIM1 tyrosine phosphorylation after 2.5 s stimulation was not significantly different in the absence or presence of SKI-606 (Fig. 3A; 1.3 ± 0.5 fold increase compared with control in SKI-606 treated cells versus 1.5 ± 0.1 fold increase in untreated platelets). However, when human platelets were suspended in a medium containing 500 μM CaCl_2 , SKI-606 significantly reduced Tg-induced STIM1 tyrosine phosphorylation (Fig. 4B; \$\$: $P < 0.01$ by comparing Tg-stimulated platelets in absence

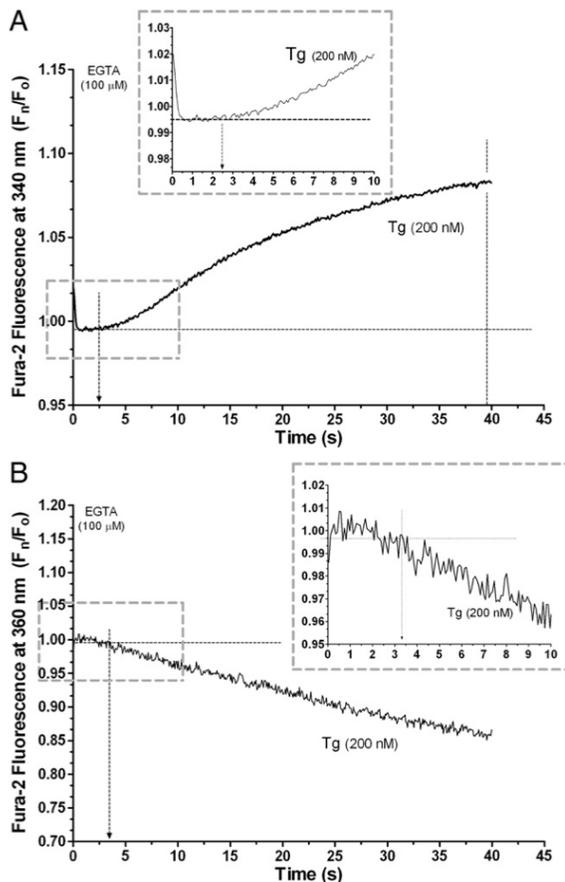


Fig. 1. Comparison of the latency of Tg-evoked Ca^{2+} release and Mn^{2+} entry. Fura-2-loaded human platelets were rapidly mixed with Tg (0 s) at a final concentration of 200 nM in the presence of 100 μM EGTA and 200 μM MnCl_2 . Fura-2 fluorescence was recorded at excitation wavelengths of 340 nm (A) or 360 nm (B). Traces are representative of 20 runs made on cell preparations from 10 healthy donors.

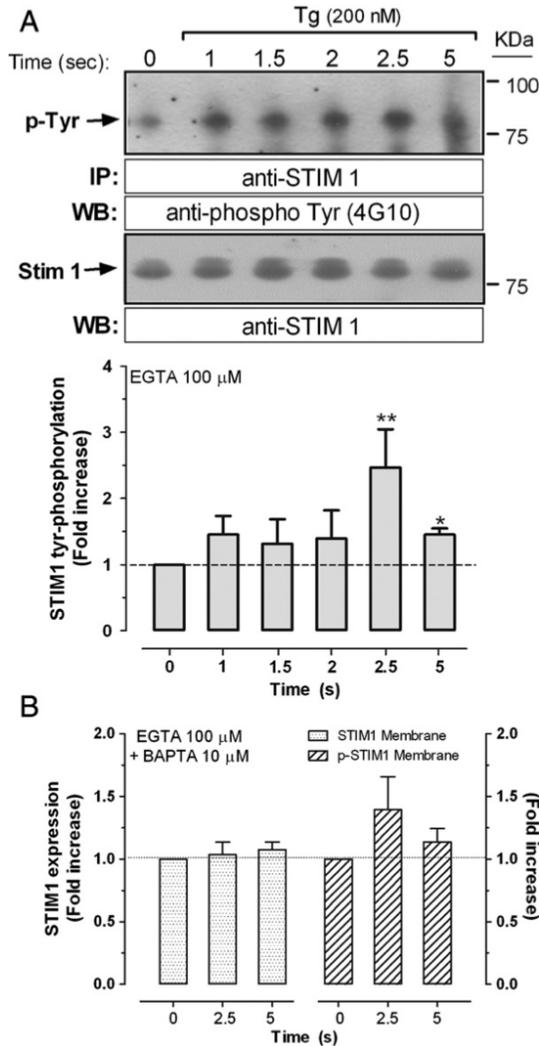


Fig. 2. Time-course of STIM1 tyrosine phosphorylation. **A)** General tyrosine phosphorylation of proteins in platelets was evaluated by Western blotting in cells were stimulated with Tg (200 nM) in the absence of CaCl_2 by adding 100 μM of EGTA and then fixed in Laemmli's buffer at the times indicated. Human platelets were rapidly mixed with Tg (0 s) at a final concentration of 200 nM in the presence of 500 μM CaCl_2 and the incubation was stopped using a Quench-Flow system at the times indicated by lysis in RIPA. Samples were immunoprecipitated with anti-GOK/STIM1 antibody (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) overnight at 4 °C. **B)** Dimethyl BAPTA-loaded human platelets were suspended in a Ca^{2+} -free medium (BAPTA 10 μM for 30 min + 100 μM EGTA, just previously to stimulus) and stimulated with Tg (200 nM) for 2.5 s or 5 s or left untreated and then fixed in para-formaldehyde and incubated for 2 h with anti-GOK/STIM1 antibody at room temperature. Samples were washed and cells were suspended in RIPA and incubated overnight at 4 °C with agarose beads. Proteins were separated by 10% SDS/PAGE and Western blotting was performed with anti-phosphotyrosine antibody (4G10) or anti-STIM1 antibody as described under **Materials and methods**. Analysis of the STIM1 tyrosine phosphorylation was achieved by Western blotting as described under **Materials and methods**. Upper panels show results from one experiment representative of six others. Histograms represent STIM1 plasma membrane expression (left panel) or STIM1 tyrosine phosphorylation, expressed as fold increase. *, **: $P < 0.05$ and 0.01, respectively.

or presence of SKI-606; $n = 4$). These results indicate that Src/Abl may play an important role in STIM1 tyrosine phosphorylation in the presence of extracellular Ca^{2+} . Our findings also suggest that, since STIM1 tyr-phosphorylation still occurred in the presence of SKI-606, other unidentified and Ca^{2+} -independent kinases might also be involved

in this process in the absence of changes in the cytosolic and extracellular Ca^{2+} concentration. As shown in Fig. 3C, treatment with SKI-606 did not significantly modify the association of pp60^{src} with STIM1 under most of the experimental conditions tested; only a slight but non-significant decrease in pp60^{src}/STIM1 association was detected in the presence of SKI-606 in dimethyl BAPTA-loaded platelets under resting conditions (in the presence of EGTA) and upon their stimulation with Tg. All the membranes have been subsequently re-probed with the anti-STIM1 antibody, in order to check that there is no difference in the amount of proteins loaded in each gel lane (data not shown).

Finally, we tested whether the inhibition of STIM1 tyrosine phosphorylation induced by SKI-606 had any effect on Tg-evoked SOCE in platelets. As shown in Fig. 3D, incubation for 30 min with 1.5 μM SKI-606 resulted in a significant reduction of the initial steps of Tg-evoked SOCE ($27.1 \pm 9.6\%$ of control; $P < 0.01$, $n = 6$). When SOCE was measured by using Ca^{2+} "add-back" the effect of SKI-606 was less evident and only a $11.3 \pm 4.8\%$ inhibition was found (Fig. 3E, $P < 0.05$, $n = 6$); thus suggesting that the role of pp60^{src} might be more relevant in the initial steps of SOCE activation. Platelets incubated with 1.0 μM SKI-606 showed a non-significant reduction of SOCE. In contrast, a significant decrease in calcium release was observed at this inhibitor concentration ($17.1 \pm 2.3\%$ respect to control; Fig. 3E; $P < 0.01$, $n = 6$).

3.5. Bruton's tyrosine kinase activation is required for STIM1 tyrosine phosphorylation in the absence of rises in $[\text{Ca}^{2+}]_c$

Bruton's tyrosine kinase (Btk) is a protein that belongs to the Tec family of kinases whose expression has been shown to be altered in the X-linked Bruton type agammaglobulinemia. Our previous results indicate that Btk is present in human platelets, and, as for Src, Btk is also required for actin cytoskeleton remodeling and activation of SOCE [29]. Here we have used the Btk synthetic specific inhibitor LFM-A13 to assess whether Btk is involved in STIM1 tyrosine phosphorylation upon the activation of SOCE. In BAPTA-loaded platelets suspended in a Ca^{2+} -free medium (EGTA 100 μM), incubation for 10 min in the presence of LFM-A13 (10 μM) abolished STIM1 tyrosine phosphorylation (Fig. 4A; $\$$: $P < 0.01$ by comparing Tg-stimulated platelets in absence or presence of SKI-606; $n = 4$). Additionally, in the presence of 500 μM extracellular CaCl_2 , incubation of human platelets with LFM-A13 also abolished Tg-evoked STIM-1 tyrosine phosphorylation (Fig. 4B; $\$$: $P < 0.01$, which confirms our previous observations, and suggest that STIM1 tyrosine phosphorylation is downstream of Btk pathway [29]. Furthermore, incubation with LFM-A13 impaired STIM1/Btk coupling during activation of SOCE under every experimental condition tested as observed in Fig. 4C. All the membranes have been subsequently re-probed with the anti-STIM1 antibody, in order to check that there is no difference in the amount of proteins loaded in each gel lane (data not shown).

3.6. Btk-dependent tyrosine phosphorylation is involved in STIM1/Orai1 coupling

As previously reported [17,29], Btk inhibition reduces SOCE in human platelets. In order to investigate whether inhibition of STIM1 tyrosine phosphorylation by reducing Btk activity might also alter STIM1 association with Ca^{2+} channels, we have evaluated the pattern of STIM1 and Orai1 coupling after stimulation with Tg in the presence of the Btk inhibitor. STIM1 and Orai1 have been shown to associate in human platelets, which results in an increase in store-operated plasma membrane permeability to cations [30–32]. As observed in Fig. 5, co-immunoprecipitation experiments were performed in BAPTA-loaded human platelets suspended in a Ca^{2+} -free medium (EGTA 100 μM). Stimulation of platelets with Tg induced a significant coupling between STIM1 and Orai1 (1.6 ± 0.15 fold increase; $P < 0.01$,

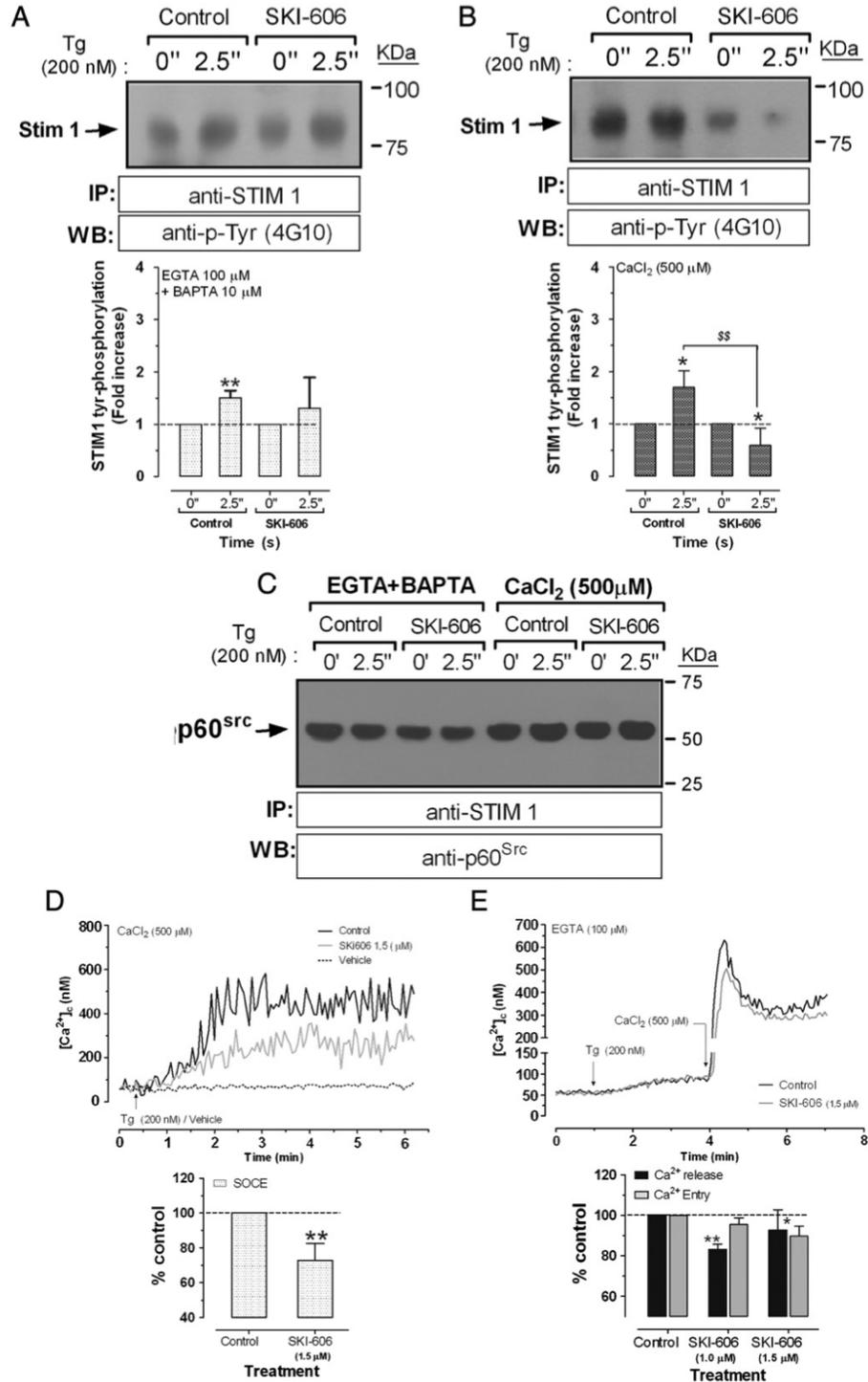


Fig. 3. Role of Src/Abl in Tg-evoked STIM1 tyrosine phosphorylation. A–C) Dimethyl BAPTA-loaded human platelets were suspended in a Ca²⁺-free medium or control platelets were suspended in the presence of 500 μM CaCl₂. Cells were incubated for 30 min at 37 °C with bosutinib (SKI-606, 1.5 μM) and then stimulated for 2.5 s with Tg (200 nM) using a Quench Flow system. STIM1 immunoprecipitation and Western blotting with anti-phospho-tyrosine (4G10) antibody (A and B) and reprobing with anti-pp60^{src} antibody (C) was performed as described under **Materials and methods**. (D and E) Cells were incubated for 30 min at 37 °C with bosutinib (SKI-606, 1.5 μM) and then stimulated with Tg (200 nM) in the presence of 500 μM CaCl₂ (D) or in the absence of external Ca²⁺, followed by addition of 500 μM CaCl₂ 3 min later (E). Histograms and graphs are representative of four independent experiments. **, *P* < 0.05 and 0.01 compared to control or resting platelets time 0"; meanwhile, ^{SS}, *P* < 0.01 by comparing stimulated platelets in presence or absence of SKI-606, respectively.

n = 12). Coupling between STIM1 and Orai1 was significantly reduced in presence of 10 μM of LFM-A13 (1.14 ± 0.13 fold increase over control resting platelets incubated with LFM-A13; *P* > 0.05, *n* = 12).

Furthermore, additional controls were done by reprobing the membranes with anti-STIM1 antibody confirmed a comparable amount of proteins loaded in all lanes (Fig. 5, lower panel).

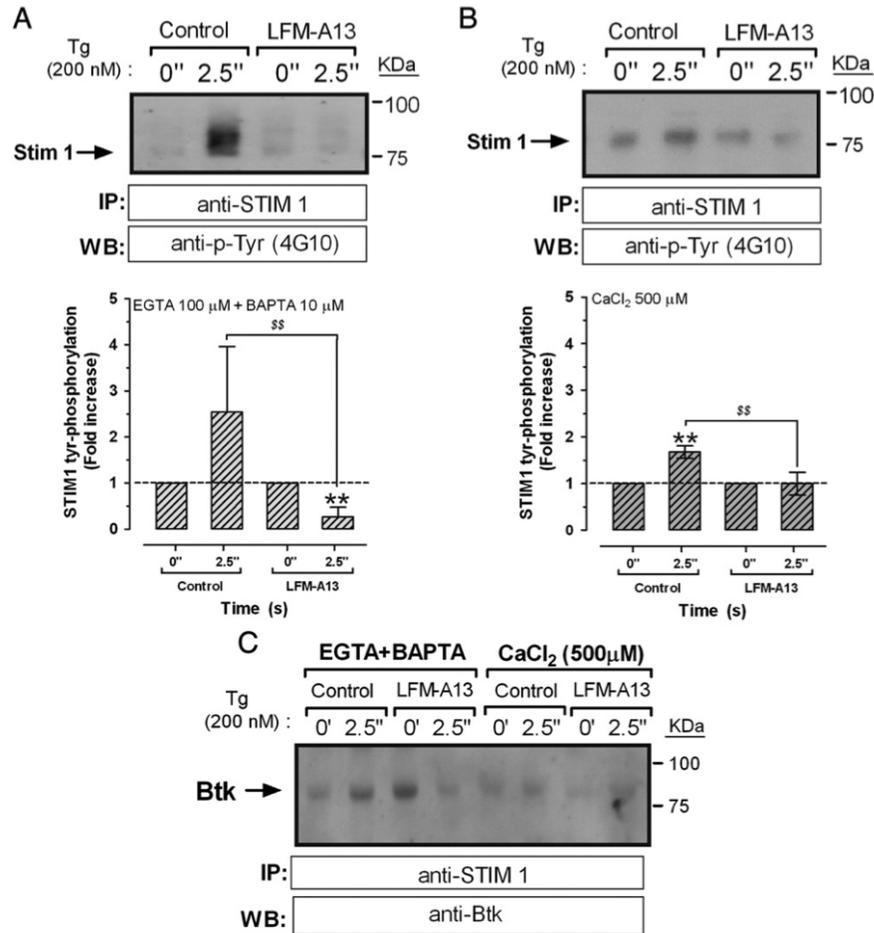


Fig. 4. Role of Btk in Tg-evoked STIM1 tyrosine phosphorylation. Dimethyl BAPTA-loaded human platelets were suspended in a Ca^{2+} -free medium or control platelets were suspended in the presence of 500 μM CaCl_2 . Cells were incubated for 10 min at 37 °C with LFM-A13 (10 μM) and then stimulated for 2.5 s with Tg (200 nM) using a Quench Flow System. STIM1 immunoprecipitation and Western blotting with anti-phospho-tyrosine (4 G10) antibody (A and B) and reprobing with anti-Btk antibody (C) was performed as described under [Materials and methods](#). Histograms and graphs are representative of four independent experiments. *, **: $P < 0.05$ and 0.01 compared to resting platelets time 0"; meanwhile, SS : $P < 0.01$ compared stimulated platelets in presence or absence of SKI-606, respectively.

4. Discussion

STIM1 has been identified as a key element in the activation of SOCE, as demonstrated by performing knock-out or knock-down of STIM1 in several cell models [26,33–35]. The role of STIM1 as an ER Ca^{2+} sensor has been well characterized [36]. Furthermore, recent findings have provided evidence that STIM1 might be also localized in the membranes of acidic granules [37]. Due to the crucial role of STIM1 in SOCE, the investigation of the post-translational modifications of this protein might shed new light on its functional roles. Certain STIM1 post-translational modifications have been investigated, including glycosylation in the C-terminal domain and phosphorylation at Ser/Thr residues. For the latter, previous reports have claimed a possible regulatory mechanism in SOCE [13–15,38,39]. Here we report for the first time that STIM1 can be phosphorylated in Tyr residues upon Ca^{2+} store depletion. A previous study performed in K562 cells, a cell line derived from human immortalised myeloid leukaemia cells, failed to find STIM1 tyrosine phosphorylation after stimulation with 1 mM pervanadate, a tyrosine phosphatase inhibitor [14].

As demonstrated in [Fig. 2](#), tyr-phosphorylation of STIM1 occurs independently of its location, and without significant differences in the lag-time of STIM1 phosphorylation located in plasma membrane

respect to ER-resident STIM1. The fact that BAPTA was unable to abolish the phosphorylation of STIM1 located in plasma membrane is indicative that Ca^{2+} raised in the cytosol is not necessarily involved in this mechanism, which agree with the previous observation done in platelets by Sargeant et al., which showed that changes in tyrosine phosphorylation of several protein take place in BAPTA-loaded platelet stimulated with Tg [23]. These data also indicate that phosphorylation detected in [Fig. 2A](#) is not exclusive of ER-resident STIM1 and that activation signals evoked by Tg administration might migrate through cytosol very quickly.

Moreover, our results suggest that tyrosine phosphorylation of STIM1 might occur before multimerization, since this phenomena would take place before 5 s, according to the result recently obtained by using FRET and confocal microscopy technique in RBC cells [40]. Furthermore, subsequent events required for SOCE, like generation of puncta structure, that would require more time to be completed, or at least to be detected under microscopy, as reported in RBC cells, started to be evident almost at 10 s and the half time was approximately 40 s. Contrary to latest observation in RBC cells, we have found that Tg platelets stimulation evokes calcium release from intracellular stores that became evident after approximately 2.5 s. Calcium released by TG evoked calcium entry activation as quick as 0.7 s later, as detected by using Mn^{2+} as calcium surrogated.

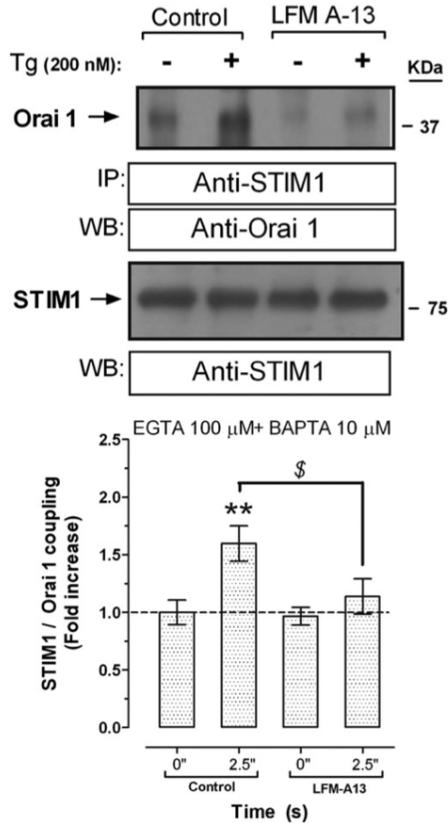


Fig. 5. Btk-mediated STIM1 tyrosine phosphorylation is required for the association between STIM1 and Orai1. Dimethyl BAPTA-loaded human platelets were suspended in a Ca^{2+} -free medium and incubated for 10 min in the absence or presence of LFM-A13 (10 μ M). Platelets were stimulated with Tg (200 nM) for 2.5 s and then fixed. STIM1 was immunoprecipitated using a specific anti-GOK/STIM1 antibody followed by Western blotting using a specific anti-Orai1 antibody and reprobing with the anti-STIM1 antibody. Histograms represent STIM1/Orai1 association expressed as fold increase. $n = 12$. **, $P < 0.01$ compared to resting platelets and §, $P < 0.05$ by comparing stimulated platelets in presence or absence of LFM-A13.

This quick calcium movement and signaling that take place in platelet would be required for fully platelets activation, among other phenomena like cytoskeleton reorganization, pseudopodia emission and platelets spreading. Several experimental data reported by independent group in isolated platelets show that 1 min is more than enough to induce 50% of platelet-induced fully aggregation mechanism; further, a very recent publication describes that thrombin-induced guinea pig platelets aggregation was reached around 23 s after platelets stimulation with 2.5 U/ml of thrombin. Thus, in the latest cell type SOCE activation mechanism should take place immediately after stimulation of Ca^{2+} release, in order to conduct the other processes required for platelets activation [41,42]. Nevertheless, considering the differences in the delay time among several functions that take place in the organism, discrepancies on the delay time of Ca^{2+} release, STIM1 phosphorylation and oligomerization into puncta, and finally, Ca^{2+} entry activation, should not be discarded among cells.

On the other hand, we have previously shown that proteins of the Src family of kinases (SKF) are involved in SOCE activation in human platelets [16,24]. Members of the SKF can be divided into two main groups; those expressed in hematopoietic cells, such as Fgr, Lyn, Hck, Lck, Blk, Yrc and Yrk, and those widely expressed like Src, Fyn and Yes. We have focused on two SKF members, Src and Abl, both highly expressed in human platelets, where some members, like

pp60^{src}, have been previously reported to participate in the activation of SOCE by regulating remodeling of the membrane cytoskeleton [16,24]. Although other members of the Src subfamily are also expressed in human platelets, including pp62^{c-yes} (Yes), pp60^{lyn} (Fyn), pp54/58^{lyn} (Lyn) y pp58^{hck} (Hck), their expression is smaller than that of pp60^{src}, and their function in SOCE remains unclear. The Abl subfamily has also been found to regulate cytoskeletal remodeling, as well as stress-dependent responses and cell survival [43]. Due to the nature of platelets, application of siRNA-based technology is not possible. As a chemical alternative, we have used the dual c-Src/Abl inhibitor called SKI-606, which is more specific for SKF proteins than the widely used PP1 and PP2 [14,16]. Our results indicate that Src/Abl members are involved in the activation, and also in the maintenance of SOCE, although these proteins play a minor role in the latter. In addition, Src/Abl proteins are required for Tg-induced STIM1 tyrosine phosphorylation in the presence of extracellular Ca^{2+} but not in its absence.

We have also found that the activity of the tyrosine kinase protein Btk is required for store depletion-evoked Btk/STIM1 coupling, as well as for store depletion-stimulated STIM1 tyrosine phosphorylation and association between STIM1 and the Ca^{2+} channel Orai1. We have previously reported that Btk activation occurs independently of rises in $[Ca^{2+}]_c$ and is required for SOCE in human platelets [29]. Here we provide compelling evidence for a functional role of STIM1 tyrosine phosphorylation in its association with Orai1, which has been reported to be an important event in the activation of SOCE in human platelets and other cell types. Furthermore, the present study provides a mechanistic explanation for the role of Btk in SOCE previously reported in human platelets [29,44].

In summary, here we show that Ca^{2+} stores depletion induces rapid STIM1 tyrosine phosphorylation, involving the tyrosine kinase Btk, which does not require changes in cytosolic calcium concentration. STIM1 tyrosine phosphorylation might require the participation of Src/Abl subfamily members and might be important for the association of STIM1 with the capacitative calcium entry channel, Orai1, an event that is essential for the activation of SOCE in human platelets, and has severe implications in human health.

Acknowledgments

The present work has been supported by MEC (BFU2010-21043-C02-01), Junta de Extremadura-FEDER (GR10010 and PRIBS10020) and University of Extremadura Research Program (A-VII). Redondo PC was supported by MEC "Ramón y Cajal Program" (RYC-20070-00349) and Lopez E is supported by NHI Carlos III Health Program (FI10/00573). Berna-Erro A was supported by University of Extremadura Posdoc-Research Contract (D-01).

References

- [1] K.K.K. Itagaki, K.B. Kannan, D.H. Livingston, E.A. Deitch, Z. Fekete, C.J. Hauser, *Journal of Immunology* (2002) 4063–4069.
- [2] C. Randriamampita, R.Y. Tsien, *The Journal of Biological Chemistry* 270 (1995) 29.
- [3] J.A. Rosado, P.C. Redondo, S.O. Sage, J.A. Pariente, G.M. Salido, *Journal of Cellular Physiology* 205 (2005) 262.
- [4] J.A. Rosado, S.O. Sage, *The Biochemical Journal* 356 (2001) 191.
- [5] Y. Liao, C. Erxleben, J. Abramowitz, V. Flockertzi, M.X. Zhu, D.L. Armstrong, L. Birnbaumer, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (2008) 2895.
- [6] G. Boulay, D.M. Brown, N. Qin, M. Jiang, A. Dietrich, M.X. Zhu, Z. Chen, M. Birnbaumer, K. Mikoshiba, L. Birnbaumer, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (1999) 14955.
- [7] M.A. Spassova, J. Soboloff, L.P. He, W. Xu, M.A. Dziadek, D.L. Gill, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (2006) 4040.
- [8] T. Hewavitharana, X. Deng, Y. Wang, M.F. Ritchie, G.V. Girish, J. Soboloff, D.L. Gill, *The Journal of Biological Chemistry* 283 (2008) 26252.
- [9] C. Picard, C.A. McCarl, A. Papolos, S. Khalil, K. Luthy, C. Hivroz, F. LeDeist, F. Rieux-Laucat, G. Rechavi, A. Rao, A. Fischer, S. Feske, *The New England Journal of Medicine* 360 (2009) 1971.
- [10] P.B. Stathopoulos, L. Zheng, G.Y. Li, M.J. Plevin, M. Ikura, *Cell* 135 (2008) 110.

- [11] T. Kawasaki, I. Lange, S. Feske, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 385 (2009) 49.
- [12] P.B. Stathopoulos, G.Y. Li, M.J. Plevin, J.B. Ames, M. Ikura, *The Journal of Biological Chemistry* 281 (2006) 35855.
- [13] R.T. Williams, S.S. Manji, N.J. Parker, M.S. Hancock, L. Van Stekelenburg, J.P. Eid, P.V. Senior, J.S. Kazenwadel, T. Shandala, R. Saint, P.J. Smith, M.A. Dziadek, *The Biochemical Journal* 357 (2001) 673.
- [14] S.S. Manji, N.J. Parker, R.T. Williams, L. van Stekelenburg, R.B. Pearson, M. Dziadek, P.J. Smith, *Biochimica et Biophysica Acta* 1481 (2000) 147.
- [15] M.A. Dziadek, L.S. Johnstone, *Cell Calcium* 42 (2007) 123.
- [16] J.A. Rosado, P.C. Redondo, G.M. Salido, E. Gomez-Arteta, S.O. Sage, J.A. Pariente, *The Journal of Biological Chemistry* 279 (2004) 1665.
- [17] P.C. Redondo, M.T. Harper, J.A. Rosado, S.O. Sage, *Blood* 107 (2006) 973.
- [18] P.C. Redondo, A.G. Harper, M.T. Harper, S.L. Brownlow, J.A. Rosado, S.O. Sage, *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 5 (2007) 2476.
- [19] J.A. Rosado, T. Porras, M. Conde, S.O. Sage, *The Journal of Biological Chemistry* 276 (2001) 15666.
- [20] J.A. Rosado, S. Jenner, S.O. Sage, *The Journal of Biological Chemistry* 275 (2000) 7527.
- [21] M.M. Bradford, *Analytical Biochemistry* 72 (1976) 248.
- [22] W.G. Sinkins, M. Estacion, W.P. Schilling, *The Biochemical Journal* 331 (Pt 1) (1998) 331.
- [23] P. Sargeant, R.W. Farndale, S.O. Sage, *Experimental Physiology* 79 (1994) 269.
- [24] J.A. Rosado, D. Graves, S.O. Sage, *The Biochemical Journal* 351 (Pt 2) (2000) 429.
- [25] P. Sargeant, R.W. Farndale, S.O. Sage, *FEBS Letters* 315 (1993) 242.
- [26] H. Jousset, M. Frieden, N. Demaurex, *The Journal of Biological Chemistry* 282 (2007) 11456.
- [27] P.C. Redondo, A.I. Lajas, G.M. Salido, A. Gonzalez, J.A. Rosado, J.A. Pariente, *The Biochemical Journal* 370 (2003) 255.
- [28] A.M. Coluccia, D. Benati, H. Dekhil, A. De Filippo, C. Lan, C. Gambacorti-Passerini, *Cancer Research* 66 (2006) 2279.
- [29] P.C. Redondo, N. Ben-Amor, G.M. Salido, A. Bartegi, J.A. Pariente, J.A. Rosado, *Cellular Signalling* 17 (2005) 1011.
- [30] I. Jardin, J.J. Lopez, G.M. Salido, J.A. Rosado, *The Journal of Biological Chemistry* 283 (2008) 25296.
- [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, *The Journal of Biological Chemistry* 282 (2007) 9105.
- [32] M. Muik, I. Frischauf, I. Derler, M. Fahrner, J. Bergsmann, P. Eder, R. Schindl, C. Hesch, B. Polzinger, R. Fritsch, H. Kahr, J. Madl, H. Gruber, K. Groschner, C. Romanin, *The Journal of Biological Chemistry* 283 (2008) 8014.
- [33] J. Liou, M.L. Kim, W.D. Heo, J.T. Jones, J.W. Myers, J.E. Ferrell Jr., T. Meyer, *Current Biology* 15 (2005) 1235.
- [34] X. Yan, J. Xing, C. Lorin-Nebel, A.Y. Estevez, K. Nehrke, T. Lamitina, K. Strange, *The Journal of General Physiology* 128 (2006) 443.
- [35] F. Antigny, H. Jousset, S. Konig, M. Frieden, *Cell Calcium* 49 (2010) 115.
- [36] I. Jardin, J.J. Lopez, P.C. Redondo, G.M. Salido, J.A. Rosado, *Biochimica et Biophysica Acta* 1793 (2009) 1614.
- [37] H. Zbidi, I. Jardin, G.E. Woodard, J.J. Lopez, A. Berna, G.M. Salido, J.A. Rosado, *The Journal of Biological Chemistry* 286 (2011) 12257.
- [38] J.T. Smyth, J.G. Petranka, R.R. Boyles, W.I. DeHaven, M. Fukushima, K.L. Johnson, J.G. Williams, J.W. Putney Jr., *Nature Cell Biology* 11 (2009) 1465.
- [39] E. Pozo-Guisado, D.G. Campbell, M. Deak, A. Alvarez-Barrientos, N.A. Morrice, I.S. Alvarez, D.R. Alessi, F.J. Martin-Romero, *Journal of Cell Science* 123 (2010) 3084.
- [40] J. Liou, M. Fivaz, T. Inoue, T. Meyer, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (2007) 9301.
- [41] I. Jardin, N. Ben Amor, J.M. Hernandez-Cruz, G.M. Salido, J.A. Rosado, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 465 (2007) 16.
- [42] F. Nadal-Wollbold, A. Bocquet, T. Bourbon, R. Letienne, B. Le Grand, *European Journal of Pharmacology* 644 (2010) 188.
- [43] J. Colicelli, *Science Signaling* 3 (2010) re6.
- [44] P.C. Redondo, G.M. Salido, J.A. Pariente, J.A. Rosado, *Biochemical Pharmacology* 67 (2004) 1065.

4.2. Las proteínas Homer regulan la entrada de calcio y la agregación en plaquetas humanas: papel de las proteínas Homer en la asociación entre STIM1 y Orai1.

Homers regulate calcium entry and aggregation in human platelets: a role for Homers in the association between STIM1 and Orai1

Isaac JARDIN*, Letizia ALBARRÁN*, Nuria BERMEJO†, Ginés M. SALIDO* and Juan A. ROSADO*¹

*Department of Physiology, Cellular Physiology Research Group, University of Extremadura, 10003 Cáceres, Spain, and †Hospital San Pedro de Alcántara, 10003 Cáceres, Spain

Homer is a family of cytoplasmic adaptor proteins that play different roles in cell function, including the regulation of G-protein-coupled receptors. These proteins contain an Ena (Enabled)/VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein) homology 1 domain that binds to the PPXXF sequence motif, which is present in different Ca²⁺-handling proteins such as IP₃ (inositol 1,4,5-trisphosphate) receptors and TRPC (transient receptor potential canonical) channels. In the present study we show evidence for a role of Homer proteins in the STIM1 (stromal interaction molecule 1)-Orai1 association, as well as in the TRPC1-IP₃R11 (type II IP₃ receptor) interaction, which might be of relevance in platelet function. Treatment of human platelets with thapsigargin or thrombin results in a Ca²⁺-independent association of Homer1 with TRPC1 and IP₃R11. In addition, thapsigargin and thrombin enhanced the association of Homer1 with STIM1 and Orai1 in a Ca²⁺-dependent manner.

Interference with Homer function by introduction of the synthetic PPKKFR peptide into cells, which emulates the proline-rich sequences of the PPXXF motif, reduced STIM1-Orai1 and TRPC1-IP₃R11 associations, as compared with the introduction of the inactive PPKKRR peptide. The PPKKFR peptide attenuates thrombin-evoked Ca²⁺ entry and the maintenance of thapsigargin-induced store-operated Ca²⁺ entry. Finally, the PPKKFR peptide attenuated thrombin-induced platelet aggregation. The findings of the present study support an important role for Homer proteins in thrombin-stimulated platelet function, which is likely to be mediated by the support of agonist-induced Ca²⁺ entry.

Key words: calcium entry, Homer, Orai1, platelet, stromal interaction molecule 1 (STIM1), thrombin, transient receptor potential canonical (TRPC).

INTRODUCTION

Occupation of PLC (phospholipase C)/GPCRs (G-protein-coupled receptors) by agonists results in an increase in the intracellular free Ca²⁺ concentration (termed [Ca²⁺]_i) which consists of two components: the release of Ca²⁺ from intracellular stores and the influx of Ca²⁺ through plasma membrane channels [1]. In non-excitabile cells, Ca²⁺ influx might be either controlled by the filling state of the intracellular Ca²⁺ stores, a mechanism known as SOCE (store-operated Ca²⁺ entry) or capacitative Ca²⁺ entry [2], or independent of store depletion, the so called non-capacitative Ca²⁺ entry mechanism. With regard to SOCE, the mechanism by which the filling state of the intracellular stores is communicated to the plasma membrane channels involves the Ca²⁺-binding protein STIM1 (stromal interaction molecule 1), which has been identified both in the ER (endoplasmic reticulum), as well as in the acidic Ca²⁺ stores [3,4]. Receptor-evoked SOCE is mediated by two types of Ca²⁺ influx channels: the Orai family members [5] and TRPC [TRP (transient receptor potential) canonical] family channels [6,7]. Orai1 has been reported to be gated by STIM1 through its SOAR/CAD domain [STIM1 Orai1-activating region/CRAC (cytosolic regulator of adenylate cyclase)-activating domain] [8]. TRPC channels can also be gated by STIM1 through electrostatic interaction [9], and this association has been shown to be essential for the capacitative behaviour of TRPC channels [10,11]. Furthermore, IP₃Rs [IP₃

(inositol 1,4,5-trisphosphate) receptors] have been reported to interact and regulate plasma membrane TRPC channels [12,13].

The association between TRPC channels and IP₃Rs is dynamically regulated by the adaptor protein Homer1 [14]. Homer is a family of three adaptor proteins, Homer1, Homer2 and Homer3, with various isoforms. These proteins contain a class II EVH1 [Ena (Enabled)/VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein) homology 1] domain that binds to a number of ligands, including PPxxF or LPSSP [14,15], present in a variety of Ca²⁺-handling proteins such as PLCβ, IP₃Rs or RyRs (ryanodine receptors), and TRPC channels [16]. It has been reported that TRPC1 contains two Homer-binding sites, referred to as type 1 (PPxxF or PxxF) and atypical type 2 (LPSSP) motifs [14,17], STIM1 contains a PxxF motif [17], and IP₃R11 (type II IP₃R) contains a PPxxF motif [18]. The three Homer isoforms have been reported to play different roles in Ca²⁺ signalling. For example, Homer2 plays an important role in the regulation of GPCRs, probably due to the acceleration of the GAP (GTPase-activating protein) activity of RGS (regulator of G-protein signalling) proteins, which results in attenuation of the Ca²⁺ signal intensity [19]. The function of Homer3 is not completely understood, but it has been shown to participate, as well as Homer2, in the regulation of NFAT (nuclear factor of activated T-cells) [20]. Homer1 has been hypothesized to be essential to maintain the TRPC channels in the closed configuration; thus, in the resting state, TRPC channels are

Abbreviations used: BAPTA, [1,2-bis-(*o*-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetra-acetic acid; BAPTA/AM, BAPTA tetrakis(acetoxymethyl ester); [Ca²⁺]_i, intracellular free Ca²⁺ concentration; CRAC, cytosolic regulator of adenylate cyclase; DES, diethylstilbestrol; ECL, enhanced chemiluminescence; Ena, Enabled; EVH1, Ena (Enabled)/VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein) homology 1; fura 2/AM, fura 2 acetoxymethyl ester; GPCR, G-protein-coupled receptor; HBS, HEPES-buffered saline; HRP, horseradish peroxidase; IP₃, inositol 1,4,5-trisphosphate; IP₃BD, IP₃-binding domain; IP₃R, IP₃ receptor; IP₃R11, type II IP₃R; mGluR, metabotropic glutamate receptor; PLC, phospholipase C; RyR, ryanodine receptor; SOCE, store-operated Ca²⁺ entry; STIM1, stromal interaction molecule 1; TG, thapsigargin; TRP, transient receptor potential; TRPC, TRP canonical; VASP, vasodilator-stimulated phosphoprotein.

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

complexed with IP₃Rs and Homer proteins to keep the channel inactive. These complexes are supposed to dissociate upon cell stimulation by agonists in order to allow channel opening by an interaction with STIM1 [16].

In human platelets we have provided evidence supporting the hypothesis that store depletion results in an association between TRPC1 proteins and IP₃Rs [21], an interaction that plays an important role in the maintenance of SOCE in these cells [13]. These findings are consistent with an activating role of IP₃Rs on TRPC channels, in agreement with previous studies reporting a role for the N-terminal domain of the IP₃Rs in the activation of TRPC channels [12]. Activation of TRPC channels by IP₃Rs might involve a role for IP₃Rs in the displacement of calmodulin through their interaction with the CIRB (calmodulin- and IP₃R-binding) site of TRPCs [22]. Therefore these findings suggest that the functional role of Homers, as well as the regulation of TRPC channels by IP₃Rs, might depend on the idiosyncrasy of the cellular models investigated. Hence, in the present study we have investigated the association of Homer1 with proteins of the SOCE pathway and evaluated the functional role of Homers in human platelets. The results of the present study indicate that Homer1 interacts with IP₃Rs and TRPC1 upon depletion of the intracellular Ca²⁺ stores in platelets independently of rises in [Ca²⁺]_i. In contrast, Homer1 binds to STIM1 and Orai1 in a Ca²⁺-dependent manner. Impairment of Homer function by introduction of the PPKKFR peptide revealed that these proteins are involved in Ca²⁺ signalling and aggregation in human platelets.

MATERIAL AND METHODS

Materials

Fura 2/AM (fura 2 acetoxymethyl ester), dimethyl-BAPTA/AM {dimethyl BAPTA [1,2-bis-(*o*-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetra-acetic acid] tetrakis(acetoxymethyl ester)} and calcein/AM were from Molecular Probes. Apyrase (grade VII), aspirin, TG (thapsigargin), thrombin, PMSF, rabbit anti-Orai1 C-terminal antibody, rabbit anti-Homer1 antibody, BSA and DES (diethylstilbestrol) were from Sigma. PPKKRR and PPKKFR were from Immunostep. Rabbit anti-TRPC1 antibody, goat anti-IP₃R II C-terminal antibody (C-20), HRP (horseradish peroxidase)-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody and HRP-conjugated donkey anti-goat IgG antibody were from Santa Cruz Biotechnology. Mouse anti-STIM1 antibody was from BD Transduction Laboratories. IP₃R II N-terminal synthetic peptide E³¹⁷LNPDYRDAQNEGKTVRD³³⁴ [peptide corresponding to amino acids 317–334 of the IP₃BD (IP₃-binding domain) of IP₃R II (IP₃BD-peptide³¹⁷⁻³³⁴)] was from Affinity Bioreagents. Hyperfilm ECL (enhanced chemiluminescence) and HRP-conjugated anti-mouse IgG antibody were from GE Healthcare. Protein A-agarose was from Upstate Biotechnology. ECL detection reagents and rabbit anti-mouse IgG were from Pierce. All other reagents were of analytical grade.

Platelet preparation

Fura-2-loaded platelets were prepared as described previously [23], as approved by Local Ethical Committees and in accordance with the Declaration of Helsinki. For loading with dimethyl-BAPTA, cells were incubated for 30 min with 10 μM dimethyl-BAPTA/AM. Cells were then collected by centrifugation and resuspended in HBS (Hepes-buffered saline) (pH 7.45), containing 145 mM NaCl, 10 mM Hepes, 10 mM D-glucose, 5 mM KCl and 1 mM MgSO₄, supplemented with 0.1 % BSA and 40 μg/ml apyrase.

Cell viability

Cell viability was assessed using calcein and Trypan Blue. For calcein loading, cells were incubated for 30 min with 5 μM calcein/AM at 37 °C, centrifuged (350 g for 20 min at 22 °C) and the pellet was resuspended in fresh HBS. Fluorescence was recorded using a Cary Eclipse Spectrophotometer (Varian). 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.

Measurement of [Ca²⁺]_i

Fluorescence was recorded from 2 ml aliquots of magnetically stirred platelet suspension (2 × 10⁸ cells/ml) at 37 °C using a fluorescence spectrophotometer with excitation wavelengths of 340 and 380 nm, and emission at 505 nm. Changes in [Ca²⁺]_i were monitored using the fura-2 340/380 fluorescence ratio and calibrated according to the method of Grynkiewicz et al. [24].

Elevations in [Ca²⁺]_i were estimated using the integral of the rise in [Ca²⁺]_i for 2.5 min after the addition of CaCl₂ or the agonist, which was expressed in nM/s [25]. To compare the rate of increase in [Ca²⁺]_i after platelet stimulation between different treatments we used the constant of the exponential increase. Traces were fitted to the equation:

$$y = A(1 - e^{-K_1 t}) e^{-K_2 t},$$

where K₁ is the constant of the exponential increase.

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 × 10⁸ cells/ml) at 37 °C using a Cary Eclipse Spectrophotometer (Varian) as a quenching of fura-2 fluorescence at the isoemissive wavelength of 360 nm, and this was presented on an arbitrary linear scale [26]. Mn²⁺ entry was calculated as the integral of the change in the 360 nm fluorescence for 2.5 min, taking a sample every 1 s, after the addition of TG, corrected by subtraction of the change in fluorescence observed in the absence of TG (vehicle added), and presented as a.u. (arbitrary units)/s.

Reversible electroporation procedure

The platelet suspension was transferred to an electroporation chamber and the peptides were transfected according to previously published methods [26,27]. Following electroporation, cells were incubated with 1 μM PPKKFR, or the negative control peptide PPKKRR, 2 μg/ml anti-Orai1 C-terminal antibody (or rabbit IgG as control) or 2 μg/ml IP₃BD-peptide³¹⁷⁻³³⁴ for an additional 60 min at 37 °C. Cells were then centrifuged (350 g for 20 min at 22 °C) and resuspended in HBS containing 200 μM CaCl₂.

Immunoprecipitation and Western blot analysis

Immunoprecipitation and Western blot analysis were performed as described previously [28]. Briefly, aliquots of platelet lysates (1 ml) were immunoprecipitated by incubation with 2 μg of anti-Homer1, anti-STIM1, anti-Orai1 or anti-IP₃R II antibodies and 25 μl of Protein A-agarose overnight at 4 °C, followed by Western blotting with the anti-STIM1 antibody diluted 1:250 in TBST [Tris-buffered saline (20 mM Tris and 137 mM NaCl, pH 7.6) with 0.1 % Tween 20] for 2 h, the anti-TRPC1 or anti-Orai1 antibody

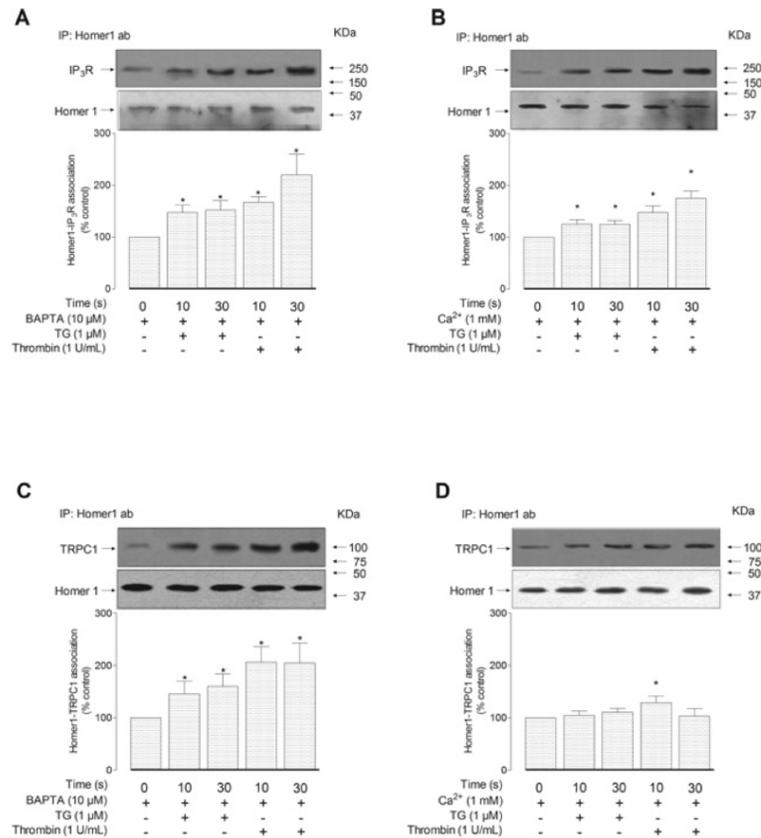


Figure 1 Homer1 associates with TRPC1 and IP₃RII

Human platelets were loaded with dimethyl-BAPTA (and suspended in a Ca²⁺-free medium, 100 μM EGTA added; **A** and **C**) or left untreated and then suspended in HBS containing 1 mM Ca²⁺ (**B** and **D**). Cells were stimulated with 1 μM TG or 1 unit/ml thrombin for 10 and 30 s and lysed. Cell lysates were immunoprecipitated (IP) with an anti-Homer1 antibody followed by Western blotting using an anti-IP₃RII antibody (**A** and **B**) or an anti-TRPC1 antibody (**C** and **D**). Membranes were reprobed with the immunoprecipitating antibody (middle panels). Positions of molecular mass markers are shown on the right-hand side. These results are representative of six independent experiments. Values are means ± S.E.M. for six independent experiments. **P* < 0.05 compared with resting cells. ab, antibody.

diluted 1:1000 in TBST for 2 h, or the anti-IP₃R (I, II or III) and anti-Homer1 antibodies diluted 1:500 respectively. To detect the primary antibody, blots were incubated with HRP-conjugated secondary antibody diluted 1:10 000 in TBST, and then exposed to ECL reagents for 4 min. Blots were then exposed to photographic films. The density of bands on the film was measured using scanning densitometry.

Platelet aggregation

The percentage, rate and lag-time of aggregation in washed platelets were monitored using a Chronolog aggregometer at 37 °C under stirring at 1200 rev./min [29].

Statistical analysis

Statistical significance was analysed using one-way ANOVA combined with the Dunnett tests. For comparison between two groups Student's *t* test was used. *P* < 0.05 was considered to be statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Homer1 associates with TRPC1 and the IP₃RII independently of changes in [Ca²⁺]_i

Homer1 has been reported to couple TRPC channels with IP₃Rs [16], hence we have investigated the association of Homer1 with both TRPC1 and IP₃RII in human platelets by looking for co-immunoprecipitation from platelet lysates. Immunoprecipitation and subsequent Western blotting was conducted using resting platelets and platelets stimulated with thrombin (1 unit/ml) or with the inhibitor of the SERCA (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase) TG (1 μM). The experiments were performed in cells loaded with dimethyl-BAPTA (in the absence of extracellular Ca²⁺, 100 μM EGTA was added; Figures 1A and 1C) to prevent Ca²⁺-induced, but not store-depletion-induced, responses, and in control cells suspended in medium containing 1 mM Ca²⁺ (Figures 1B and 1D). Cell viability in our platelet preparations was estimated as 95 %. Dimethyl-BAPTA loading abolished both TG- and thrombin-induced Ca²⁺ release from the internal stores, as detected using fura-2 (results not shown); however, this procedure itself has not been found to induce activation of store depletion-mediated mechanisms,

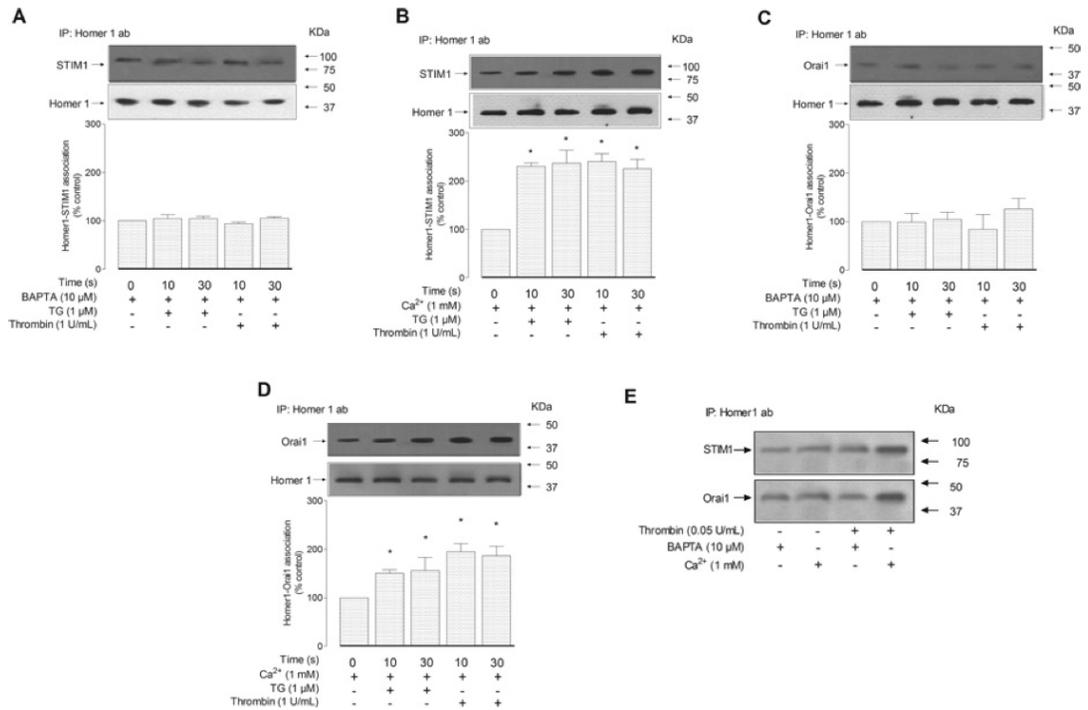


Figure 2 Homer1 associates with STIM1 and Orai1 in a Ca²⁺-dependent manner

Human platelets were loaded with dimethyl-BAPTA (and suspended in a Ca²⁺-free medium, 100 μ M EGTA added; **A** and **C**) or left untreated and then suspended in HBS containing 1 mM Ca²⁺ (**B** and **D**). Cells were stimulated with 1 μ M TG or 1 unit/ml thrombin for 10 and 30 s and lysed. Cell lysates were immunoprecipitated (IP) with an anti-Homer1 antibody followed by Western blotting using an anti-STIM1 antibody (**A** and **B**) or an anti-Orai1 antibody (**C** and **D**). Membranes were reprobed with the immunoprecipitating antibody (middle panels). (**E**) Cells were loaded with dimethyl-BAPTA (and suspended in a Ca²⁺-free medium) or left untreated and then suspended in HBS containing 1 mM Ca²⁺. Cells were stimulated with 0.05 unit/ml thrombin for 10 s and lysed. Cell lysates were immunoprecipitated (IP) with an anti-Homer1 antibody followed by Western blotting using an anti-STIM1 or anti-Orai1 antibody. Positions of molecular mass markers are shown on the right-hand side. Values are means \pm S.E.M. for six independent experiments. **P* < 0.05 compared with resting cells. ab, antibody.

such as tyrosine phosphorylation or co-immunoprecipitation between proteins involved in SOCE [30,31], thus suggesting that dimethyl-BAPTA-loading does not induce significant Ca²⁺ store depletion. In non-stimulated dimethyl-BAPTA-loaded platelets, immunoprecipitation with an anti-Homer1 antibody followed by Western blotting with an anti-IP₃RII or anti-TRPC1 antibody revealed a detectable association of Homer1 with both IP₃RII (Figure 1A) and TRPC1 (Figure 1C). Treatment for 10 or 30 s with TG or thrombin significantly increased the association between Homer1 and both IP₃RII and TRPC1 (Figures 1A and 1C, top panel; *P* < 0.05, *n* = 6). We also conducted experiments in cells not loaded with dimethyl-BAPTA in the presence of 1 mM external Ca²⁺. Immunoprecipitation with an anti-Homer1 antibody followed by Western blotting with an anti-IP₃RII or anti-TRPC1 antibody revealed association of Homer1 with both IP₃RII (Figure 1B) and TRPC1 (Figure 1D) in samples from resting platelets, which was similar to the association observed in BAPTA-loaded cells. Treatment with TG or thrombin enhanced the association of Homer1 with IP₃RII, but, interestingly, this response was significantly smaller than that observed in dimethyl-BAPTA-loaded cells (Figure 1B compared with 1A; *P* < 0.05, *n* = 6). Furthermore, TG was unable to enhance the association between Homer1 and TRPC1, and thrombin slightly increased this association after 10 s of stimulation, returning this response to resting levels 30 s after platelet treatment. Western blotting of the same membranes with the antibody used for immunoprecipitation confirmed a similar protein content in all lanes (Figure 1, middle

panels). These findings suggest that the association between Homer1 and IP₃RII or TRPC1 does not require changes in [Ca²⁺]_i, although this association is attenuated by the rises in [Ca²⁺]_i. The associations found are consistent with the presence of EVH1-binding motifs in both IP₃RII and TRPC1.

Ca²⁺-dependent association of Homer1 with Orai1 and STIM1

While Homer proteins associate with TRP channels, their association with Orai proteins has not been revealed; hence, we have investigated the association of Homer1 with Orai1 and STIM1 in human platelets by looking for co-immunoprecipitation from platelet lysates. As described above, experiments were conducted using dimethyl-BAPTA-loaded and control platelets in resting conditions and after stimulation with TG or thrombin. In dimethyl-BAPTA-loaded and control platelets, we found a detectable association of Homer1 with both proteins in resting platelets (Figure 2, top panel, lane 1). In dimethyl-BAPTA-loaded cells, treatment for 10 or 30 s with TG or thrombin failed to induce a significant increase in the association between Homer1 and STIM1 or Orai1 (Figures 2A and 2C, top panels; *n* = 6). In contrast, in platelets not loaded with BAPTA, stimulation with 1 μ M TG or 1 unit/ml thrombin in the presence of 1 mM extracellular Ca²⁺ was able to significantly enhance co-immunoprecipitation of Homer1 with STIM1 (Figure 2B, top panel; *P* < 0.05, *n* = 6) or Orai1 (Figure 2D, top panel; *P* < 0.05, *n* = 6). Western blotting of the same membranes with

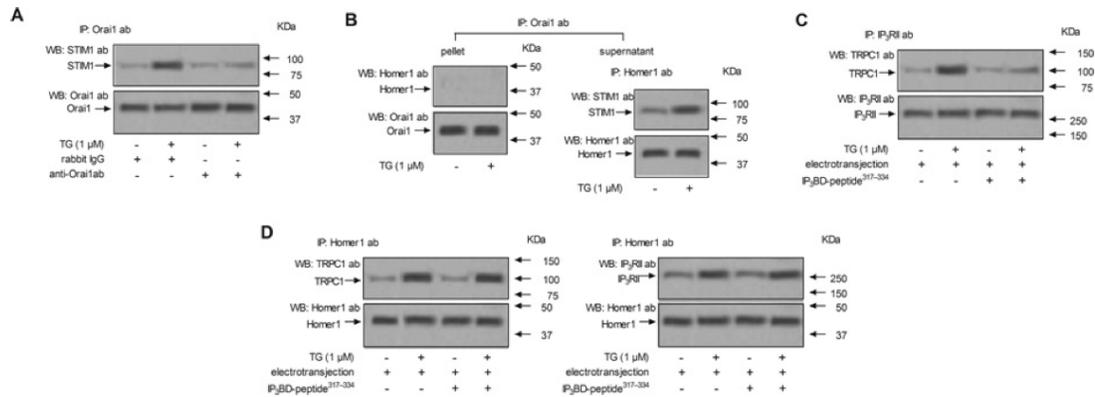


Figure 3 Disruption of the STIM1–Orai1 complex impairs the association of Homer1 with Orai1

(A) Human platelets were electroporated and incubated in the presence of 2 μ M anti-Orai1 C-terminal antibody or 2 μ g/ml rabbit IgG as indicated for 60 min. Cells were incubated in the absence and presence of TG (1 μ M) for 10 s and lysed. Whole-cell lysates were immunoprecipitated (IP) with an anti-Orai1 antibody followed by Western blotting with an anti-STIM1 antibody and reprobing with an anti-Orai1 antibody. (B) Platelets were electroporated and incubated in the presence of 2 μ M anti-Orai1 antibody for 60 min. Cells were incubated in the absence and presence of TG (1 μ M) for 10 s and lysed. Whole-cell lysates were immunoprecipitated (IP) with an anti-Orai1 antibody. The immunoprecipitates were analysed by Western blotting with an anti-Homer1 antibody and reprobed with an anti-Orai1 antibody. The supernatants were immunoprecipitated with an anti-Homer1 antibody followed by Western blotting with an anti-STIM1 antibody and reprobing with an anti-Homer1 antibody. (C) Human platelets were electroporated and incubated in the absence or presence of 2 μ M IP₃BD-peptide^{317–334}, as indicated, for 60 min. Cells were incubated in the absence and presence of TG (1 μ M) for 10 s and lysed. Whole-cell lysates were immunoprecipitated (IP) with an anti-IP₃R II antibody followed by Western blotting with an anti-TRPC1 antibody and reprobing with an anti-IP₃R II antibody. (D) Platelets were electroporated and incubated in the absence or presence of 2 μ M IP₃BD-peptide^{317–334}, as indicated, for 60 min. Cells were incubated in the absence and presence of TG (1 μ M) for 10 s and lysed. Whole-cell lysates were immunoprecipitated (IP) with an anti-Homer1 antibody followed by Western blotting with an anti-TRPC1 or anti-IP₃R II antibody. Membranes were reprobed with the immunoprecipitating antibody. Positions of molecular mass markers are shown on the right-hand side. ab, antibody; WB, Western blot.

the anti-Homer1 antibody confirmed a similar protein content in all lanes (Figure 2, middle panels). Similar results were observed when we tested the effect of a low concentration of thrombin. As shown in Figure 2(E), platelet stimulation with 0.05 unit/ml thrombin enhanced the association between STIM1 and Orai1 with Homer1, only in the presence of 1 mM extracellular Ca²⁺ and the absence of dimethyl-BAPTA. Reprobing of the membranes with an anti-Homer1 antibody confirmed a similar protein content in all lanes (results not shown). These observations indicate that Homer1 associates with STIM1 and Orai1 through a Ca²⁺-dependent mechanism. Despite STIM1 having an apparent EVH1-binding motif, this has not been found in Orai1, which suggests that the interaction of Homer1 with Orai1, as detected by co-immunoprecipitation, might be indirect and due to its association with STIM1. It could also be explained by indirect pull down of Orai1 associated with TRPC1, which has an EVH1-binding motif and associates with Orai1 in human platelets [10]; however, this possibility is unlikely since co-immunoprecipitation of Homer1 with Orai1 and TRPC1 is differentially regulated by cytosolic Ca²⁺.

Interaction of Homer1 with Orai1 depends on its association with STIM1

We have further investigated whether the association of Homer1 with STIM1, Orai1, IP₃R II or TRPC1 requires the stability of the STIM1–Orai1 or the IP₃R II–TRPC1 complexes. We have previously demonstrated disruption of the STIM1–Orai1 association by electrotransfection of an anti-Orai1 C-terminal antibody into platelets [10]. The amino acid sequence 288–301 of human Orai1 recognized by the anti-Orai1 C-terminal antibody used has been shown to be essential for the interaction of Orai1 with STIM1 [32]. Our results indicate that introduction of the anti-Orai1 C-terminal antibody into cells abolished the

TG-induced STIM1–Orai1 association as compared with cells where a rabbit IgG, of the same nature of the anti-Orai1 antibody used, was introduced (Figure 3A). As shown in Figure 3(B), introduction of the anti-Orai1 C-terminal antibody into cells impairs the TG-evoked association of Homer 1 with Orai1, but not with STIM1, suggesting that the association of Homer1 with Orai1 is indirect and mediated by STIM1, which is consistent with the lack of Homer-binding ligand in Orai1. Furthermore, we have investigated whether disruption of the IP₃R II–TRPC1 complex alters the association of Homer1 with both proteins. To impair the association between TRPC1 and IP₃R II we have followed a previously reported procedure [13] consisting of the introduction into platelets of a peptide corresponding to the amino acid sequence 317–334 of the IP₃BD of the IP₃R II (IP₃BD-peptide^{317–334}), which we have previously found prevents the coupling between TRPC1 and IP₃R II induced by TG, but not the interaction between hTRPC1 (human TRPC1) and STIM1 in human platelets [13]. As shown in Figures 3(C) and 3(D), introduction of the IP₃BD-peptide^{317–334}, which impairs TG-evoked coupling between TRPC1 and IP₃R II (Figure 3C), did not significantly alter TG-induced association of Homer1 with TRPC1 or IP₃R II, thus suggesting that this association might be direct or, at least, does not depend on, the association of TRPC1 and IP₃R II with each other.

Homers play a relevant role in the association of STIM1–Orai1 and TRPC1–IP₃R II

Homer proteins specifically bind to the sequence PPXXF through the EVH1 domain [14,15] present in a variety of Ca²⁺-handling proteins, including TRPC channels [16]. In order to impair Homer function we introduced the synthetic peptide PPKKFR, which emulates the proline-rich sequences of the PPXXF motif into reversibly permeabilized cells. This peptide is expected to interact

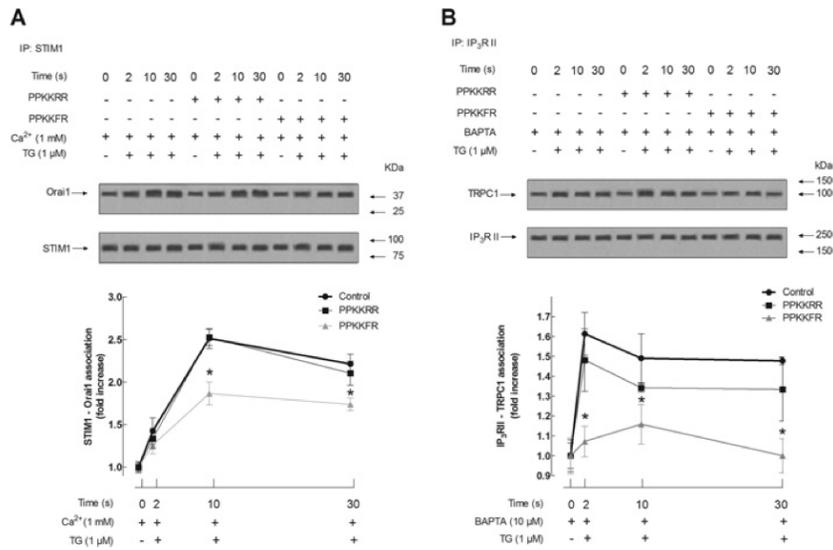


Figure 4 Homers play a relevant role in STIM1–Orai1 and TRPC1–IP₃R1I interactions

Human platelets were electropermeabilized and incubated in the presence of 1 μM PPKKRR peptide, 1 μM PPKKFR peptide or the vehicle (Control) for 60 min. Cells were incubated with TG (1 μM) and lysed at the times indicated. Whole-cell lysates were immunoprecipitated (IP) with an anti-STIM1 antibody (A) or an anti-IP₃R1I antibody (B). Immunoprecipitates were analysed by Western blotting using an anti-Orai1 (A) or an anti-TRPC1 antibody (B). Membranes were reprobbed with the immunoprecipitating antibody (middle panel). Positions of molecular mass markers are shown on the right-hand side. Results are representative of six independent experiments. Values are means ± S.E.M. for six independent experiments. **P* < 0.05 compared with cells electropermeabilized with vehicle or PPKKRR peptide.

with Homer proteins, impairing their interaction with others proteins. As a control we used the inactive peptide PPKKRR. Introduction of PPKKFR into platelets reduced the association of STIM1 and Orai1 stimulated by thrombin as compared with cells where the negative control peptide (PPKKRR) was introduced and control cells (not incubated with peptides but otherwise treated as PPKKFR-incubated cells). PPKKFR significantly reduced the TG-evoked interaction between STIM1 and Orai1 after 10 and 30 s of treatment, without having any effect at earlier times (Figure 4A; *P* < 0.05, *n* = 6). Treatment with the PPKKFR peptide did not alter the association between these proteins in resting cells (Figure 4A). In addition, PPKKFR peptide in dimethyl-BAPTA-loaded platelets attenuated the TG-evoked association of TRPC1 and IP₃R1I at all of times investigated (2–30 s), without having any effect on the association between these proteins in non-stimulated cells (Figure 4B; *P* < 0.05, *n* = 6).

Taking into account the findings described above, our results indicate that Homer1 associates with TRPC1 and IP₃R1I upon stimulation with TG or thrombin in cells heavily loaded with dimethyl-BAPTA, suggesting that this mechanism is independent of changes in [Ca²⁺]_c. In contrast, the association of Homer1 with STIM1/Orai1 is entirely dependent on rises in [Ca²⁺]_c, since this event is prevented by dimethyl-BAPTA loading. The association of Homer1 with TRPC1 and IP₃R1I is, by contrast, inhibited when [Ca²⁺]_c rises. Furthermore, we have found that the early stages of the association between STIM1 and Orai1 are less sensitive to PPKKFR than the initial stage of the association of TRPC1 with IP₃R1I, which is almost abolished by PPKKFR treatment 2 s after stimulation with TG. In summary, these findings indicate that Homers play a more relevant role in the initial stages of the association between TRPC1–IP₃R1I, when [Ca²⁺]_c is still low. Interestingly, although Homers seem to be important for the entire process of TRPC1–IP₃R1I coupling, it seems that they are not

involved in the initial stages of the STIM1–Orai1 interaction, but to its maintenance upon rises in [Ca²⁺]_c.

Homers play a role in agonist-induced Ca²⁺ entry in human platelets

We have further investigated the role of Homer proteins in the activation of Ca²⁺ entry. Figure 5(A) shows that introduction of PPKKFR to fura-2-loaded human platelets in stirred cuvettes at 37 °C resulted in a substantial inhibition of the increase in [Ca²⁺]_c evoked by thrombin (1 unit/ml) in a medium containing 1 mM Ca²⁺. The initial slope of the thrombin-evoked response was not significantly altered (0.0626 ± 0.0069 in control cells, 0.0637 ± 0.0089 in cells treated with PPKKFR and 0.0601 ± 0.0066 in cells treated with PPKKFR respectively; *P* > 0.05, *n* = 6), suggesting that the initial steps of Ca²⁺ elevation after platelet stimulation with thrombin does not require Homer. In contrast, a few seconds after the initiation of [Ca²⁺]_c elevation, platelets treated with the PPKKFR peptide reported a significantly smaller rise in [Ca²⁺]_c upon thrombin stimulation as compared with control or PPKKRR-treated cells (Figure 5; *P* < 0.05, *n* = 6). As a result, the integral of the rise in [Ca²⁺]_c for 2.5 min after addition of the agonist was reduced from 11294 ± 160 nM/s and 11623 ± 200 nM/s in control and PPKKRR-treated cells respectively, to 8256 ± 220 nM/s in cells treated with PPKKFR (Figure 5B). Similar results were observed when we performed the experiments in the presence of a low concentration of thrombin (0.05 unit/ml) as shown in Figure 5(C). Since thrombin-evoked Ca²⁺ release is not modified by introduction of PPKKFR (results not shown), our results suggest that, despite the fact that the initial increase in [Ca²⁺]_c evoked by thrombin does not require Homer, a second step for Ca²⁺ entry depends on the activity of Homer.

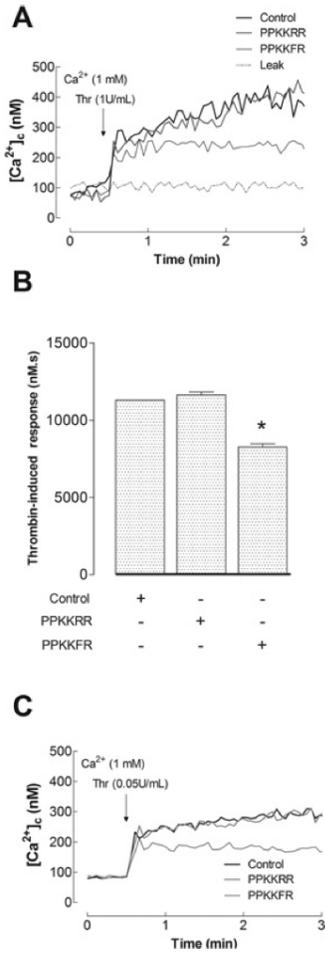


Figure 5 Homers are important for thrombin-evoked Ca²⁺ entry

Human platelets were electroporated and incubated in the presence of 1 μ M PPKKRR peptide, 1 μ M PPKKFR peptide or the vehicle (Control) for 60 min. Fura-2-loaded cells were then stimulated with 1 unit/ml thrombin (A) or 0.05 unit/ml thrombin (C) in the presence of 1 mM extracellular Ca²⁺. The traces shown are representative of six separate experiments. (B) Histograms indicating the amount of Ca²⁺ mobilization induced by 1 unit/ml thrombin in the presence of PPKKFR peptide, PPKKRR peptide or the vehicle as a control. Values are means \pm S.E.M. **P* < 0.05 compared with the control.

To investigate further the effect of Homer on Ca²⁺ entry, we explored the role of these proteins in SOCE. As shown in Figure 6(A), introduction of the PPKKFR peptide into platelets did not significantly attenuate TG-induced rises in [Ca²⁺]_i during the first 60 s after the addition of TG. As for thrombin, the initial slope of TG-evoked [Ca²⁺]_i elevation was not significantly altered in cells where the PPKKFR peptide had been introduced (the initial slope was 0.0387 \pm 0.0060 in control cells, 0.0357 \pm 0.0039 in cells treated with PPKKRR and 0.0398 \pm 0.0076 in cells treated with PPKKFR), therefore suggesting that Homers are not necessary for the first steps of SOCE. However, PPKKFR attenuated TG-evoked Ca²⁺ elevation after 60 s of treatment (Figure 6A), which suggests that Homers are important for the maintenance of TG-induced SOCE. To confirm this possibility we stimulated cells with TG in Ca²⁺-free medium and 3 min later CaCl₂ was added to the medium

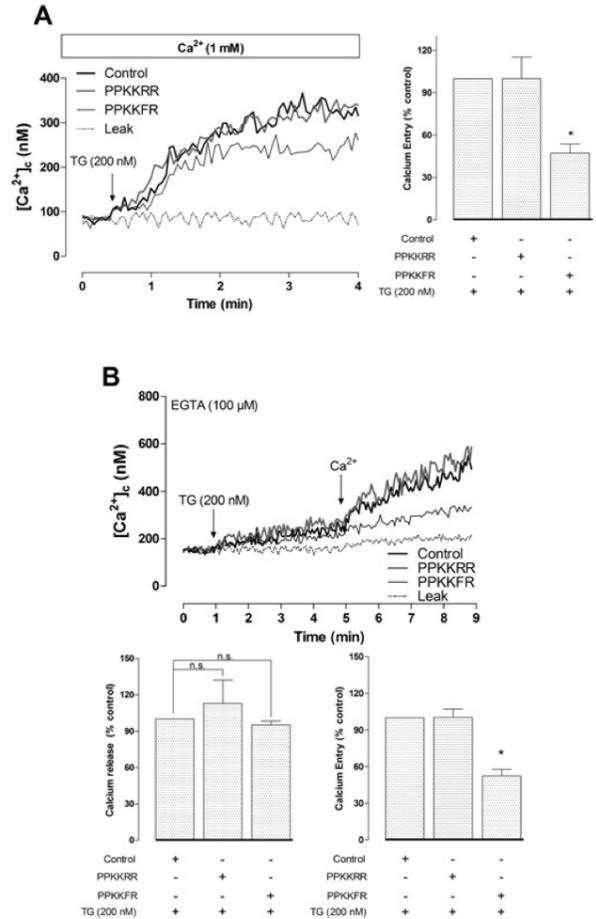


Figure 6 Homers are not relevant for the initial stage of TG-evoked Ca²⁺ entry, but are important for its maintenance

Human platelets were electroporated and incubated in the presence of 1 μ M PPKKRR peptide, 1 μ M PPKKFR peptide or the vehicle (Control) for 60 min. (A) Fura-2-loaded cells were stimulated with 200 nM TG in the presence of 1 mM extracellular Ca²⁺. The traces shown are representative of six separate experiments. Histograms indicating the amount of Ca²⁺ entry in the presence of PPKKFR peptide, PPKKRR peptide or the vehicle as a control. Values are means \pm S.E.M. **P* < 0.05 compared with the control. (B) Cells were suspended in a Ca²⁺-free medium (100 μ M EGTA added) and stimulated with 200 nM TG and, 4 min later, Ca²⁺ (300 μ M) was added to initiate Ca²⁺ entry. Traces shown are representative of six separate experiments. Histograms indicating the amount of Ca²⁺ release (left-hand side) and entry (right-hand side) in the presence of PPKKFR peptide, PPKKRR peptide or the vehicle as a control. Values are means \pm S.E.M. **P* < 0.05 compared with the control.

to initiate Ca²⁺ entry. In the absence of extracellular Ca²⁺, the addition of TG (200 nM) to fura-2-loaded platelets induced an elevation in [Ca²⁺]_i due to the release of Ca²⁺ from intracellular stores (Figure 6B). The elevation of [Ca²⁺]_i induced by TG in Ca²⁺-free medium was not significantly modified either by the introduction of PPKKFR peptide or the negative control PPKKRR peptide (Figure 6B, left-hand histogram), suggesting that these peptides did not alter the ability of platelets to accumulate Ca²⁺ into the stores or the Ca²⁺ leakage rate. As shown in Figure 6(B), subsequent addition of CaCl₂ (1 mM) to the external medium resulted in a sustained increase in [Ca²⁺]_i, indicative of SOCE. Introduction of the PPKKFR peptide significantly decreased TG-induced Ca²⁺ influx by 50 % as compared with controls or cells

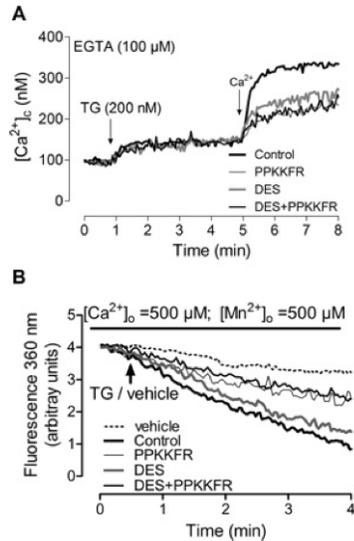


Figure 7 PPKKFR impairs both Orai1- and TRPC-mediated function

Human platelets were electroporated and incubated in the presence of 1 μM PPKKFR peptide for 60 min. Cells were then treated for 5 min with 1 μM DES or the vehicle (Control). (A) Cells were suspended in a Ca²⁺-free medium (100 μM EGTA added) and stimulated with 200 nM TG and, 4 min later, Ca²⁺ (300 μM) was added to initiate Ca²⁺ entry. (B) At the time of the experiment, CaCl₂ (500 μM) and 500 μM Mn²⁺ were added. Fura-2 fluorescence was measured at the isoemissive excitation wavelength of 360 nm. Platelets were either left untreated (vehicle) or stimulated with TG (200 nM). Traces are representative of four separate experiments.

treated with PPKKRR (Figure 6B, right-hand histogram). The role of Homers in the maintenance of TG-evoked SOCE and in the association between TRPC1 and IP₃R2 is consistent with our previous findings reporting a role for the TRPC1-IP₃R2 complex in the maintenance of SOCE in human platelets [13].

We have further explored the role of Homer on Orai1- and TRPC-mediated Ca²⁺/cation entry. Treatment of human platelets with the CRAC channel inhibitor DES [33] (1 μM) for 5 min [34] significantly reduced TG-induced Ca²⁺ entry by 36% (Figure 7A). Treatment of platelets with PPKKFR peptide reduced TG-evoked Ca²⁺ entry to a greater extent than DES alone, and treatment with PPKKFR peptide in combination with DES did not enhance the inhibitory effect of PPKKFR peptide, thus suggesting that PPKKFR peptide inhibits Orai1 function, although there might be an independent pathway for TG-induced Ca²⁺ entry that is also regulated by Homers. We have further investigated whether this Orai1-independent pathway involves TRPC channels. To explore this issue, we tested the role of DES and PPKKFR peptide on Mn²⁺ entry. In the presence of extracellular Ca²⁺, Orai1 is very selective for Ca²⁺ and quite impermeable to Na⁺ and other cations [35,36]; however, TRPC channels are non-selective cation channels that conduct Mn²⁺ entry [6]. As shown in Figure 7(B), although DES has a minor effect on Mn²⁺ entry in human platelets, PPKKFR peptide significantly reduced (TRPC-mediated) Mn²⁺ entry. Taken together, the results of the present study indicate that Homers are important for both Orai1- and TRPC-mediated cation currents.

Role of Homer in agonist-induced platelet aggregation

Finally, we have investigated the possible role of Homer in thrombin-stimulated platelet aggregation. Introduction of the PPKKFR peptide into platelets significantly reduced platelet

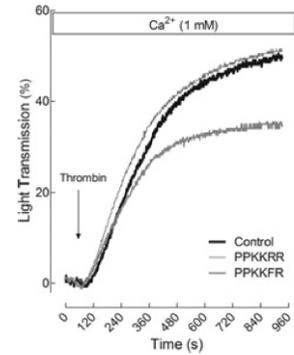


Figure 8 Homers play an important role in thrombin-stimulated platelet aggregation

Electroporated platelets were incubated in the presence of 1 μM PPKKRR peptide, 1 μM PPKKFR peptide or the vehicle (Control) for 60 min. Cells were stimulated in the presence of 1 mM Ca²⁺ with 0.05 unit/ml thrombin. Aggregation of human platelets was induced at a shear rate of 1200 rev/min at 37 °C in an aggregometer. Traces shown are representative of six separate experiments.

Table 1 Role of Homer in thrombin-stimulated platelet aggregation

Stimulatory agent	Lag time (min)	Percentage rate	Percentage aggregation
Control	0.042 ± 0.006	16.0 ± 2.1	51.5 ± 2.4
PPKKRR	0.030 ± 0.003	16.2 ± 1.4	50.3 ± 3.5
PPKKFR	0.050 ± 0.019	15.5 ± 1.9	33.3 ± 6.2*

aggregation in response to a submaximal concentration of thrombin (0.05 unit/ml) as compared with the response observed in cells where the PPKKRR peptide was introduced or in control cells (Figure 8 and Table 1; $P < 0.05$, $n = 6$).

The EVH1 domain is a protein module of approximately 115 amino acids identified in the *Drosophila* protein Ena and the closely related mammalian VASP. EVH1 domains have also been found in a number of scaffolding proteins that mediate the multiprotein complex assembly associated with actin filament remodelling and signal transduction in postsynaptic compartments of certain chemical synapses [37]. EVH1 domains can be grouped into two classes on the basis of the consensus sequences of their target ligands: class I EVH1 domains bind to the consensus-binding motif FPxφP (where φ is a hydrophobic residue), present in the focal-adhesion proteins zyxin and vinculin [38,39], whereas class II EVH1 domains recognize a different consensus motif, PPxxF, reported in the IP₃Rs, RyRs, TRPC1 and group I mGluRs (metabotropic glutamate receptors) [14,40,41]. Class II EVH1 domains have only been reported in the Homer family of proteins, including Homer 1, Homer 2 and Homer 3 [37]. Therefore, despite the fact that we have demonstrated association of Homer 1 with proteins of the Ca²⁺ entry pathway, it should be noted that the effect observed after introduction of the PPKKFR peptide might be mediated by any of the Homer isoforms. On the other hand, since platelets do not express RyRs or mGluRs, the downstream effectors of Homer proteins whose regulation is impaired by the PPKKFR peptide are likely to be the IP₃Rs, TRPC1 and proteins containing analogue-binding motifs, such as STIM1.

In summary, the results of the present study provide evidence for the direct or indirect association of Homer1 with the Ca^{2+} handling proteins TRPC1, IP_3RII , STIM1 and Orai1 (the latter lacks PPXXF or LPSSP sequences). Introduction of PPKKFR peptide in order to impair the interaction of Homers with proteins containing the PPXXF motif results in attenuated Ca^{2+} entry and aggregation, which indicates that Homers play a role in thrombin-stimulated platelet function. Binding of Homers is probably not confined to TRPC1, IP_3RII , STIM1 and Orai1; therefore, with the experimental procedure used we cannot exclude the possibility that the effects of Homers on Ca^{2+} signalling and platelet aggregation occur through their interaction with other cellular proteins, although the role of Homers is probably mediated by the regulation of Ca^{2+} entry through their involvement in the association of STIM1 with Orai1, as well as between TRPC1 and IP_3RII .

AUTHOR CONTRIBUTION

Isaac Jardín participated in the experimental design and performance, and the final discussion; Letizia Albarrán and Nuria Bermejo collaborated in performing the experiments and final discussions; Ginés Salido was involved in the design of the study, discussion and editing of the paper; and Juan Rosado participated in the design and performing of the experiments, discussions and drafting the paper.

FUNDING

This work was supported by MINECO (Spanish Ministry of Economy and Competitiveness) [grant number BFU2010-21043-C02-01]; and Junta de Extremadura-FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional) [grant number GR10010]. I.J. and L.A. were supported by MEC (Ministerio de Educación y Ciencia) fellowships [grant numbers BFU2007-60104 and BES-2011-043356].

REFERENCES

- Jardín, I., Lopez, J. J., Pariente, J. A., Salido, G. M. and Rosado, J. A. (2008) Intracellular calcium release from human platelets: different messengers for multiple stores. *Trends Cardiovasc. Med.* **18**, 57–61
- Putney, J. W. (2009) Capacitative calcium entry: from concept to molecules. *Immunol. Rev.* **231**, 10–22
- 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. et al. (2005) STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca^{2+} channel function. *J. Cell Biol.* **169**, 435–445
- Zbidi, H., Jardín, I., Woodard, G. E., Lopez, J. J., Bernal-Ero, A., Salido, G. M. and 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
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S. H., Tanasa, B., Hogan, P. G., Lewis, R. S., Daly, M. and Rao, A. (2006) A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* **441**, 179–185
- Rosado, J. A., Brownlow, S. L. and 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
- Worley, P. F., Zeng, W., Huang, G. N., Yuan, J. P., Kim, J. Y., Lee, M. G. and Muallem, S. (2007) TRPC channels as STIM1-regulated store-operated channels. *Cell Calcium* **42**, 205–211
- Muik, M., Fahrner, M., Schindl, R., Stathopoulos, P., Frischauf, I., Derler, I., Plenk, P., Lackner, B., Groschner, K., Ikura, M. and Romanin, C. (2011) STIM1 couples to Orai1 via an intramolecular transition into an extended conformation. *EMBO J.* **30**, 1678–1689
- Zeng, W., Yuan, J. P., Kim, M. S., Choi, Y. J., Huang, G. N., Worley, P. F. and Muallem, S. (2008) STIM1 gates TRPC channels, but not Orai1, by electrostatic interaction. *Mol. Cell* **32**, 439–448
- Jardín, I., Lopez, J. J., Salido, G. M. and Rosado, J. A. (2008) Orai1 mediates the interaction between STIM1 and hTRPC1 and regulates the mode of activation of hTRPC1-forming Ca^{2+} channels. *J. Biol. Chem.* **283**, 25296–25304
- Samproni, A., Zepeda, A., Saldaña, C., Salgado, A. and 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
- Kiselyov, K., Mignery, G. A., Zhu, M. X. and Muallem, S. (1999) The N-terminal domain of the IP_3 receptor gates store-operated hTrp3 channels. *Mol. Cell* **4**, 423–429
- Jardín, I., Lopez, J. J., Salido, G. M. and Rosado, J. A. (2008) 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. Signalling* **20**, 737–747
- Yuan, J. P., Kiselyov, K., Shin, D. M., Chen, J., Shcheynikov, N., Kang, S. H., Dehoff, M. H., Schwarz, M. K., Seeburg, P. H., Muallem, S. and Worley, P. F. (2003) Homer binds TRPC family channels and is required for gating of TRPC1 by IP_3 receptors. *Cell* **114**, 777–789
- Barzik, M., Carl, U. D., Schubert, W. D., Frank, R., Wehland, J. and Heinz, D. W. (2001) The N-terminal domain of Homer/Ves1 is a new class II EVH1 domain. *J. Mol. Biol.* **309**, 155–169
- Yuan, J. P., Lee, K. P., Hong, J. H. and Muallem, S. (2012) The closing and opening of TRPC channels by Homer1 and STIM1. *Acta Physiol. (Oxford)* **204**, 238–247
- Strausberg, R. L., Feingold, E. A., Grouse, L. H., Derge, J. G., Klausner, R. D., Collins, F. S., Wagner, L., Shenmen, C. M., Schuler, G. D., Altschul, S. F. et al. (2002) Generation and initial analysis of more than 15000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 16899–16903
- Ju, Y. K., Liu, J., Lee, B. H., Lai, D., Woodcock, E. A., Lei, M., Cannell, M. B. and Allen, D. G. (2011) Distribution and functional role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in mouse sinoatrial node. *Circ. Res.* **109**, 848–857
- Shin, D. M., Dehoff, M., Luo, X., Kang, S. H., Tu, J., Nayak, S. K., Ross, E. M., Worley, P. F. and Muallem, S. (2003) Homer 2 tunes G protein-coupled receptors stimulus intensity by regulating RGS proteins and PLC β GAP activities. *J. Cell Biol.* **162**, 293–303
- Huang, G. N., Huso, D. L., Bouyain, S., Tu, J., McCorkell, K. A., May, M. J., Zhu, Y., Lutz, M., Collins, S., Dehoff, M. et al. (2008) NFAT binding and regulation of T cell activation by the cytoplasmic scaffolding Homer proteins. *Science* **319**, 476–481
- Rosado, J. A. and Sage, S. O. (2000) 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
- Dionisio, N., Albarrán, L., Bernal-Ero, A., Hernandez-Cruz, J. M., Salido, G. M. and Rosado, J. A. (2011) Functional role of the calmodulin- and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-binding (CIRB) site of TRPC6 in human platelet activation. *Cell. Signalling* **23**, 1850–1856
- Lopez, J. J., Salido, G. M., Gomez-Arteta, E., Rosado, J. A. and Pariente, J. A. (2007) Thrombin induces apoptotic events through the generation of reactive oxygen species in human platelets. *J. Thromb. Haemostasis* **5**, 1283–1291
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R. Y. (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**, 3440–3450
- Redondo, P. C., Harper, M. T., Rosado, J. A. and 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
- Jardín, I., Redondo, P. C., Salido, G. M. and Rosado, J. A. (2008) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate enhances store-operated calcium entry through hTRPC6 channel in human platelets. *Biochim. Biophys. Acta* **1783**, 84–97
- Watson, S. P. and Authi, K. S. (1996) Platelets: a Practical Approach. IRL Press, Oxford
- Redondo, P. C., Ben-Amor, N., Salido, G. M., Bartegi, A., Pariente, J. A. and Rosado, J. A. (2005) Ca^{2+} -independent activation of Bruton's tyrosine kinase is required for store-mediated Ca^{2+} entry in human platelets. *Cell. Signalling* **17**, 1011–1021
- Bouzaz, A., Amor, N. B., Woodard, G. E., Zibidi, H., Lopez, J. J., Bartegi, A., Salido, G. M. and Rosado, J. A. (2007) Tyrosine phosphorylation/dephosphorylation balance is involved in thrombin-evoked microtubular reorganization in human platelets. *Thromb. Haemostasis* **98**, 375–384
- Rosado, J. A., Graves, D. and Sage, S. O. (2000) Tyrosine kinases activate store-mediated Ca^{2+} entry in human platelets through the reorganization of the actin cytoskeleton. *Biochem. J.* **351**, 429–437
- Jardín, I., Gomez, L. J., Salido, G. M. and Rosado, J. A. (2009) Dynamic interaction of hTRPC6 with the Orai1/STIM1 complex or hTRPC3 mediates its role in capacitative or non-capacitative Ca^{2+} entry pathways. *Biochem. J.* **420**, 267–276
- Muik, M., Frischauf, I., Derler, I., Fahrner, M., Bergsmann, J., Eder, P., Schindl, R., Hesch, C., Polzinger, B., Fritsch, R. et al. (2008) Dynamic coupling of the putative coiled-coil domain of Orai1 with STIM1 mediates Orai1 channel activation. *J. Biol. Chem.* **283**, 8014–8022
- Zakharov, S. I., Smani, T., Dobrydneva, Y., Monje, F., Fichandler, C., Blackmore, P. F. and Bolotina, V. M. (2004) Diethylstilbestrol is a potent inhibitor of store-operated channels and capacitative Ca^{2+} influx. *Mol. Pharmacol.* **66**, 702–707
- Dominguez-Rodriguez, A., Diaz, I., Rodriguez-Moyano, M., Calderon-Sanchez, E., Rosado, J. A., Ordóñez, A. and Smani, T. (2012) Urotensin-II signaling mechanism in rat coronary artery: role of STIM1 and Orai1-dependent store operated calcium influx in vasoconstriction. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* **32**, 1325–1332

- 35 McNally, B. A., Yamashita, M., Engh, A. and Prakriya, M. (2009) Structural determinants of ion permeation in CRAC channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 22516–22521
- 36 DeHaven, W. I., Smyth, J. T., Boyles, R. R. and Putney, Jr, J. W. (2007) Calcium inhibition and calcium potentiation of Orai1, Orai2, and Orai3 calcium release-activated calcium channels. *J. Biol. Chem.* **282**, 17548–17556
- 37 Ball, L. J., Jarchau, T., Oschkinat, H. and Walter, U. (2002) EVH1 domains: structure, function and interactions. *FEBS Lett.* **513**, 45–52
- 38 Ball, L. J., Kuhne, R., Hoffmann, B., Hafner, A., Schmieder, P., Volkmer-Engert, R., Hof, M., Wahl, M., Schneider-Mergener, J., Walter, U. et al. (2000) Dual epitope recognition by the VASP EVH1 domain modulates polyproline ligand specificity and binding affinity. *EMBO J.* **19**, 4903–4914
- 39 Reinhard, M., Jouvenal, K., Tripiet, D. and Walter, U. (1995) Identification, purification, and characterization of a zyxin-related protein that binds the focal adhesion and microfilament protein VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 7956–7960
- 40 Tu, J. C., Xiao, B., Yuan, J. P., Lanahan, A. A., Leoffert, K., Li, M., Linden, D. J. and Worley, P. F. (1998) Homer binds a novel proline-rich motif and links group 1 metabotropic glutamate receptors with IP₃ receptors. *Neuron* **21**, 717–726
- 41 Tu, J. C., Xiao, B., Naisbitt, S., Yuan, J. P., Petralia, R. S., Brakeman, P., Doan, A., Aakalu, V. K., Lanahan, A. A., Sheng, M. and Worley, P. F. (1999) Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins. *Neuron* **23**, 583–592

Received 19 March 2012/13 April 2012; accepted 17 April 2012
Published as BJ Immediate Publication 17 April 2012, doi:10.1042/BJ20120471

4.3. Relación entre la movilización de calcio extracelular e intracelular y la secreción de gránulos plaquetarios.

Relationship between extracellular and intracellular calcium mobilization and platelet granule secretion.

Bermejo N², Berna-Erro A¹, Lopez E¹, Salido GM¹, Redondo PC¹ and Rosado JA¹

¹ Department of Physiology, University of Extremadura, Phycell, 10003, Cáceres, Spain.

² Department of Hematology of San Pedro de Alcántara Hospital, 10003, Cáceres, Spain.

Running title: Calcium regulation role in platelet secretion

Key word: calcium, α -granules, δ -granules, mepacrine, P-selectin

*Corresponding author:

Juan A Rosado, University Lecture

Department of Physiology

Veterinary Faculty

University of Extremadura

10003, Spain.

Tel: 0034 927 25 7

Fax: 0034 927 25 71 10

Email: jarosado@unex.es

ABSTRACT

Changes in cytosolic calcium concentration ($[Ca^{2+}]_c$) regulate phosphorylation of important intracellular signaling players, cytoskeleton reorganization, granule secretion and shape change in platelets among others, being all of them important mechanisms that are required for platelet activation and aggregation. Thrombin (Thr) activates protease activated receptors (PAR1 and PAR4) and promotes platelet stimulation, resulting in the differential release of calcium (Ca^{2+}) located into different intracellular stores, which in turn activate a mechanism of Ca^{2+} entry from the extracellular medium into the cell, referred as store-operated Ca^{2+} entry (SOCE). SOCE is considered the main mechanism of Ca^{2+} entry into platelets and is essential from platelet function. A crucial step during platelet function is the release of physiologic agonists stored inside granules located in the cytosol to the extracellular compartment during activation. We aim to study the role of Ca^{2+} mobilization from different intracellular stores or entry from extracellular medium in platelet granule secretion. By using cytometry techniques, we have found that α -granules and δ -granules are mobilized from Thr-stimulated platelets in the absence of extracellular Ca^{2+} , and in a Thr concentration-dependent manner (0.01-0.5 U/ml Thr). By depleting cytosolic Ca^{2+} using BAPTA, we have found that Thr-stimulated granule secretion relays mostly on cytosolic Ca^{2+} changes than on extracellular Ca^{2+} entry. However, Ca^{2+} mobilization from intracellular stores is unable to promote granule secretion itself, suggesting that platelet secretion requires additional Ca^{2+} -independent mechanisms to produce fully granule release.

INTRODUCTION

Platelet activation, shape change and secretion relay on changes in cytosolic calcium concentration ($[Ca^{2+}]_c$) [1-2]. Two main models have been proposed to describe how Ca^{2+} may evoke platelet granule secretion: 1) activation of Ca^{2+} -dependent PKC activation [3], and

subsequent phosphorylation of actin depolymerizing proteins. 2) Ca^{2+} -dependent actin filament-severing proteins, like scinderin [4-5]. On the other hand, different autocrine or paracrine molecules have been found stored in both platelet α - and dense (δ)-granules, hence discharge of these granules results in different responses

required for platelet function. Platelet α -granules store mainly paracrine substances, such as von Willebrand factor (vWF), PAF4, vitronectin, etc; while δ -granules contain mostly autocrine platelet agonists such as Ca^{2+} , ADP, ATP and serotonin (5-HT). In this sense, ADP secreted from either platelet δ -granules or erythrocytes evokes a transient Ca^{2+} release from DTS that induces short-term platelet activation and aggregation that may be rapidly reversed [6-7]. Although, stronger platelet agonists like thrombin (Thr) evoke different Ca^{2+} release either from acidic granules or from dense tubular system (DTS) according to its concentration [6]. This differential Ca^{2+} release relies on the sensitivity of both Thr receptors expressed in human platelets (PAR1 and PAR4). Thus, while high-affinity Thr receptors (PAR 4) are activated by low Thr concentration evoking Ca^{2+} release mainly from acidic granules, PAR1 requires large amounts of Thr in order to induce and evokes release of Ca^{2+} mainly from the DTS instead [7-8]. Hence, Ca^{2+} discharge from acidic granules differs from the ones recorded upon DTS depletion in magnitude and temporal pace [6]. Subsequently, it is possible that certain processes involved in platelet function require depletion of both stores, while others may be evoked by

inducing a local increase of $[\text{Ca}^{2+}]_c$. In fact, the presence of α -granule subpopulations containing different protein contents that are differentially released has been described in platelets [9]. In this sense, platelet secretion would require a punctual reorganization of cortical actin cytoskeleton located between membranes of granules and the plasma membrane (PM). Such actin reorganization might allow the molecular interaction between “core secretory proteins” such as SNAP23, SNAP25, syntaxin-11, PM proteins like VAMP3, VAMP7, VAMP8 and accessory proteins required for membrane coupling such as munc13-1, munc13-4, GRP27. Their interaction would facilitate membrane fusion and the subsequently secretion of the granule content to the extracellular compartment [10-13]. Furthermore, similar underlying mechanisms have been proposed during store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) into platelets, where the actin cortical cytoskeleton located nearby the PM must be reorganized in order to allow the molecular contact between proteins located within the DTS membrane and the PM [11,14-17]. Here we aim to study whether local Ca^{2+} discharges from different Ca^{2+} stores may be enough to evoke secretion of platelet granules.

MATERIAL AND METHODS

Materials

Apyrase (grade VII), aspirin, thrombin (Thr), thapsigargin (TG), Dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), sodium citrate, mepacrine®, D-glucose, Adenosine diphosphate (ADP), Bafilomycin, 2,5-di-[tert-butyl]-1,4-hydroquinone (TBHQ), 1,2-Bis [2-aminophenoxy] ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrakis [acetoxymethyl ester] (BAPTA-AM) and bovine serum albumin (BSA) were from Sigma (Poole, Dorset, U.K.). Anti-CD62P-PE antibody, anti-CD41-a PerCP (clone HIP8) were from Becton Dickinson Biosciences, CA. All other reagents were of analytical grade.

Selection of patients and platelet samples preparation

Washed platelets were prepared as described elsewhere [18-19]. Briefly, blood was obtained from healthy drug-free volunteers and mixed with acid/citrate dextrose buffer (5:1 vol./vol.; 85 sodium citrate, 78 citric acid and 111 D-glucose, all in mM) to prevent coagulation. Platelet-rich plasma (PRP) was separated from the whole

blood by centrifugation for 5 min at 700 x g and complemented with aspirin (100 µM) and apyrase (40 µg/mL) to prevent platelet activation. Platelets were isolated from PRP by centrifugation at 350 x g for 20 min, and resuspended in HEPES-buffered saline (HBS, in mM: 145 NaCl, 10 HEPES, 10 D-glucose, 5 KCl, 1 MgSO₄, pH 7.45) supplemented with 0.1% w/v bovine serum albumin and 40 µg/mL apyrase.

Cytometry analysis of platelet granule content and secretion

Specific fluorescence probes were used to detect alpha- (α-) and dense- (δ-) granules, and their secretion was determined by monitoring fluorescence changes in single platelets using a flow cytometer (FASCCan cytometer, Becton-Dickinson, CA). Briefly, approximately 1x10⁶ washed platelets were suspended in 50 µl HBS and stained with anti-CD41 (1:60) antibodies and 10 µM of mepacrine® fluorescence probe at 37 °C for 30 min. Platelets were subsequently stimulated with different agonists (0.01, 0.1 and 0.5 U/mL Thr, 10 nM and 1 µM TG, 10 µM ADP, 1 µM Bafilomycin A1, 20 µM TBHQ) in the absence of cytosolic Ca²⁺ (10 µM BAPTA), and in the absence (100 µM EGTA) or the presence of

extracellular Ca^{2+} (CaCl_2 1.2 mM), and in the presence of anti-P-selectin (10 min). Non-water soluble agonists were reconstituted in a mixture of (1:1 vol.) DMSO/Ethanol (vehicle) and they were administrated in a volume that never reached a final concentration above 0.5% DMSO. The reaction was stopped 10 min after platelet stimulation and the sample was analyzed by FACS.

Platelets were gated first by their size (FSC) and complexity (SSC), and later by the presence of CD41 on their cell surface, which is widely used as a specific marker of the megakaryocytic lineage [20]. δ -granule secretion was assessed by reduction of mepacrine fluorescence and therefore, reduction of mepacrine content in platelets since it is specifically stored in these granules [21-23]. Mepacrine fluorescence is expressed as mean fluorescence intensity (M. F. I. = mepacrine fluorescence – endogenous fluorescence). α -granule secretion was assessed by the detection of the P-selectin exposed on the cell surface, which is specifically stored in these granules [24].

Statistical analysis

Analysis of statistical significance was performed using Student's unpaired *t*-test. Only values with $p < 0.05$ were accepted as significant.

RESULTS

It has been previously reported that SOCE mediated by STIM1 and Orai1 plays an essential function in platelet function and therefore thrombosis and hemostasis [25-29]. Indeed, SOCE seems to be the mayor mechanism of Ca^{2+} entry into murine or human platelets stimulated by their main agonists, such as Thr [25-26,29]. Our group has also recently reported that Homers participates in the regulation of SOCE and platelet function [30]. In order to study the role of SOCE in α - and δ -granule secretion, washed human platelets were stimulated with 0.1 U/mL Thr in the absence (100 μM EGTA) or the presence of extracellular 1.2 mM Ca^{2+} , and the release of mepacrine and CD62P was subsequently assessed (Fig.1). Stimulated platelets secreted both granules in the absence or presence of 1.2 mM Ca^{2+} , indicating a non-essential function of Ca^{2+} entry into platelets in degranulation (Fig.1).

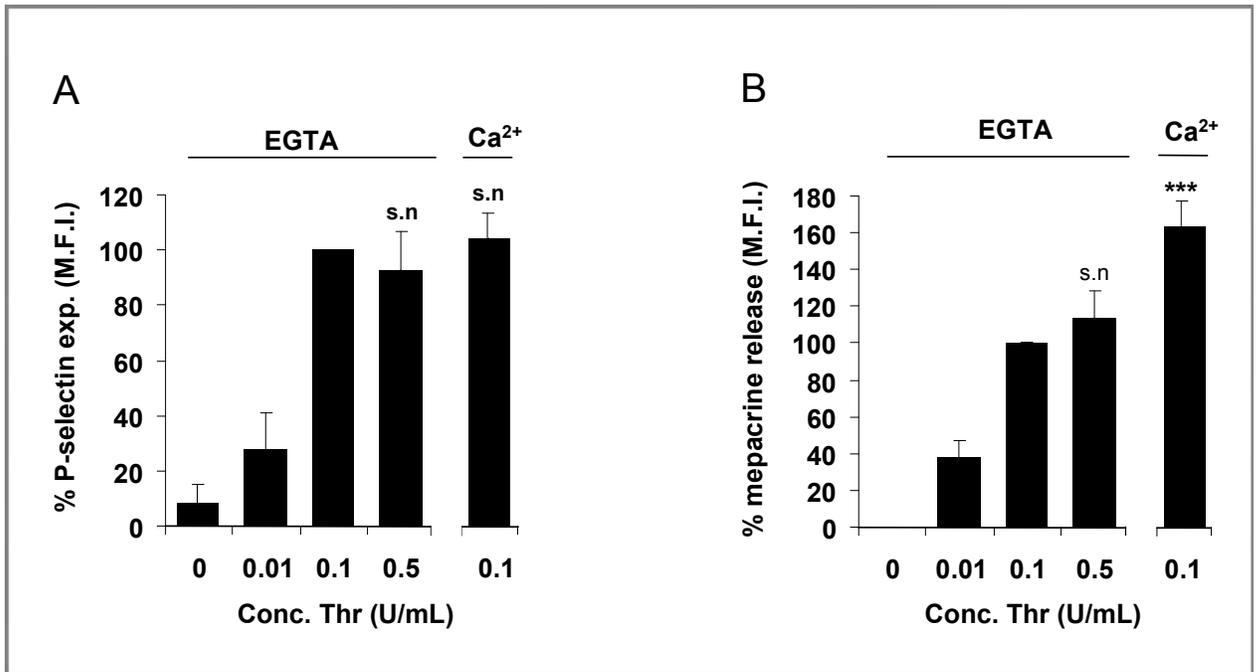


Figure 1. P-selectin surface exposure and mepacrine released from Thr-stimulated platelets in absence and presence of extracellular Ca²⁺. **A)** Bar graphs showing P-selectin exposure on the outer cell surface of platelets stimulated at different concentrations of thrombin (Thr) in the absence (EGTA) or the presence of calcium (Ca²⁺) expressed as the percentage (%) of mean fluorescence intensity (M. F. I.) \pm S. E. M. compared to the maximum exposure obtained in platelets stimulated with 0.1 U/mL Thr in the presence of EGTA. **B)** Bar graphs showing mepacrine release from platelets stimulated at different concentrations of thrombin (Thr) in the absence (EGTA) or the presence of calcium (Ca²⁺) expressed as the percentage (%) of mean fluorescence intensity (M. F. I.) \pm S. E. M. compared to the maximum release obtained from platelets stimulated with 0.1 U/mL Thr in the presence of EGTA. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$.

The release of mepacrine and P-selectin exposure in the absence of extracellular Ca²⁺ increased as the concentration of Thr raised (0.01, 0.1 and 0.5 U/mL) (Fig.1), but reached a maximal secretion or plateau at 0.5 U/ml Thr, indicating a dosage-dependent mechanism of granule secretion in platelets. Upon platelet stimulation with 0.1 U/mL Thr, similar percentage of P-selectin was exposed on the outer cell surface in the

presence of extracellular 1.2 mM Ca²⁺ as compared to those platelets stimulated in the absence of Ca²⁺ (Fig.1A, 100.0% P-selectin exp. in EGTA; 104.6 \pm 8.7 % P-selectin exp. in 1.2 mM Ca²⁺; n = 4; n.s.), indicating an unnecessary function of Ca²⁺ entry in α -granule secretion. In contrast, the percentage of released mepacrine was significantly higher in the presence of extracellular Ca²⁺ as compared to those platelets

stimulated in the absence of Ca^{2+} (Fig. 1B, 100.0 % mepacrine release in EGTA; 164.1 ± 13.1 % mepacrine release in 1.2 mM Ca^{2+} ; $n = 4$; $p < 0.0005$), indicating a higher dependence of δ -granule secretion for extracellular Ca^{2+} . These results suggest a redundant function of SOCE in platelet granule secretion at Thr concentrations of 0.1 U/mL, but an important role of SOCE to potentiate δ -granule release in human platelets. Thus, the function of STIM1 and Orai1 seems to be non-essential for granule secretion in human platelets as previously reported in murine platelets [26,29]. As platelets present diverse intracellular Ca^{2+} deposits located in diverse organelles, whose Ca^{2+} mobilization is important for several cellular functions [31], we studied the role of intracellular Ca^{2+} mobilization in platelet granule secretion (Fig.2). Platelets loaded with the cytosolic Ca^{2+} chelator BAPTA exhibited a reduced P-selectine exposure (Fig.2A1, 100.0 % P-selectine exp.; 22.8 ± 3.6 % P-selectine exp. in BAPTA; $n \geq 4$) and a decreased mepacrine release (Fig.2B1, 100 % mepacrine release; 13.2 ± 13.2 % mepacrine release in BAPTA; $n = 4$; $p < 0.0005$) upon 0.1 U/mL Thr stimulation in the absence of extracellular Ca^{2+} as compared to stimulated BAPTA-free platelets (Fig. 2A1, B1),

indicating an essential function of cytosolic Ca^{2+} changes in both α - and δ -granule secretion as previously reported elsewhere [2]. In order to study the role of Ca^{2+} mobilized from the different intracellular Ca^{2+} stores in granule secretion, we stimulated platelets in the absence of extracellular Ca^{2+} using diverse agonists that specifically deplete acidic Ca^{2+} stores, Ca^{2+} stores located in the endoplasmic reticulum (ER, DTS in platelets) or both (Fig. 2A2-3, B2-3) [6,31]. It has been previously shown that the physiologic agonist ADP might deplete intracellular Ca^{2+} stores mainly located in the DTS at concentrations of $10 \mu\text{M}$ [6]. Platelets stimulated with $10 \mu\text{M}$ ADP resulted in a low mepacrine release and P-selectin exposure (Fig. 2A2, B2, 18.7 ± 6.8 % mepacrine release, 21.5 ± 9 % P-selectin exposure, $n \geq 4$, $p < 0.001$) as compared to platelets stimulated with 0.1 Thr, suggesting a minor role of the Ca^{2+} mobilized from the DTS in α - and δ -granule secretion. Platelets stimulated with 10 nM TG, a sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) pump inhibitor that promotes the passive depletion of Ca^{2+} stored in the DTS at such concentrations [32], exhibit reduced mepacrine secretion (Fig.2B2, 18.6 ± 9.0 %; $n \geq 6$; $p < 0.01$) and an almost absent P-selectine exposure (Fig.2A2, 18.8 ± 10.2 %; $n \geq 8$;

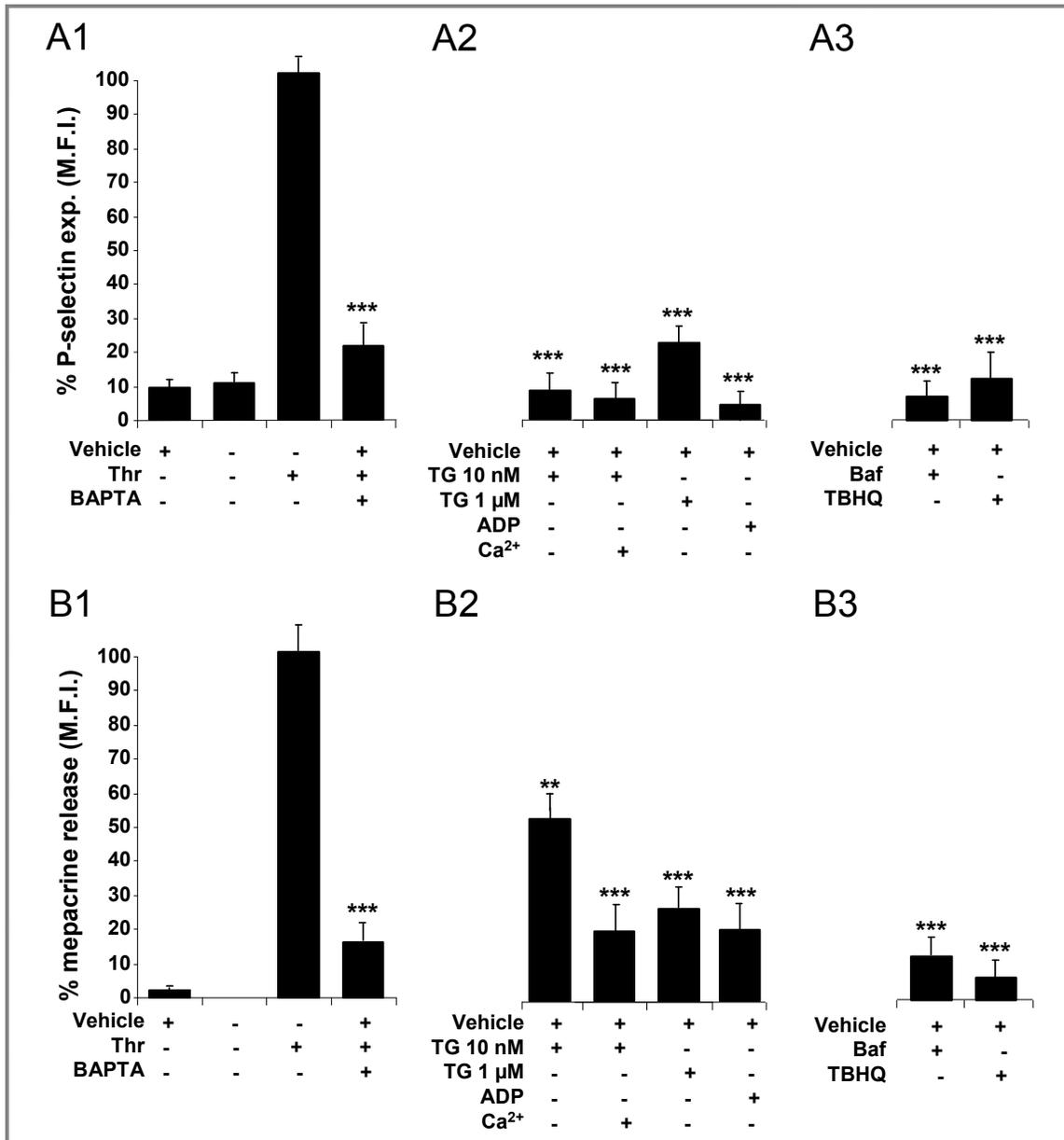


Figure 2. P-selectin surface exposure and mepacrine released from platelets stimulated diverse agonists in the absence or presence (Ca²⁺) of extracellular Ca²⁺. A1-3 Bar graphs e P-selectine exposure on the outer cell surface of platelets stimulated with: **A1**) DMSO (vehicle) as control, 0.1 U/mL thrombin (Thr), 10 μ M BAPTA; **A2**) agonists for DTS depletion such as 10 nM or 1 μ M thapsigargin (TG), 10 μ M ADP in the presence of extracellular (Ca²⁺); **A3**) and agonists for acidic deposit depletion such as 1 μ M Bafilomycin A1 (Baf) and 20 μ M TBHQ, and expressed as the percentage (%) of mean fluorescence intensity (M. F. I.) \pm S. E. M. compared to the maximum exposure obtained in platelets stimulated with 0.1 U/mL Thr in the presence of EGTA. **B1-3**) Bar graphs showing mepacrine release from platelets stimulated with: **B1**) DMSO (vehicle) as control, 0.1 U/mL thrombin (Thr), 10 μ M BAPTA; **B2**) agonists for DTS depletion such as 10 nM or 1 μ M thapsigargin (TG), 10 μ M ADP in the presence of extracellular (Ca²⁺); **B3**) and agonists for acidic deposit depletion such as 1 μ M Bafilomycin A1 (Baf) and 20 μ M TBHQ, and expressed as the percentage (%) of mean fluorescence intensity (M. F. I.) \pm S. E. M. compared to the maximum release obtained from platelets stimulated with 0.1 U/mL Thr in the presence of EGTA. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

$p < 0.001$) as compared to platelets stimulated with 0.1 Thr, reinforcing the idea of the irrelevant role of the Ca^{2+} mobilized from the DTS in granule secretion. Intracellular DTS Ca^{2+} depletion is considered a mechanism that specifically activates SOCE [33]. Stimulation of DTS Ca^{2+} depletion with 10 nM TG in the presence of extracellular Ca^{2+} generated similar percentages of mepacrine release (Fig.2B2, 18.6 ± 9.0 %; $n = 4$; $p < 0.0005$) and P-selectin exposure (Fig.2A2, 3.7 ± 0.01 %; $n = 4$; $p < 0.0005$) than those obtained in the absence of extracellular Ca^{2+} as compared to platelets stimulated with 0.1 Thr (Fig. 2A1, B1), confirming the non-essential function of SOCE in granule secretion. Similar to those observed during DTS depletion, Ca^{2+} mobilization from acidic Ca^{2+} stores using $1 \mu\text{M}$ Bafilomycin A1 [34-35] or $20 \mu\text{M}$ TBHQ [6,32,34] resulted in an almost absent P-selectin exposure or mepacrine release (Fig.2A3, B3, Bafilomycin A1: 10.8 ± 9 % mepacrine release, 3.0 ± 0.5 % P-selectin exposure, $n = 5$, $p < 0.0005$; TBHQ: 2.6 ± 2.6 % mepacrine release, 10.4 ± 4.7 % P-selectin exposure, $n \geq 4$, $p < 0.0005$) as compared to platelets stimulated with 0.1 Thr (Fig.2A1, B1), thus suggesting a minor role of the Ca^{2+} mobilized from acidic stores in α - and δ -granule secretion.

It has been previously reported that increased concentrations of $1 \mu\text{M}$ TG is able to mobilize Ca^{2+} from both acidic stores and the DTS [32]. Platelet stimulated with TG at these concentrations exhibit similar percentages of P-selectin exposure and mepacrine release (Fig.2A2, B2, 25.6 ± 20.3 % mepacrine release, 22.8 ± 10.9 % P-selectin exposure, $n \geq 4$, $p < 0.0005$) as compared to platelets stimulated with 0.1 Thr (Fig. 2A1, B1). The absence of increased granule secretion upon Ca^{2+} mobilization from both intracellular Ca^{2+} stores together, suggest a minor impact of Ca^{2+} mobilization from acidic stores in α - and δ -granule secretion. Taken together, these results suggest that intracellular Ca^{2+} mobilization is not sufficient itself, but it is required for a proper granule secretion in human platelets. Thus, SOCE might not play an important role in granule secretion promoted by Thr stimulation, but probably it requires the coordinated action of alternative Ca^{2+} independent signaling pathways together with intracellular Ca^{2+} mobilization, which in turn might promote Ca^{2+} -dependent signaling pathways.

DISCUSSION

Here we aim to study the role of Ca^{2+} signaling in platelet degranulation. SOCE is considered the

main mechanism of Ca^{2+} entry into non-electrically excitable cells, and it is essential for platelet function [33]. Our results suggests that Ca^{2+} entry into platelets through SOCE or other alternative mechanisms present in human platelets might participate in δ -granule secretion, but is not essential for platelet degranulation in general, since the absence of extracellular Ca^{2+} does not abrogates granule secretion (Fig. 1). Thus, these results imply that molecules involved in SOCE such as STIM and Homers are not neither necessary for granule secretion in human platelets. Previous studies performed in deficient STIM1 or Orai1 murine platelets suggested that both proteins are not necessary for α -granule secretion, since P-selectin surface expression was normal in these cells [26,29]. Our study in human platelets confirms these previous studies performed in murine platelets, but suggests that SOCE and its molecular machinery might have a more prominent function in δ -granule granule secretion (Fig. 1). Additionally, our study addressed the question whether the intracellular Ca^{2+} mobilized from the different Ca^{2+} stores located in diverse platelet organelles might be able to promote granule secretion in human platelets itself. The depletion of cytosolic Ca^{2+}

using the chelator BAPTA indicated that intracellular Ca^{2+} plays an important role in granule secretion (Fig. 2A1, 2B1), as previously reported elsewhere [2]. The mobilization of Ca^{2+} by specific depletion of Ca^{2+} stores located in acidic or DTS using diverse agonists indicated that intracellular Ca^{2+} mobilization is not sufficient to promote an adequate granule secretion itself (Fig. 2 B2-3, B2-3). Thus, other Ca^{2+} -independent pathways must be activated together with Ca^{2+} mobilization in parallel by PM receptors involved in platelet activation and function. Indeed, it is already known that PAR receptor stimulation by Thr activates additional phosphorylation cascades that results in PKC activation [36]. PKC activity is considered an essential effector of granule secretion. PKC function requires an increase of $[\text{Ca}^{2+}]_c$ together with the presence of newly synthesized diacylglycerol (DAG), which depends of phospholipase C (PLC) activation. Hence, despite the present results have clarified certain aspects of Ca^{2+} role in granule secretion, this topic deserve further investigations.

REFERENCES

1. **Rink TJ, Sage SO.** Calcium signaling in human platelets. *Annu Rev Physiol.* 1990; 52: 431-49.

2. **Feinstein MB, Fraser C.** Human platelet secretion and aggregation induced by calcium ionophores. Inhibition by PGE1 and dibutyryl cyclic AMP. *J Gen Physiol.* 1975; 66: 561-81.
3. **Yoshioka A, Shirakawa R, Nishioka H, Tabuchi A, Higashi T, Ozaki H, Yamamoto A, Kita T, Horiuchi H.** Identification of protein kinase Calpha as an essential, but not sufficient, cytosolic factor for Ca2+-induced alpha- and dense-core granule secretion in platelets. *J Biol Chem.* 2001; 276: 39379-85.
4. **Marcu MG, Zhang L, Nau-Staudt K, Trifaro JM.** Recombinant scinderin, an F-actin severing protein, increases calcium-induced release of serotonin from permeabilized platelets, an effect blocked by two scinderin-derived actin-binding peptides and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Blood.* 1996; 87: 20-4.
5. **Rodriguez Del Castillo A, Vitale ML, Tchakarov L, Trifaro JM.** Human platelets contain scinderin, a Ca(2+)-dependent actin filament-severing protein. *Thromb Haemost.* 1992; 67: 248-51.
6. **Lopez JJ, Redondo PC, Salido GM, Pariente JA, Rosado JA.** Two distinct Ca2+ compartments show differential sensitivity to thrombin, ADP and vasopressin in human platelets. *Cell Signal.* 2006; 18: 373-81.
7. **Vretenbrant K, Ramstrom S, Bjerke M, Lindahl TL.** Platelet activation via PAR4 is involved in the initiation of thrombin generation and in clot elasticity development. *Thromb Haemost.* 2007; 97: 417-24.
8. **Jardin I, Ben Amor N, Hernandez-Cruz JM, Salido GM, Rosado JA.** Involvement of SNARE proteins in thrombin-induced platelet aggregation: evidence for the relevance of Ca2+ entry. *Arch Biochem Biophys.* 2007; 465: 16-25.
9. **Nylander M, Osman A, Ramstrom S, Aklint E, Larsson A, Lindahl TL.** The role of thrombin receptors PAR1 and PAR4 for PAI-1 storage, synthesis and secretion by human platelets. *Thromb Res.* 2012; 129: e51-8.
10. **Peters CG, Michelson AD, Flaumenhaft R.** Granule exocytosis is required for platelet spreading: differential sorting of alpha-granules expressing VAMP-7. *Blood.* 2012; 120: 199-206.
11. **Ye S, Karim ZA, Al Hawas R, Pessin JE, Filipovich AH, Whiteheart SW.** Syntaxin-11, but not syntaxin-2 or syntaxin-4, is required for platelet secretion. *Blood.* 2012; 120: 2484-92.
12. **Shirakawa R, Higashi T, Tabuchi A, Yoshioka A, Nishioka H, Fukuda M, Kita T, Horiuchi H.** Munc13-4 is a GTP-Rab27-binding protein regulating dense core granule secretion in platelets. *J Biol Chem.* 2004; 279: 10730-7.
13. **Kondkar AA, Bray MS, Leal SM, Nagalla S, Liu DJ, Jin Y, Dong JF, Ren Q, Whiteheart SW, Shaw C, Bray PF.** VAMP8/endobrevin is overexpressed in hyperreactive human platelets: suggested role for platelet microRNA. *J Thromb Haemost.* 2010; 8: 369-78.
14. **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.
15. **Rosado JA, Redondo PC, Sage SO, Pariente JA, Salido GM.** Store-operated Ca2+ entry: vesicle fusion or reversible trafficking and de novo conformational coupling? *J Cell Physiol.* 2005; 205: 262-9.
16. **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.
17. **Galan C, Dionisio N, Smani T, Salido GM, Rosado JA.** The cytoskeleton plays a modulatory role in the association between STIM1 and the Ca(2+) channel subunits Orai1 and TRPC1. *Biochem Pharmacol.* 2011; 82: 400-10.
18. **Pollock WK, Rink TJ, Irvine RF.** Liberation of [3H]arachidonic acid and changes in cytosolic free calcium in fura-2-loaded human platelets stimulated by ionomycin and collagen. *Biochem J.* 1986; 235: 869-77.
19. **Berna-Erro A, Galan C, Dionisio N, Gomez LJ, Salido GM, Rosado JA.** Capacitative and non-capacitative signaling complexes in human platelets.

- Biochim Biophys Acta*. 2012; 1823: 1242-51.
20. **Phillips DR, Charo IF, Parise LV, Fitzgerald LA.** The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood*. 1988; 71: 831-43.
21. **Robinson M, MacHin S, Mackie I, Harrison P.** In vivo biotinylation studies: specificity of labelling of reticulated platelets by thiazole orange and mepacrine. *Br J Haematol*. 2000; 108: 859-64.
22. **Pihusch R, Wegner H, Salat C, Pihusch M, Holler E, Kolb HJ, Hiller E.** Flow cytometric findings in platelets of patients following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2002; 30: 381-7.
23. **Deb S, Patra HK, Lahiri P, Dasgupta AK, Chakrabarti K, Chaudhuri U.** Multistability in platelets and their response to gold nanoparticles. *Nanomedicine*. 2011; 7: 376-84.
24. **Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, Jacques YV, Bainton DF.** A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol*. 1985; 101: 880-6.
25. **Lopez JJ, Salido GM, Pariente JA, Rosado JA.** Interaction of STIM1 with endogenously expressed human canonical TRP1 upon depletion of intracellular Ca²⁺ stores. *J Biol Chem*. 2006; 281: 28254-64.
26. **Braun A, Varga-Szabo D, Kleinschnitz C, Pleines I, Bender M, Austinat M, Bosl M, Stoll G, Nieswandt B.** Orai1 (CRACM1) is the platelet SOC channel and essential for pathological thrombus formation. *Blood*. 2009; 113: 2056-63.
27. **Gilio K, van Kruchten R, Braun A, Berna-Erro A, Feijge MA, Stegner D, van der Meijden PE, Kuijpers MJ, Varga-Szabo D, Heemskerk JW, Nieswandt B.** Roles of platelet STIM1 and Orai1 in glycoprotein VI- and thrombin-dependent procoagulant activity and thrombus formation. *J Biol Chem*. 2010; 285: 23629-38.
28. **Grosse J, Braun A, Varga-Szabo D, Beyersdorf N, Schneider B, Zeitlmann L, Hanke P, Schropp P, Muhlstedt S, Zorn C, Huber M, Schmittwolf C, Jagla W, Yu P, Kerkau T, Schulze H, Nehls M, Nieswandt B.** An EF hand mutation in Stim1 causes premature platelet activation and bleeding in mice. *J Clin Invest*. 2007; 117: 3540-50.
29. **Varga-Szabo D, Braun A, Kleinschnitz C, Bender M, Pleines I, Pham M, Renne T, Stoll G, Nieswandt B.** The calcium sensor STIM1 is an essential mediator of arterial thrombosis and ischemic brain infarction. *J Exp Med*. 2008; 205: 1583-91.
30. **Jardin I, Albarran L, Bermejo N, Salido GM, Rosado JA.** Homers regulate calcium entry and aggregation in human platelets: a role for Homers in the association between STIM1 and Orai1. *Biochem J*. 2012; 445: 29-38.
31. **Jardin I, Lopez JJ, Pariente JA, Salido GM, Rosado JA.** Intracellular calcium release from human platelets: different messengers for multiple stores. *Trends Cardiovasc Med*. 2008; 18: 57-61.
32. **Cavallini L, Coassin M, Alexandre A.** 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*. 1995; 310 (Pt 2): 449-52.
33. **Lopez E, Salido GM, Rosado JA, Berna-Erro A.** Unraveling STIM2 function. *J Physiol Biochem*. 2012.
34. **Lopez JJ, Camello-Almaraz C, Pariente JA, Salido GM, Rosado JA.** Ca²⁺ accumulation into acidic organelles mediated by Ca²⁺ and vacuolar H⁺-ATPases in human platelets. *Biochem J*. 2005; 390: 243-52.
35. **Bowman EJ, Siebers A, Altendorf K.** Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988; 85: 7972-6.
36. **Cohen S, Braiman A, Shubinsky G, Isakov N.** Protein kinase C-theta in platelet activation. *FEBS Lett*. 2011; 585: 3208-15.

5. Discusión

La regulación de la concentración de Ca^{2+} libre citosólico es un punto de convergencia de muchos mecanismos de transducción intracelular, y modula una gran variedad de funciones celulares, desde la secreción a la muerte celular. Las células generan y modulan señales de Ca^{2+} , tanto a partir de fuentes de Ca^{2+} intracelulares como extracelulares. En la mayoría de los modelos celulares, la principal fuente de Ca^{2+} intracelular es el retículo sarco/endoplasmático, donde el Ca^{2+} es almacenado por la ATPasa SERCA (ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarco/endoplasmático). Además del retículo sarco/endoplasmático, en distintos modelos celulares, como las plaquetas humanas, se han identificado reservorios de Ca^{2+} sensibles a agonistas en orgánulos de naturaleza acídica, como los lisosomas o los gránulos específicos de secreción (en plaquetas, exclusivamente los gránulos densos), donde tanto SERCA como el gradiente de protones a través de la membrana del orgánulo son responsables del almacenamiento de Ca^{2+} en dicho reservorio [429,319,141].

Debido a que la cantidad de Ca^{2+} acumulado en los reservorios intracelulares es finita, se hace necesaria la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular para lograr una completa activación de un gran número de funciones celulares, además de promover el relleno de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} . La entrada capacitativa de Ca^{2+} (ECC), un proceso regulado por el grado de relleno de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} , es uno de los mecanismos más importantes de entrada de Ca^{2+} en células no eléctricamente excitables [328]. La ECC tiene un importante papel en la señalización de Ca^{2+} intracelular en condiciones fisiológicas, por ejemplo como soporte de las oscilaciones intracelulares de Ca^{2+} [430], y además es necesaria para la activación de una gran variedad de funciones celulares, incluyendo la proliferación celular, la contracción muscular y la secreción. Finalmente, la ECC permite el relleno de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares, lo cual es necesario para la síntesis de proteínas y las modificaciones postraduccionales, y da lugar a la terminación de la señal que mantiene abiertos los canales capacitativos en la membrana plasmática.

A pesar de las intensas investigaciones llevadas a cabo durante las dos últimas décadas, los mecanismos de activación y la identidad de los elementos (proteínas) claves en la ECC han permanecido esquivos durante mucho tiempo. No obstante, en los últimos años, las mejoras en técnicas como el silenciamiento de genes, combinado con la existencia de plataformas de alto rendimiento, han proporcionado información muy significativa acerca de estos procesos, con la identificación de STIM1 como el sensor de Ca^{2+} del retículo endoplasmático, y Orai1 como la subunidad que forma el poro del canal arquetípico de ECC, conocido como CRAC (*Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel*).

STIM1 es una proteína localizada tanto en la membrana del retículo endoplásmico como en la membrana plasmática, que posee un dominio *EF-hand*, capaz de unir Ca^{2+} , en el extremo amino terminal. La STIM1 localizada en la membrana del retículo endoplásmico presenta el dominio *EF-hand* en el interior del retículo endoplásmico, y se ha sugerido que podría funcionar como un sensor de Ca^{2+} . De hecho, los canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática se activan cuando STIM1 no tiene unido Ca^{2+} [334]. El silenciamiento de la expresión de STIM1 usando RNAi (RNA de interferencia) reduce la ECC en células HEK293 y Jurkat, y la corriente capacitativa de Ca^{2+} conocida como I_{CRAC} en estas últimas [333]; además, la expresión de STIM1 con el dominio *EF-hand* mutado en residuos esenciales para unir Ca^{2+} , activa la ECC de forma permanente e independiente del estado de relleno del retículo endoplásmico en células S2 de *Drosophila* y Jurkat [334]. El vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} induce la multimerización de STIM1 y su localización en regiones conocidas como *puncta*, donde se asocia y activa los canales formados por Orai1 [340]. Además, un estudio más reciente ha demostrado que STIM1, y no STIM2, está implicada en la entrada de Ca^{2+} que tiene lugar durante las oscilaciones de Ca^{2+} , de modo que cada oscilación produce una caída transitoria en la concentración de Ca^{2+} del retículo endoplásmico que es suficiente para activar, también transitoriamente, STIM1 [431].

La naturaleza de los canales que conducen la ECC ha sido un asunto de intensa investigación y debate. Se han descrito, hasta la fecha, dos tipos de canales regulados por los almacenes intracelulares (canales capacitativos), que tienen distintas propiedades biofísicas, pero que se activan bajo las mismas condiciones: por el vaciado de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} mediado por agonistas, por los inhibidores de SERCA, y por fuertes quelantes de Ca^{2+} . Los canales CRAC son altamente selectivos para el ión Ca^{2+} , se han encontrado y descrito, a nivel de corriente macroscópica, en configuración de células completa en una amplia variedad de células no excitables, como los mastocitos [432], las células RBL [433] y los linfocitos T [434]. Los canales SOC, poco selectivos para el ión Ca^{2+} , se han encontrado y descrito, a nivel de registros electrofisiológicos, en configuración de canal único y de célula completa en diferentes modelos celulares, incluyendo células musculares lisas vasculares [435,436,437,438]. En la década de los 90 se propusieron los homólogos en mamíferos de los canales TRP de *Drosophila* como candidatos para mediar la ECC como canales SOC y, más recientemente, se ha propuesto que la proteína Orai1 forma el canal capacitativo CRAC.

La participación de Orai1 en I_{CRAC} fue identificada por mapeo genético en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia combinada severa (SCID), síndrome atribuido a la pérdida de I_{CRAC} . En pacientes con SCID, el gene ORAI1 en el cromosoma 12 se encuentra mutado y el I_{CRAC} se puede restaurar mediante la expresión de Orai1 no mutada en células T [375]. El canal formado por Orai1 está regulado por el

vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} con la participación del sensor intraluminal de Ca^{2+} , STIM1. Aunque una fracción de Orai1 se encuentra expresada constitutivamente en la membrana celular, recientemente nuestros estudios han demostrado que el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} incrementa la expresión de Orai1 en la membrana plasmática [439].

Además del papel de los TRP en la entrada de Ca^{2+} activada por receptores (ROCE), existen numerosas evidencias que apoyan el papel de las proteínas TRP en la conducción de la entrada de Ca^{2+} durante la ECC. Especialmente se ha centrado la atención en los miembros de la subfamilia TRPC. Mediante el empleo de distintos procedimientos experimentales, tales como la sobreexpresión de proteínas TRP, el silenciamiento de la expresión de TRPs endógenos y distintos estudios farmacológicos, se ha sugerido que la mayoría de las proteínas TRPC pueden ser activadas por el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} [353,345,440]. Distintos estudios han puesto de manifiesto la participación del TRPC1 en la ECC mediante silenciamiento de la expresión de TRPC1 en glándulas salivales humanas [441] y células endoteliales [357]. En apoyo de estos estudios, el empleo de anticuerpos dirigidos a la región que forma el poro del TRPC1 redujo la ECC en células de músculo liso vascular y plaquetas humanas [442,443], y también se ha observado una reducción de la ECC en mioblastos donde se ha silenciado la expresión del TRPC1 [444].

Distintos estudios han puesto de manifiesto la existencia de interacciones funcionales entre Orai1 y TRPCs bajo la influencia de STIM1, y se ha propuesto que los canales para la ECC están compuestos por complejos heteroméricos que incluyen proteínas TRPCs y Orai [445]. En este sentido, se ha demostrado que las proteínas Orai son capaces de conferir sensibilidad al vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} , mediada por STIM1, a los canales TRPC. En células HEK293 que sobreexpresan canales TRPC3 y TRPC6, los cuales clásicamente se han considerado insensibles al vaciamiento de los depósitos de Ca^{2+} , estos canales TRPCs se hacen sensibles al vaciamiento de los depósitos tras la expresión de Orai [446]. Estos estudios sugieren que los hallazgos recientes acerca de Orai pueden explicarse tanto por la existencia de canales formados únicamente por Orai activados por STIM1 [447], como por un modelo en el cual los canales para la ECC estarían compuestos por una combinación de proteínas TRPCs y Orai [446]. En este último modelo, las proteínas Orai transducirían la señal de vaciamiento de los depósitos de Ca^{2+} , procedente de STIM, a las proteínas TRPC localizadas en la membrana celular.

Una prueba que apoyaría definitivamente el papel de Orai confiriendo sensibilidad al vaciamiento de los depósitos a los TRPCs, debería venir de la identificación de estos complejos en células que expresen estas proteínas de forma nativa. Este es el caso de las plaquetas humanas, que expresan endógenamente STIM1, Orai1 y TRPC1, y donde la electrotransfección con el anticuerpo anti-STIM1, específico para el dominio de *EF-hand*, reduce tanto la interacción de STIM1 con hTRPC1 como la ECC [383]. En plaquetas, hemos demostrado la interacción funcional entre STIM1, Orai1 y TRPC1 en la activación de la ECC. En estas células, la inhibición de la interacción entre STIM1 y Orai1, y por tanto entre STIM1 y TRPC1, modifica el comportamiento del TRPC1, pasando de participar en la ECC, a formar parte de un canal no capacitativo activado por DAG [448]. De modo similar, hemos comprobado que la participación de TRPC6 en la ECC o en la entrada de Ca^{2+} activada por receptor (ROCE) está regulada por su interacción con el complejo Orai1-STIM1 o con el hTRPC3, respectivamente [449].

Un estudio reciente ha puesto de manifiesto que el mutante de Orai1 R91W, responsable de la inmunodeficiencia combinada severa, inhibe la entrada de Ca^{2+} activada por DAG en células que expresan TRPC3 de forma estable o transitoria [450]. Este hallazgo sugiere que las proteínas Orai y TRPC forman complejos que participan tanto en la ECC como en la entrada no capacitativa de Ca^{2+} (como ROCE). Para integrar estos resultados con los ya existentes sobre Orai, TRPCs y STIM, el grupo de Birnbaumer propuso una hipótesis basada en que los complejos Orai-TRPC, reclutados en los dominios de membrana conocidos como *lipid rafts* o balsas lipídicas, mediarían la ECC, mientras que los mismos complejos mediarían ROCE cuando se encuentren fuera de los *lipid rafts* [451]. Por lo tanto, los canales formados por TRPCs podrían participar tanto en la ECC como en ROCE, tras recibir señales procedentes bien de STIM1-Orai o de la PLC, respectivamente [446].

En este contexto, parece claro que deben existir mecanismos reguladores que modulen la activación de los canales formados por Orai y TRPCs tras la llegada de un estímulo, de modo que se genere una señal de Ca^{2+} adecuada para la activación correcta de las funciones celulares. Entre los mecanismos de regulación más relevantes se encuentran modificaciones post-traduccionales de las proteínas, y la participación de proteínas adaptadoras.

Desde hace algunos años se conoce que la fosforilación de STIM1 en residuos de serina o treonina desempeña un papel importante en la activación de la ECC. Por ejemplo, durante la mitosis, la ECC se encuentra suprimida debido a un mecanismo que incluye la fosforilación de STIM1 al menos en los residuos Ser 486 y Ser 668 [347]. De acuerdo con el papel de la fosforilación de STIM1 en residuos de

serina en la activación de la ECC, un estudio ha demostrado que los residuos Ser519, Ser575 y Ser628 de STIM1 son susceptibles de ser fosforilados por las proteínas ERK1/2 *in vitro*. Además, la sustitución de los sitios diana de las proteínas ERK1/2 por alanina reduce la ECC de un modo significativo, lo cual sugiere que la fosforilación de STIM1 es importante para la activación de la ECC [348]. Recientemente, un estudio ha puesto de manifiesto que la fosforilación de STIM1 en el residuo Ser575 mediada por ERK1/2 está estimulada por la proteína netrin-2/Cdo y es necesaria para la diferenciación de los mioblastos [451].

En este sentido, nuestros estudios se han centrado en la fosforilación de STIM1 en residuos de tirosina y en la latencia de activación de la fosforilación comparada con el inicio de la ECC. Empleando técnicas de cinética rápida mediante el uso de un sistema de *Quench-Flow* hemos detectado fosforilación de STIM1 en residuos de tirosina 1 segundo después de la estimulación plaquetaria con taspigargina (TG), encontrado la estimulación máxima 2.5 segundos tras la adición de TG. Estos hallazgos demuestran que la fosforilación de STIM1 en residuos de tirosina es un proceso previo a la detección de la ECC, que se produjo 3.2 segundos después de la adición de TG. Hemos identificado las proteínas tirosina cinasas implicadas en la fosforilación de STIM1 tras el vaciamiento de los reservorios de Ca²⁺, como las proteínas de la familia Src/Abl y Btk. La inhibición de las mismas inhibe significativamente la asociación entre STIM1 y Orai1, así como la activación de la ECC [452]. En conjunto, estos resultados demuestran que la fosforilación de STIM1 es un evento de gran relevancia en la activación de la ECC.

Las proteínas adaptadoras también juegan un papel importante en la activación y regulación de la ECC. Entre las proteínas adaptadoras que participan en la regulación de la ECC, las proteínas Homer merecen una distinción especial. Estas son una familia de proteínas adaptadoras que incluye Homer1, Homer2 y Homer3, con numerosas isoformas en los mamíferos [377]. La isoforma corta Homer1a (186 aminoácidos de longitud) fue la primera en ser aislada. Las proteínas adaptadoras Homer presentan un dominio EVH1 (*Ena/VASP homology 1*) que les permite la asociación con distintas proteínas que incluyen las secuencias de aminoácidos PPxxF o LPSSP, entre las que se encuentran proteínas tales como la PLC_β, IP₃Rs, receptores de rianodina, canales TRPC, el canal voltaje-dependiente Cav1.2, y STIM1 [379]. Homer1 se ha propuesto como una proteína esencial para regular la función de los canales TRPC. Estudios llevados a cabo en células HEK293 que expresan TRPC1 y Homer1 pusieron de manifiesto que este último mantiene a TRPC1 en la configuración cerrada, asociado con IP₃Rs. Los estudios realizados por Yuan *et al* en 2003 [378] demuestran que el estado de relleno de los reservorios intracelulares controla dinámicamente las asociaciones TRPC1-Homer y TRPC1-IP₃R. Por lo tanto, el vaciamiento de los reservorios daría lugar a la disociación del complejo TRPC1-Homer, que coincide con la activación

de TRPC1 y, consecuentemente, de la ECC. La disociación de las proteínas de TRPC1 y Homer tras el vaciamiento de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} podría permitir la interacción de TRPC1 con STIM1 para activar la ECC [379].

En las plaquetas humanas también hemos observado que Homer tiene un papel relevante en la activación de la ECC [453]. En estas células, la descarga de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} mediante TG, o el agonista fisiológico trombina, conduce a la asociación de Homer1 con TRPC1 y el IP_3R tipo II de un modo independiente de los incrementos en la concentración de Ca^{2+} citosólica, así como la asociación de Homer1 con STIM1 y Orai1, en este caso de un modo dependiente de Ca^{2+} . La interferencia con la función de Homer mediante la introducción en las células del péptido sintético PPKKFR, que emula la secuencia de aminoácidos diana para Homer, PPxxF, atenúa la asociación entre STIM1 y Orai1, y entre el canal TRPC1 y el IP_3R tipo II, en comparación con su respectivo control llevado a cabo con el péptido inactivo PPKKRR. La introducción del péptido PPKKFR reduce la entrada de Ca^{2+} inducida por trombina y la agregación plaquetaria, así como el mantenimiento de la ECC. Esto último ratifica los resultados de estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio, que demostraron un papel de la interacción TRPC1- IP_3R tipo II en el mantenimiento de la ECC en estas células [454]. Los resultados observados en plaquetas en estudios previos realizados por el grupo de Muallem, aparentemente contradictorios, se pueden atribuir a la idiosincrasia de las células investigadas. No obstante, ambos estudios demuestran un papel relevante de las proteínas Homer en la activación de la ECC.

Finalmente, hemos analizado el papel del Ca^{2+} , y en concreto la ECC, en la secreción de gránulos α y densos en plaquetas humanas. Para ello estudiamos la exposición de P-selectina en la superficie celular (secreción de gránulos α) y la liberación de quinecrine (secreción de gránulos densos) en plaquetas estimuladas con trombina, y tanto en presencia como en ausencia de Ca^{2+} extracelular. Nuestros resultados muestran que las plaquetas estimuladas con 0.1 U/mL de trombina son capaces de secretar ambos tipos de gránulos, tanto en presencia como en ausencia de Ca^{2+} extracelular. Esto indica que la entrada de Ca^{2+} , probablemente mediada en su mayor parte por la ECC, no es un requisito esencial para la secreción plaquetaria. Sin embargo, también se observa que la ausencia de Ca^{2+} extracelular reduce significativamente la secreción de gránulos densos en plaquetas estimuladas con 0.1 U/ml trombina, comparado con la secreción de gránulos α , los cuales no se ven afectados, sugiriendo una mayor participación de la ECC en la secreción de gránulos densos.

Por otra parte, se ha postulado la existencia de reservorios de Ca^{2+} ácidos, en las plaquetas humanas [319], un pool de orgánulos plaquetarios identificados por su naturaleza ácida y por sus propiedades farmacológicas, entre los que se encontrarían los gránulos densos [91]. Nuestros estudios, junto con trabajos anteriores [419], sugieren que durante la activación plaquetaria, la liberación al citoplasma del Ca^{2+} almacenado en dichos depósitos ácidos es necesaria para facilitar la secreción de gránulos α . El resultado obtenido en este trabajo parece sugerir que los gránulos densos podrían actuar como depósitos ácidos y liberar Ca^{2+} al citoplasma antes de ser secretados, lo que facilitaría la secreción de gránulos α . Para comprobar dicha hipótesis se estudió el papel del Ca^{2+} intracelular en la secreción de gránulos plaquetarios. Para ello se cargaron las células con el quelante intracelular de Ca^{2+} dimetil-BAPTA. Las plaquetas cargadas con BAPTA y estimuladas con 0.1 U/mL trombina en un medio libre de Ca^{2+} mostraron una reducción sustancial en la secreción de gránulos α . Sin embargo, la secreción residual observada en ausencia de Ca^{2+} , demuestra que la trombina activa vías independientes del Ca^{2+} citoplasmático que participan en la secreción de los gránulos plaquetarios.

A continuación estudiamos el papel de la liberación de Ca^{2+} desde los distintos reservorios intracelulares en la secreción de gránulos plaquetarios, comprobando que el vaciamiento del Ca^{2+} tanto del retículo endoplasmático como de los reservorios ácidos, cada uno de manera independiente, tiene un papel irrelevante en la secreción de gránulos plaquetarios. Asimismo, el vaciamiento conjunto de ambos reservorios de Ca^{2+} tuvo una participación modesta en la secreción de gránulos plaquetarios. Sin embargo, no puede descartarse que la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares requiera de la acción conjunta con otras vías independientes de Ca^{2+} para su correcta función en la secreción, como las que probablemente se activan en presencia de agonistas plaquetarios como la trombina.

6. Conclusiones

- El vaciamiento de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} ocasiona la fosforilación de STIM1 en residuos de tirosina en plaquetas humanas, evento éste necesario para la completa activación de la entrada capacitativa de Ca^{2+} .
- La proteína Homer1 se asocia al canal TRPC1 y al receptor de IP_3 tipo II en respuesta al vaciamiento de los reservorios intracelulares de Ca^{2+} , de un modo independiente de la concentración de Ca^{2+} citosólica.
- La descarga de los reservorios de Ca^{2+} intracelulares también ocasiona la asociación de Homer1 con STIM1 y el canal Orai1, en este caso, de un modo dependiente de los incrementos en la concentración de Ca^{2+} intracelular.
- Las proteínas de la familia Homer desempeñan un papel esencial en la interacción entre STIM1 y Orai1 y entre TRPC1 y el receptor de IP_3 tipo II, en consecuencia, estas proteínas participan de forma activa en la activación de la ECC en plaquetas humanas.
- La ECC, así como la liberación de Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares, juegan un papel menor en la secreción de gránulos alfa y densos en las plaquetas humanas.

7. Bibliografía

1. Bizzozzero G. Ueber einen neuen Formbestandteil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und Blutgerinnung. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin* 1882; 90: 261–332.
2. Gresele P, Fuster V, Lopez JA, Page CP, Vermynen J. Platelets in hematologic and cardiovascular disorders. 2nd ed. Gresele P, editor. CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, Cambridge; 2008.
3. Levin J. The Evolution of Mammalian Platelets. In: Michelson AD, editor. Platelet. 2nd ed. San Diego, CA USA: Elsevier/Academic Press; 2007. p. 3-14.
4. Vitrat N, Cohen-Solal K, Pique C, Le Couedic JP, Norol F, Larsen AK, Katz As, Vainchenker W, Debili N. Endomitosis of human megakaryocytes are due to abortive mitosis. *Blood* 1998; 91: 3711-3723.
5. Italiano JE. Megakaryocyte Development and Platelet Formation. In: Michelson AD, editor. Platelet. 2nd ed. San Diego, CA USA: Elsevier/Academic Press; 2007. p. 21-30.
6. Italiano JE, Lecine P, Shivdasani, RA, Hartwig, JH. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J. Cell Biol* 1999; 147: 1299-1312.
7. Kaushansky K. Thrombopoietin. *N Engl J Med* 1998; 339: 746-754.
8. Batar P, Dale GL. Platelet Turnover and Aging. In: Michelson AD, editor. Platelet. 2nd ed. San Diego, CA USA: Elsevier/Academic Press; 2007. p. 53-60.
9. Hanson SR, Slichter SJ. Platelet kinetics in patients with bone marrow hypoplasia: evidence for a fixed platelet requirement. *Blood* 1985; 66: 1105–1109.
10. Woessner S, Lafuente R, Florensa L. Semiología de los elementos formes de la sangre. Su trascendencia práctica en el diagnóstico hematológico. En: Woessner S, Lafuente R, Florensa L, editores. La citología óptica en el diagnóstico hematológico. 3ª ed. Barcelona: Medici; 1991. p. 65-89.
11. White JG, Clawson CC, Gerrard JM. Platelet ultrastructure. In: Bloom AL, Thomas DP, editors. Hemostasis and Thrombosis. 3th ed. Edimburgo: Churchill Livingstone, 1994. p. 22-49.
12. White JG. An overview of platelet structural physiology. *Scann Microsc* 1987; 1: 1677-1700.
13. White JG, Escolar G. The blood platelet open canalicular system: a two-way street. *Eur J Cell Biol.* 1991; 56: 233-242.
14. Pujol-Moix N. Anatomía de las plaquetas. Interrelaciones estructura-función. En: Pujol-Moix N, editor. Trombocitopenias. Madrid: Harcourt International, 2001. p. 3-10.
15. Pujol-Moix N. Morfología y estructura de las plaquetas. En: Real Fundación Victoria Eugenia, editor. Trombocitopatías. Madrid: Real Fundación Victoria Eugenia, Servicio de Publicaciones 2001. p. 23-39.
16. Lowenberg EC, Meijers JC, Levi M. Platelet-vessel wall interaction in health and disease. *Neth J Med* 2010; 68: 242-251.
17. Rivera J, Lozano L, Navarro Núñez L, Vicente V. Platelets receptores and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Hematológica* 2009; 94: 700-711.
18. Du X, Beutler L, Ruan C, Castaldi PA, Berndt MC. Glycoprotein Ib and glycoprotein IX are fully complexed in the intact platelet membrane. *Blood* 1987; 69: 1524-1527.
19. Hocking AM, Shinomura T, McQuillan DJ. Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. *Matrix Biol* 1998; 17: 1-19.
20. Celikel R, McClintock RA, Roberts JR, Mendolicchio GL, Ware J, Varughese KI, Ruggeri ZM. Modulation of alpha-thrombin function by distinct interactions with platelet glycoprotein Ibalpha. *Science* 2003; 301: 218-221.
21. Stegner D, Nieswandt B. Platelet receptor signaling in thrombus formation. *J Mol Med* 2011; 89: 109-121.
22. Clemetson JM, Polgar J, Magnenat E, Wells TN, Clemetson KJ. The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to FalphaR and the natural killer receptors. *J Biol Chem* 1999; 274: 29019-29024.
23. Ichinohe T, Takayama H, Ezumi Y, Arai M, Yamamoto N, Takahashi H, Okuma M. Collagen-stimulated activation of Syk but not c-Src is severely compromised in human platelets lacking membrane glycoprotein VI. *J Biol Chem* 1997; 272: 63-68.

24. Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res.* 2006; 99: 1293–1304.
25. Coughlin SR. How the protease thrombin talks to cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96: 11023–11027.
26. Kahn ML, Zheng YW, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S, Farese RV, Jr, Tam C, Coughlin SR. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature.* 1998; 394: 690–694.
27. Coughlin SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost.* 2005; 3 :1800–1814.
28. Kim S, Foster C, Lecchi A, Quinton TM, Prosser DM, Jin J, Cattaneo M, Kunapuli SP. Protease-activated receptors 1 and 4 do not stimulate G(i) signaling pathways in the absence of secreted ADP and cause human platelet aggregation independently of G(i) signaling. *Blood.* 2002; 99: 3629–3636.
29. Knezevic I, Borg C, Le Breton GC. Identification of Gq as one of the G-proteins which copurify with human platelet thromboxane A2/prostaglandin H2 receptors. *J Biol Chem.* 1993; 268: 26011–26017.
30. Djellas Y, Manganello JM, Antonakis K, Le Breton GC. Identification of G α 13 as one of the G-proteins that couple to human platelet thromboxane A2 receptors. *J Biol Chem.* 1999; 274: 14325–14330.
31. Ohlmann P, Laugwitz KL, Nurnberg B, Spicher K, Schultz G, Cazenave JP, Gachet C. The human platelet ADP receptor activates Gi2 proteins. *Biochem J.* 1995; 312: 775–779.
32. Yang J, Wu J, Kowalska MA, Dalvi A, Prevost N, O'Brien PJ, Manning D, Poncz M, Lucki I, Blendy JA, Brass LF. Loss of signaling through the G protein, Gz, results in abnormal platelet activation and altered responses to psychoactive drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97: 9984–9989.
33. Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell* 1998; 94: 657-666.
34. Kamata T, Handa M, Sato Y, Ikeda Y, Aiso S. Membrane-proximal α / β stalk interactions differentially regulate integrin activation. *J Biol Chem* 2005; 280: 24775-24783.
35. George JN, Caen JP, Nurden AT. Glanzmann's thrombasthenia: the spectrum of clinical disease. *Blood.* 1990; 75: 1383-1395.
36. Quinn MJ, Plow EF, Topol EJ. Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors: recognition of a two-edged sword? *Circulation.* 2002; 106 : 379-385.
37. Boersma E, Harrington RA, Moliterno DJ, White H, Théroux P, Van de Werf F, de Torbal A, Armstrong PW, Wallentin LC, Wilcox RG, Simes J, Califf RM, Topol EJ, Simoons ML. Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in acute coronary syndromes: a meta-analysis of all major randomised clinical trials. *Lancet.* 2002; 359:189-198.
38. Poncz M, Eisman R, Heidenreich R, Silver SM, Vilaire G, Surrey S, Schwartz E, Bennett JS. Structure of the platelet membrane glycoprotein IIb. Homology to the alpha subunits of the vitronectin and fibronectin membrane receptors. *J Biol Chem* 1987; 262: 8476-8482.
39. Scase TJ, Heath MF, Allen JM, Sage SO, Evans RJ. Identification of a P2X1 purinoceptor expressed on human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 242: 525-528.
40. Sun B, Li J, Okahara K, Kambayashi J. P2X1 purinoceptor in human platelets. Molecular cloning and functional characterization after heterologous expression. *J Biol Chem* 1998; 273: 11544-11547.
41. Mahaut-Smith MP, Tolhurst G, Evans RJ. Emerging roles for P2X1 receptors in platelet activation. *Platelets* 2004; 15: 131-144.
42. Oury C, Toth-Zsomboki E, Thys C, Tytgat J, Vermeylen J, Hoylaerts MF. (2001) The ATP-gated P2X1 ion channel acts as a positive regulator of platelet responses to collagen. *Thromb Haemost* 2001; 86: 1264-1271.
43. Vial C, Rolf MG, Mahaut-Smith MP, Evans RJ. A study of P2X1 receptor function in murine megakaryocytes and human platelets reveals synergy with P2Y receptors. *Br J Pharmacol* 2002; 135: 363-372.

44. Israels SJ, Gerrard JM, Jacques YV, McNicol A, Cham B, Nishibori M, Bainton DF. Platelet dense granule membranes contain both granulophysin and P-selectin (GMP-140). *Blood* 1992; 80: 143–152.
45. Whiss PA, Andersson RG, Srinivas U. Modulation of P-selectin expression on isolated human platelets by an NO donor assessed by a novel ELISA application. *J Immunol Methods* 1997; 200: 135–14.
46. Merten M and Thiagarajan P. P-selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates. *Circulation* 2000; 102: 1931–1936.
47. Dubois C, Panicot-Dubois L, Gainor JF, Furie BC, Furie B. Thrombin-initiated platelet activation in vivo is vWF independent during thrombus formation in a laser injury model. *J Clin Invest* 2007; 117: 953–960.
48. Padilla A, Moake JL, Bernardo A, Ball C, Wang Y, Arya M, Nolasco L, Turner N, Berndt MC, Anvari B, Lopez JA, Dong JF. P-selectin anchors newly released ultralarge von Willebrand factor multimers to the endothelial cell surface. *Blood* 2004; 103: 2150–2156.
49. Romo GM, Dong JF, Schade AJ, Gardiner EE, Kansas GS, Li CQ, McIntire LV, Berndt MC, Lopez JA. The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J Exp Med* 1999; 190: 803–814.
50. Tailor A, Cooper D, Granger DN. Platelet-vessel wall interactions in the microcirculation. *Microcirculation* 2005; 12: 275–285.
51. Andre P, Hartwell D, Hrachovinova I, Saffaripour S, Wagner DD. Pro-coagulant state resulting from high levels of soluble P-selectin in blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 13835–1384.
52. Holmsen H. Platelet metabolism and activation. *Semin Hematol* 1985; 22: 219-24.
53. White JG. Effects of colchicine and Vinca alkaloids on human platelets. I. Influence on platelet microtubules and contractile function. *Am J Pathol* 1968; 53: 281-291.
54. Redondo PC, Harper AG, Harper MT, Brownlow SL, Rosado JA, Sage SO. hTRPC1-associated alpha-actinin, and not hTRPC1 itself, is tyrosine phosphorylated during human platelet activation. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 2476-2483.
55. Hartwig JH, DeSisto M. The cytoskeleton of the resting human blood platelet: structure of the membrane skeleton and its attachment to actin filaments. *J Cell Biol* 1991; 112: 407-425.
56. Safer D, Nachmias VT. Beta thymosins as actin binding peptides. *Bioessays* 1994; 16: 590.
57. Rosenberg S, Stracher A, Lucas RC. Isolation and characterization of actin and actin-binding protein from human platelets. *J Cell Biol* 1981; 91: 201-211.
58. Rosenberg S, Stracher A. Effect of actin-binding protein on the sedimentation properties of actin. *J Cell Biol* 1982; 94: 51-55.
59. White JG. Platelets in hematologic and cardiovascular disorders. 2nd ed. Gresele P, editor. CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, Cambridge; 2008.
60. Patel-Hett S, Wang H, Begonja AJ, Thon JN, Alden EC, Wandersee NJ, An X, Mohandas N, Hartwig JH, Italiano JE Jr. The spectrin-based membrane skeleton stabilizes mouse megakaryocyte membrane systems and is essential for proplatelet and platelet formation. *Blood*. 2011; 118: 1641-1652.
61. Barkalow KL, Italiano JE Jr, Chou DE, Matsuoka Y, Bennett V, Hartwig JH. Alpha-adducin dissociates from F-actin and spectrin during platelet activation. *J Cell Biol* 2003; 161: 557-570.
62. Kawakami H, Hirano H. Three-dimensional reconstruction of the open canal ocular system of human platelets by means of high- voltage electron microscopy. *J Electron Microscop* 1985; 34: 38-41.
63. Flaumenhaft R. Molecular basis of platelet granule secretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1152-1160.
64. Lopez-Vilchez I, Escolar G, Diaz-Ricart M, Fuste B, Galan AM, White JG. Tissue factor-enriched vesicles are taken up by platelets and induce platelet aggregation in the presence of factor VIIa. *Thromb Haemost* 2007; 97: 202-211.
65. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* 2001; 12 : 261–273.

66. Ebbeling L, Robertson C, McNicol A, Gerrard JM. Rapid ultrastructural changes in the dense tubular system following platelet activation. *Blood* 1992; 80: 718–723.
67. White JG. Interaction of membrane systems in blood platelets. *Am J Pathol* 1972; 66: 295-312.
68. Berridge MJ. Capacitative calcium entry. *Biochem J* 1995; 312 (1): 1-11.
69. Gerrard JM, White JG, Rao GH, Townsend D. Localization of platelet prostaglandin production in the platelet dense tubular system. *Am J Pathol* 1976; 83: 283-298.
70. Carey F, Menashi S, Crawford N. Localization of cyclo-oxygenase and thromboxane synthetase in human platelet intracellular membranes. *Biochem J* 1982; 204: 847-851.
71. Redondo PC, Jardin I, Hernandez-Cruz JM, Pariente JA, Salido GM, Rosado JA. Hydrogen peroxide and peroxy-nitrite enhance Ca²⁺ mobilization and aggregation in platelets from type 2 diabetic patients. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 333: 794-802.
72. King SM, Reed GL. Development of platelet secretory granules. *Semin Cell Dev Biol.* 2002; 13: 293-302.
73. Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev* 2009; 23: 177–189.
74. Jones OP. Origin of megakaryocyte granules from Golgi vesicles. *Anat Rec* 1960; 138: 105-113.
75. de Larouziere V, Brouland JP, Souni F, Drouet L, Cramer E. Inverse immunostaining pattern for synthesized versus endocytosed alpha-granule proteins in human bone marrow megakaryocytes. *Br J Haematol* 1998; 101: 618-625.
76. Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. *Blood Rev* 1993; 7: 52-62.
77. Maynard DM, Heijnen HF, Horne MK, White JG, Gahl WA. Proteomic analysis of platelet alpha-granules using mass spectrometry. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 1945–1955.
78. Italiano JE Jr, Richardson JL, Patel-Hett S, Battinelli E, Zaslavsky A, Short S, Ryeom S, Folkman J, Klement GL. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. *Blood* 2008; 111: 1227–1233.
79. Sehgal S, Storrie B. Evidence that differential packaging of the major platelet granule proteins von Willebrand factor and fibrinogen can support their differential release. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 2009–2016.
80. Stenberg PE, Shuman MA, Levine SP, Bainton DF. Redistribution of alpha-granules and their contents in thrombin-stimulated platelets. *J Cell Biol* 1984; 98: 748–760.
81. Morgenstern E, Neumann K, Patscheke H. The exocytosis of human blood platelets. A fast freezing and freeze-substitution analysis. *Eur J Cell Biol* 1987; 43: 273–282.
82. Lemons PP, Chen D, Bernstein AM, Bennett MK, Whiteheart SW. Regulated secretion in platelets: identification of elements of the platelet exocytosis machinery. *Blood* 1997; 90: 1490–1500.
83. Merten M, Thiagarajan P. P-selectin in arterial thrombosis. *Z Kardiol* 2004; 93: 855–863.
84. Nurden AT, Nurden P. The gray platelet syndrome: clinical spectrum of the disease. *Blood Rev* 2007; 21: 21–36.
85. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules, constituents, secretion and functions. *Platelets* 2001; 12: 261–273.
86. White JG. Electron opaque structures in human platelets: which are or are not dense bodies? *Platelets* 2008; 19: 455-466.
87. Ruiz FA, Lea CR, Oldfield E, Docampo R. Human platelet dense granules contain polyphosphate and are similar to acidocalcisomes of bacteria and unicellular eukaryotes. *J Biol Chem* 2004; 279 (43): 44250-7.
88. Müller F, Mutch NJ, Schenk WA, Smith SA, Esterl L, Spronk HM, Schmidbauer S, Gahl WA, Morrissey JH, Renné T. Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell.* 2009; 139: 1143-56.
89. Chen D, Bernstein AM, Lemons PP, Whiteheart SW. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: role of SNAP-23 and syntaxin 2 in dense core granule release. *Blood* 2000; 95: 921–929.
90. Huizing M, Anikster Y, Gahl WA. Hermansky-Pudlak syndrome and Chediak-Higashi syndrome: disorders of vesicle formation and trafficking. *Thromb Haemost* 2001; 86: 233–245.
91. Docampo R, Moreno SN. *Cell Calcium.* 2011; Acidocalcisomes; 50: 113-9.

92. Rosado JA. Acidic Ca²⁺ stores in platelets. *Cell Calcium* 2011; 50: 168-74.
93. Ciferri S, Emiliani C, Guglielmini G, Orlacchio A, Nenci GG, Gresele P. Platelets release their lysosomal content in vivo in humans upon activation. *Thromb Haemost* 2000; 83:157-164.
94. Bentfeld-Barker ME, Bainton DF. Identification of primary lysosomes in human megakaryocytes and platelets. *Blood* 1982; 59: 472-481.
95. Ren Q, Barber HK, Crawford GL, Karim ZA, Zhao C, Choi W, Wang CC, Hong W, Whiteheart SW. Endobrevin/VAMP-8 is the primary v-SNARE for the platelet release reaction. *Mol Biol Cell* 2007; 18: 24-33.
96. Chen D, Lemons PP, Schraw T, Whiteheart SW. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: role of SNAP-23 and syntaxin 2 and 4 in lysosome release. *Blood* 2000; 96: 1782-1788.
97. Silverstein RL, Febbraio M. Identification of lysosome-associated membrane protein-2 as an activation-dependent platelet surface glycoprotein. *Blood* 1992; 80: 1470-1475.
98. Brass, L. Understanding and Evaluating Platelet Function. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2010; p 387-96.
99. Tangelder GJ, Teirlinck HC, Slaaf DW, Reneman RS. Distribution of blood platelets flowing in arterioles. *Am J Physiol* 1985; 248: 318-323.
100. Woldhuis B, Tangelder GJ, Slaaf DW, Reneman RS. Concentration profile of blood platelets differs in arterioles and venules. *Am J Physiol* 1992; 262: 1217-1223.
101. Kaplan ZS, Jackson SP. The role of platelets in atherothrombosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011; p 51-61.
102. Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell*. 1998; 94 (5): 657-666.
103. Moroi M, Jung SM, Shinmyozu K, Tomiyama Y, Ordinas A, Diaz-Ricart M. Analysis of platelet adhesion to a collagen-coated surface under flow conditions: the involvement of glycoprotein VI in the platelet adhesion. *Blood*. 1996; 88 (6): 2081-2092.
104. Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood*. 2003; 102 (2):449-461.
105. Santoro SA. Identification of a 160,000 dalton platelet membrane protein that mediates the initial divalent cation-dependent adhesion of platelets to collagen. *Cell*. 1986; 46 (6): 913-920.
106. Ruggeri ZM. Platelet adhesion under flow. *Microcirculation*. 2009; 16 (1): 58-83.
107. Savage B, Saldivar E, Ruggeri ZM. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 1996; 84: 289-297.
108. Rumbaut RE, Randhawa JK, Smith CW, Burns AR. Mouse cremaster venules are predisposed to light/dye-induced thrombosis independent of wall shear rate, CD18, ICAM-1, or P-selectin. *Microcirculation* 2004; 11: 239-247.
109. Konstantinides S, Ware J, Marchese P, Almus-Jacobs F, Loskutoff DJ, Ruggeri ZM. Distinct antithrombotic consequences of platelet glycoprotein Ibalph and VI deficiency in a mouse model of arterial thrombosis. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 2014-2021.
110. Ruggeri ZM, Orje JN, Habermann R, Federici AB, Reininger AJ. Activation-independent platelet adhesion and aggregation under elevated shear stress. *Blood* 108: 1903-1910, 2006.
111. Mailhac A, Badimon JJ, Fallon JT, Fernandez-Ortiz A, Meyer B, Chesebro JH, Fuster V, Badimon L. Effect of an eccentric severe stenosis on fibrin(ogen) deposition on severely damaged vessel wall in arterial thrombosis. Relative contribution of fibrin(ogen) and platelets. *Circulation* 1994; 90: 988-996.
112. Ruggeri ZM. The role of von Willebrand factor in thrombus formation. *Thromb Res* 2007; 120 Suppl 2: S5-9.
113. Jackson S. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood* 2007; 109: 5087-95.
114. Laffan M, Brown SA, Collins PW, Cumming AM, Hill FG, Keeling D, Peake IR, Pasi KJ. The diagnosis of von Willebrand disease: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. *Haemophilia* 2004; 10: 199-217.
115. Denis C, Methia N, Frenette PS, Rayburn H, Ullman-Cullere M, Hynes RO, Wagner DD. A mouse model of severe von Willebrand disease: defects in hemostasis and thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 9524-9529.

116. Patel KN, Soubra SH, Bellera RV, Dong JF, McMullen CA, Burns AR, Rumbaut RE. Differential role of von Willebrand factor and P-selectin on microvascular thrombosis in endotoxemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 2225–2230.
117. Farndale RW. Collagen-induced platelet activation. *Blood Cells Mol Dis* 2006; 36: 162–165.
118. Cruz MA, Chen J, Whitelock JL, Morales LD, Lopez JA. The platelet glycoprotein Ib-von Willebrand factor interaction activates the collagen receptor alpha2beta1 to bind collagen: activation-dependent conformational change of the alpha2-I domain. *Blood* 2005; 105: 1986–1991.
119. Sarratt KL, Chen H, Zutter MM, Santoro SA, Hammer DA, Kahn ML. GPVI and alpha2beta1 play independent critical roles during platelet adhesion and aggregate formation to collagen under flow. *Blood* 2005; 106: 1268–1277.
120. Nieswandt B, Brakebusch C, Bergmeier W, Schulte V, Bouvard D, Mokhtari-Nejad R, Lindhout T, Heemskerk JW, Zirngibl H, Fassler R. Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *Embo J* 2001; 20: 2120–2130.
121. Jennings LK. Role of platelets in atherothrombosis. *Am J Cardiol* 2009; 103: 4A-10A.
122. Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion Mechanism in Platelets. *Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 403-12.
123. Kaeo K, Kanaji T, Russell S, Kunicki YJ, Furihata K, Kanaji S, *et al.* The contribution of glycoprotein VI to stable adhesion and thrombus formation illustrated by target gene deletion. *Blood* 2003; 102: 1701-7.
124. Sobocka MB, Sobocki T, Babinska A, Hartwig JH, Li M, Ehrlich YH, Kornecki E. Signaling pathways of the F11 receptor (F11R; a.k.a. JAM-1, JAM-A) in human platelets: F11R dimerization, phosphorylation and complex formation with the integrin GPIIIa. *J Recept Signal Transduct Res* 2004; 24: 85–105.
125. Nanda N, Andre P, Bao M, Clauser K, Deguzman F, Howie D, Conley PB, Terhorst C, Phillips DR. Platelet aggregation induces platelet aggregate stability via SLAM family receptor signaling. *Blood* 2005; 106: 3028–3034.
126. Andre P, Prasad KS, Denis CV, He M, Papalia JM, Hynes RO, Phillips DR, Wagner DD. CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin–dependent mechanism. *Nat Med* 2002; 8: 247–252.
127. Davi G, Patrono C. Platelet Activation and Atherothrombosis. *N Engl J Med* 2007; 357: 2482-94.
128. Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 1991; 64: 1057-1068.
129. Kahn ML, Nakanishi-Matsui M, Shapiro MJ, Ishihara H, Coughlin SR. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J Clin Invest* 1999; 103: 879–887.
130. Ishihara H, Zeng D, Connolly AJ, Tam C, Coughlin SR. Antibodies to protease-activated receptor 3 inhibit activation of mouse platelets by thrombin. *Blood* 1998; 91: 4152–4157.
131. Ishihara H, Connolly AJ, Zeng D, Kahn ML, Zheng YW, Timmons C, Tram T, Coughlin SR. Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature* 1997; 386: 502–506.
132. Kahn ML, Zheng YW, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S, Farese RV, Jr, Tam C, Coughlin SR. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature*. 1998; 394: 690–694.
133. Harmon JT, Jamieson GA. The glycojalicin portion of platelet glycoprotein Ib expresses both high and moderate affinity receptor sites for thrombin. A soluble radioreceptor assay for the interaction of thrombin with platelets. *J Biol Chem* 1986; 261: 13224–13229.
134. Weeterings C, de Groot PG, Adelmeijer J, Lisman T. The glycoprotein Ib-IX-V complex contributes to tissue factor-independent thrombin generation by recombinant factor VIIa on the activated platelet surface. *Blood* 2008; 112: 3227–3233.
135. Woulfe DS. Platelet G protein-coupled receptors in hemostasis and thrombosis. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 2193–2200.
136. Brass LF, Molino M, O'Brien PJ, Kahn M. Platelets in hematologic and cardiovascular disorders. 2nd ed. Gresele P, editor. CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, Cambridge; 2008. p 113-26.

137. TRA-CER_Executive_and_Steering_Committees. The Thrombin Receptor Antagonist for Clinical Event Reduction in Acute Coronary Syndrome (TRA*CER) trial: study design and rationale. *Am Heart J* 2009; 158: 327–34.
138. Born G.V. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962; 194: 927-29.
139. Gachet C, Cazenave JP. Platelets in hematologic and cardiovascular disorders. 2nd ed. Gresele P, editor. CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, Cambridge; 2008. p 127-39.
140. Gachet C, Hechler B, Leon C, Vial C, Leray C, Ohlmann P, Cazenave JP. Activation of ADP receptors and platelet function. *Thromb Haemost* 1997; 78: 271-75.
141. Lopez JJ, Redondo PC, Salido GM, Pariente JA, Rosado JA. Two distinct Ca²⁺ compartments show differential sensitivity to thrombin, ADP and vasopressin in human platelets. *Cell Signal* 2006; 18: 373-81.
142. Woulfe D, Yang J, Brass L. ADP and platelets: the end of the beginning. *J Clin Invest*. 2001; 107: 1503–1505.
143. Price MJ. Bedside evaluation of thienopyridine antiplatelet therapy. *Circulation* 2009; 119: 2625–32.
144. Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang RB, Nurden P, Nurden A, Julius D, Conley PB. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 2001; 409: 202–7.
145. Murugappan S, Shankar H, Kunapuli SP. Platelet receptors for adenine nucleotides and thromboxane A₂. *Semin Thromb Hemost* 2004; 30: 411–18.
146. Habib A, FitzGerald GA, Maclouf J. Phosphorylation of the thromboxane receptor alpha, the predominant isoform expressed in human platelets. *J Biol Chem* 1999; 274:2645–2651.
147. Nakahata N. Thromboxane A₂: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol Ther* 2008; 118: 18–35.
148. Halushka PV, Allan CJ, Davis-Bruno KL. Thromboxane A₂ receptors. *J Lipid Mediat Cell Signal* 1995; 12: 361-78.
149. Paul BZ, Jin J, Kunapuli SP. Molecular mechanism of thromboxane A₂-induced platelet aggregation. Essential role for p2t(ac) and alpha(2a) receptors. *J Biol Chem* 1999; 274: 29108-114.
150. Catella-Lawson F, Reilly MP, Kapoor SC, Cucchiara AJ, DeMarco S, Tournier B, Vyas SN, FitzGerald GA. Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. *N Engl J Med* 2001; 345: 1809–17.
151. Bousser MG, Amarenco P, Chamorro A, Fisher M, Ford I, Fox K, Hennerici MG, Mattle HP, Rothwell PM. Rationale and design of a randomized, double-blind, parallel-group study of terutroban 30 mg/day versus aspirin 100 mg/day in stroke patients: the prevention of cerebrovascular and cardiovascular events of ischemic origin with terutroban in patients with a history of ischemic stroke or transient ischemic attack (PERFORM) study. *Cerebrovasc Dis* 2009; 27: 509–18.
152. Grenegard M, Vretenbrant-Oberg K, Nylander M, Desilets S, Lindstrom EG, Larsson A, Ramstrom I, Ramstrom S, Lindahl TL. The ATP-gated P2X₁ receptor plays a pivotal role in activation of aspirin-treated platelets by thrombin and epinephrine. *J Biol Chem* 2008; 283: 18493-504.
153. Jakobs KH, Saur W, SchultzmG. Reduction of adenylate cyclase activity in lysates of human platelets by the alpha-adrenergic component of epinephrine. *J Cyclic Nucleotide Res* 1976; 2, 381-92.
154. Collier BS, Shattil SJ. The GPIIb/IIIa (integrin alphaIIb beta3) odyssey: a technology-driven saga of a receptor with twists, turns, and even a bend. *Blood* 2008; 112: 3011–25.
155. Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 2341–49.
156. Tadokoro S, Shattil SJ, Eto K, Tai V, Liddington RC, de Pereda JM, Ginsberg MH, Calderwood DA. Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science* 2003; 302: 103–6.

157. Moser M, Nieswandt B, Ussar S, Pozgajova M, Fassler R. Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. *Nat Med* 2008; 14: 325–330.
158. Ma YQ, Qin J, Wu C, Plow EF. Kindlin-2 (Mig-2): a co-activator of beta3 integrins. *J Cell Biol* 2008; 181: 439–46.
159. Calderwood DA, Zent R, Grant R, Rees DJ, Hynes RO, Ginsberg MH. The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation. *J Biol Chem* 1999; 274: 28071–74.
160. Patil S, Jedsadayamata A, Wencel-Drake JD, Wang W, Knezevic I, Lam SC. Identification of a talin-binding site in the integrin beta(3) subunit distinct from the NPLY regulatory motif of post-ligand binding functions. The talin n-terminal head domain interacts with the membrane-proximal region of the beta(3) cytoplasmic tail. *J Biol Chem* 1999; 274: 28575–83.
161. Wegener KL, Partridge AW, Han J, Pickford AR, Liddington RC, Ginsberg MH, Campbell ID. Structural basis of integrin activation by talin. *Cell* 2007; 128: 171–82.
162. Leisner TM, Wencel-Drake JD, Wang W, Lam SC. Bidirectional transmembrane modulation of integrin alphaIIb beta3 conformations. *J Biol Chem* 1999; 274: 12945–49.
163. Gong H, Shen B, Flevaris P, Chow C, Lam SC, Voyno-Yasenetskaya TA, Kozasa T, Du X. G protein subunit Galpha13 binds to integrin alphaIIb beta3 and mediates integrin "outside-in" signaling. *Science* 2010; 327: 340–43.
164. Obergfell A, Eto K, Mocsai A, Buensuceso C, Moores SL, Brugge JS, Lowell CA, Shattil SJ. Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with [alpha]IIb[beta]3 initiate integrin signaling to the cytoskeleton. *J Cell Biol* 2002; 157(2): 265–75.
165. Daleke DL. Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J Lipid Res* 2003; 44(2): 233–42.
166. Weiss HJ, Vicic WJ, Lages BA, Rogers J. Isolated deficiency of platelet procoagulant activity. *Am J Med* 1979; 67(2): 206–13.
167. Suzuki J, Umeda M, Sims PJ, Nagata S. Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature* 2010; 468: 834–38.
168. Prevost N, Shattil JS. Outside-In signaling by integrin. In: Michelson AD, editor. Platelet. 2nd ed. San Diego, CA USA: Elsevier/Academic Press; 2007. p. 347–57.
169. Gelb MH, Mounier CM, Hefner Y, Watson SP. Platelets in hematologic and cardiovascular disorders. 2nd ed. Gresele P, editor. CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, Cambridge; 2008. p. 221–37.
170. Pasquet JM, Quek L, Stevens C, Bobe R, Huber M, Duronio V, Krystal G, Watson SP. Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate regulates Ca(2+) entry via btk in platelets and megakaryocytes without increasing phospholipase C activity. *EMBO J* 2000; 19: 2793–2802.
171. Rittenhouse SE. Phosphoinositide 3-kinase activation and platelet function. *Blood* 1996; 88: 4401–14.
172. Fox JE. Cytoskeletal proteins and platelet signaling. *Thromb Haemost*. 2001; 86 (1): 198–213.
173. Rhee SG, Choi KD. Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes. *J Biol Chem* 1992; 267: 12393–96.
174. Torti M, Lapetina EG. Platelets in hematologic and cardiovascular disorders. 2nd ed. Gresele P, editor. CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, Cambridge; 2008. p. 238–59.
175. Abrams CS, Wu H, Zhao W, Belmonte E, White D, Brass LF. Pleckstrin inhibits phosphoinositide hydrolysis initiated by G-protein-coupled and growth factor receptors. A role for pleckstrin's PH domains. *J Biol Chem* 1995; 270: 14485–92.
176. Ozdener F, Dangelmaier C, Ashby B, Kunapuli SP, Daniel JL. Activation of phospholipase Cγ2 by tyrosine phosphorylation. *Mol Pharmacol* 2002; 62: 672–79.
177. Luckhoff A, Clapham DE. Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates an endothelial Ca(2+)-permeable channel. *Nature* 1992; 355: 356–58.
178. Biondi RM, Nebreda AR. Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions. *Biochem J* 2003; 372: 1–13.
179. Redondo PC. Blood coagulation. In: Rosado JA editor. Textbook of hemostasis and blood coagulation. Kerala 2009: Research Signpost. p. 47–60.

180. Strehler EE, Zacharias DA. Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol Rev* 2001; 81: 21-50.
181. Blaustein MP, Lederer WJ. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* 1999; 79: 763-854.
182. Metcalfe EE, Traaseth NJ, Veglia G. Serine 16 phosphorylation induces an order-to-disorder transition in monomeric phospholamban. *Biochemistry* 2005; 44: 4386-96.
183. Daniel JL, Ashby B, Pulcinelli FM. Platelets in hematologic and cardiovascular disorders. 2nd ed. Gresele P, editor. CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, Cambridge; 2008. p 272-80.
184. Gambaryan S, Kobsar A, Rukoyatkina N, Herterich S, Geiger J, Smolenski A, Lohmann SM, Walter U. Thrombin and collagen induce a feedback inhibitory signaling pathway in platelets involving dissociation of the catalytic subunit of protein kinase A from an NFkappaB-IkappaB complex. *J Biol Chem* 2010; 285:18352-63.
185. Abrams CS, Kazaniet MG. Platelets in hematologic and cardiovascular disorders. 2nd ed. Gresele P, editor. CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, Cambridge; 2008. p 272-80.
186. Bushfield M, Hopple SL, Gibson IF, Murdoch FA, MacIntyre DE. Effects of protein kinase C activation on human platelet cyclic AMP metabolism. *FEBS Lett* 1987; 222: 299-304.
187. Ryu SH, Kim UH, Wahl MI, Brown AB, Carpenter G, Huang KP, Rhee SG. Feedback regulation of phospholipase C-beta by protein kinase C. *J Biol Chem* 1990; 265: 17941-45.
188. Habib A, Vezza R, Creminon C, Maclouf J, FitzGerald GA. Rapid, agonist-dependent phosphorylation in vivo of human thromboxane receptor isoforms. Minimal involvement of protein kinase C. *J Biol Chem* 1997; 272: 7191-200.
189. Gabbeta J, Yang X, Sun L, McLane MA, Niewiarowski S, Rao AK. Abnormal inside-out signal transduction-dependent activation of glycoprotein IIb-IIIa in a patient with impaired pleckstrin phosphorylation. *Blood* 1996; 87: 1368-76.
190. Shattil SJ, Cunningham M, Wiedmer T, Zhao J, Sims PJ, Brass LF. Regulation of glycoprotein IIb-IIIa receptor function studied with platelets permeabilized by the pore-forming complement proteins C5b-9. *J Biol Chem* 1992; 267: 18424-31.
191. Geanacopoulos M, Turner J, Bowling KE, Vandenberg SR, Gear AR. The role of protein kinase C in the initial events of platelet activation by thrombin assessed with a selective inhibitor. *Thromb Res* 1993; 69: 113-24.
192. Murugappan S, Tuluc F, Dorsam RT, Shankar H, Kunapuli SP. Differential role of protein kinase C delta isoform in agonist-induced dense granule secretion in human platelets. *J Biol Chem*. 2004;279: 2360-67.
193. Konopatskaya O, Gilio K, Harper MT, Zhao Y, Cosemans JM, Karim ZA, Whiteheart SW, Molkenin JD, Verkade P, Watson SP, Heemskerk JW, Poole AW. PKCalpha regulates platelet granule secretion and thrombus formation in mice. *J Clin Invest*. 2009;119: 399-407.
194. Nagy B, Jr, Bhavaraju K, Getz T, Bynagari YS, Kim S, Kunapuli SP. Impaired activation of platelets lacking protein kinase C-theta isoform. *Blood*. 2009;113: 2557-67.
195. Chari R, Getz T, Nagy B, Jr, Bhavaraju K, Mao Y, Bynagari YS, Murugappan S, Nakayama K, Kunapuli SP. Protein kinase C[delta] differentially regulates platelet functional responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29: 699-705.
196. Pula G, Schuh K, Nakayama K, Nakayama KI, Walter U, Poole AW. PKCdelta regulates collagen-induced platelet aggregation through inhibition of VASP-mediated filopodia formation. *Blood*. 2006;108:4035-44.
197. Pears CJ, Thornber K, Auger JM, Hughes CE, Grygielska B, Protty MB, Pearce AC, Watson SP. Differential roles of the PKC novel isoforms, PKCdelta and PKCepsilon, in mouse and human platelets. *PLoS One*. 2008; 3: e3793.
198. Hall KJ, Harper MT, Gilio K, Cosemans JM, Heemskerk JW, Poole AW. Genetic analysis of the role of protein kinase Ctheta in platelet function and thrombus formation. *PLoS One*. 2008; 3: e3277.
199. Harper MT, Poole AW. Protein kinase Ctheta negatively regulates store-independent Ca²⁺ entry and phosphatidylserine exposure downstream of glycoprotein VI in platelets. *J Biol Chem*. 2010; 285: 19865-73.

- 200.Lian L, Wang Y, Flick M, Choi J, Scott EW, Degen J, Lemmon MA, Abrams CS. Loss of pleckstrin defines a novel pathway for PKC-mediated exocytosis. *Blood*. 2009; 113: 3577–84.
- 201.Casteel D.E, Smith-Nguyen EV, Sankaran B, Roh SH, Pilz RB, Kim C. A crystal structure of the cyclic GMP-dependent protein kinase I{beta} dimerization/docking domain reveals molecular details of isoform-specific anchoring. *J Biol Chem* 2010; 285: 32684-88.
- 202.Franke TF, Yang SI, Chan TO, Datta K, Kazlauskas A, Morrison DK, Kaplan DR, Tsichlis PN. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* 1995; 81:727-36.
- 203.Courtneidge SA, Fumagalli S, Koegl M, Superti-Furga G, Twamley-Stein GM. The Src family of protein tyrosine kinases: regulation and functions. *Dev Suppl*, 1993: 57-64.
- 204.Levy S. Platelets in hematologic and cardiovascular disorders. 2nd ed. Gresele P, editor. CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, Cambridge; 2008. p 113-126.
- 205.Jackson SP, Schoenwaelder SM, Yuan Y, Salem HH, Cooray P. Non-receptor protein tyrosine kinases and phosphatases in human platelets. *Thromb Haemost* 1997; 76: 640-50.
- 206.Inazu T, Taniguchi T, Yanagi S, Yamamura H. Protein-tyrosine phosphorylation and aggregation of intact human platelets by vanadate with H₂O₂. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 170: 259-63.
- 207.Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990; 61: 203-12.
- 208.Vogel W, Lammers R, Huang J, Ullrich A. (1993) Activation of a phosphotyrosine phosphatase by tyrosine phosphorylation. *Science* 1993; 259: 1611-14.
- 209.Vijayan KV, Liu Y, Li TT, Bray PF. Protein phosphatase 1 associates with the integrin alphaIIb subunit and regulates signaling. *J Biol Chem* 2004; 279: 33039-42.
- 210.Bouaziz A, Amor NB, Woodard GE, Zibidi H, Lopez JJ, Bartegi A, Salido GM, Rosado JA. Tyrosine phosphorylation/dephosphorylation balance is involved in thrombin-evoked microtubular reorganisation in human platelets. *Thromb Haemost* 2007; 98: 375-84.
- 211.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: 973-79.
- 212.Jennigs LK. Mechanisms of platelet activation: Need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thromb Haemost* 2009; 102: 248–257
- 213.Smith SS, Mcever RP, Weyrich AS, Morrell CN, Hoffman MR, Arepally GM, French PA, Dauerman HL, Beckerss RC for the 2009 Platelet Colloquium Participants. Platelet funciones beyond hemostasis. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 1759-66.
- 214.Coppinger JA, Cagney G, Toomey S, Kislinger T, Belton O, McRedmond JP, Cahill DJ, Emili A, Fitzgerald DJ, Maguire PB. Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood*. 2004;103: 2096–2104.
- 215.Reed GL. Platelet secretory mechanisms. *Semin Thromb Hemost*. 2004; 30: 441–450.
- 216.McRedmond JP, Park SD, Reilly DF, Coppinger JA, Maguire PB, Shields DC, Fitzgerald DJ. Integration of proteomics and genomics in platelets: a profile of platelet proteins and platelet-specific genes. *Mol Cell Proteomics*. 2004; 3(2): 133-44. .
- 217.Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev*. 2009; 23: 177-89.
- 218.Ren Q, Barber HK, Crawford GL, Karim ZA, Zhao C, Choi W, Wang CC, Hong W, Whiteheart SW. Endobrevin/VAMP-8 is the primary v-SNARE for the platelet release reaction. *Mol Biol Cell*. 2007; 18: 24-33.
- 219.Zimmerberg J, Vogel SS, Chernomordik LV. Mechanisms of membrane fusion. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 1993; 22: 433–466.
- 220.Coorsen JR, Haslam RJ. GTP gamma S and phorbol ester act synergistically to stimulate both Ca(2+)-independent secretion and phospholipase D activity in permeabilized human platelets: inhibition by BAPTA and analogues *FEBS Lett*. 1993; 316: 170–174.

221. Coorsen JR. Phospholipase activation and secretion: evidence that PLA2, PLC, and PLD are not essential to exocytosis. *Am J Physiol.* 1996; 270: C1153–C1163.
222. Vitale N, Caumont AS, Chasserot-Golaz S, Du G, Wu S, Sciorra VA, Morris AJ, Frohman MA, Bader MF. Phospholipase D1: a key factor for the exocytotic machinery in neuroendocrine cells. *EMBO J.* 2001; 20: 2424–2434.
223. Jones D, Morgan C, Cockcroft S. Phospholipase D and membrane traffic: potential roles in regulated exocytosis, membrane delivery and vesicle budding. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1439: 229–244.
224. Eberhard DA, Cooper CL, Low MG, Holz RW. Evidence that the inositol phospholipids are necessary for exocytosis: loss of inositol phospholipids and inhibition of secretion in permeabilized cells caused by a bacterial phospholipase C and removal of ATP. *Biochem J.* 1990; 268: 15–25.
225. Rozenvayn N, Flaumenhaft R. Protein kinase C mediates translocation of type II phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase required for platelet alpha-granule secretion. *J Biol Chem.* 2003; 278: 8126–8134.
226. Janmey PA, Xian W, Flanagan LA. Controlling cytoskeleton structure by phosphoinositide-protein interactions: phosphoinositide binding protein domains and effects of lipid packing. *Chem Phys Lipids.* 1999; 101: 93–107.
227. Itoh T, Takenawa T. Phosphoinositide-binding domains: functional units for temporal and spatial regulation of intracellular signalling. *Cell Signal.* 2002; 14: 733–743.
228. Schiavo G, Gu QM, Prestwich GD, Sollner TH, Rothman JE. Calcium-dependent switching of the specificity of phosphoinositide binding to synaptotagmin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93: 13327–13332.
229. Humeau Y, Vitale N, Chasserot-Golaz S, Dupont JL, Du G, Frohman MA, Bader MF, Poulain B. A role for phospholipase D1 in neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98: 15300–15305.
230. Fasshauer D, Sutton RB, Brunger AT, Jahn R. Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95: 15781–15786.
231. Jahn R, Sudhof TC. Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem.* 1999; 68: 863–911.
232. Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature.* 1998; 395: 347–353.
233. Weber T, Zemelman BV, McNew JA, et al. SNAREpins: Minimal Machinery for Membrane Fusion. *Cell.* 1998; 92: 759–772.
234. Marks MS. SNAREing platelet granule secretion. *Blood* 2012; 120: 2355–2357.
235. Lemons PP, Chen D, Bernstein AM, Bennett MK, Whiteheart SW. Regulated secretion in platelets: identification of elements of the platelet exocytosis machinery. *Blood.* 1997; 90: 1490–1500.
236. Reed GL, Houg AK, Fitzgerald ML. Human platelets contain SNARE proteins and a Sec1p homologue that interacts with syntaxin 4 and is phosphorylated after thrombin activation: implications for platelet secretion. *Blood.* 1999; 93: 2617–2626.
237. Bernstein AM, Whiteheart SW. Identification of a cellubrevin/vesicle associated membrane protein 3 homologue in human platelets. *Blood.* 1999; 93: 571–579.
238. Polgar J, Chung S-H, Reed G. VAMP-3 and VAMP-8 form SNARE complexes in human platelets and are required for alpha-granule secretion. *Blood.* 2001; 100: 1081–1083.
239. Bernstein AM, Whiteheart SW. Identification of a cellubrevin/vesicle associated membrane protein 3 homologue in human platelets. *Blood.* 1999; 93: 571–579.
240. Polgar J, Chung SH, Reed GL. Vesicle-associated membrane protein 3 (VAMP-3) and VAMP-8 are present in human platelets and are required for granule secretion. *Blood.* 2002; 100: 1081–1083.
241. Schraw TD, Rutledge TW, Crawford GL, et al. Granule stores from cellubrevin/VAMP-3 null mouse platelets exhibit normal stimulus-induced release. *Blood.* 2003; 102: 1716–1722.
242. Polgar J, Lane WS, Chung SH, et al. Phosphorylation of SNAP-23 in activated human platelets. *J Biol Chem.* 2003; 278: 44369–44376.

- 243.Chen D, Bernstein AM, Lemons PP, Whiteheart SW. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: role of SNAP-23 and syntaxin 2 in dense core granule release. *Blood*. 2000; 95: 921–929.
- 244.Chen D, Lemons PP, Schraw T, Whiteheart SW. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: role of SNAP-23 and syntaxin 2 and 4 in lysosome release. *Blood*. 2000; 96: 1782–1788.
- 245.Feng D, Crane K, Rozenvayn N, Dvorak AM, Flaumenhaft R. Subcellular distribution of 3 functional SNARE proteins: human cellubrevin, SNAP-23, and Syntaxin 2. *Blood*. 2002; 99: 4006–4014.
- 246.Flaumenhaft R, Croce K, Chen E, et al. Proteins of the exocytotic core complex mediate platelet alpha-granule secretion. Roles Of vesicle-associated membrane protein, snap-23, and syntaxin 4. *J Biol. Chem*. 1999; 274: 2492–2501.
- 247.Chen D, Lemons PP, Schraw T, Whiteheart SW. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: role of SNAP-23 and syntaxin 2 and 4 in lysosome release. *Blood*. 2000; 96: 1782–1788.
- 248.Polgar J, Chung SH, Reed GL. Vesicle-associated membrane protein 3 (VAMP-3) and VAMP-8 are present in human platelets and are required for granule secretion. *Blood*. 2002; 100(3):1081-3.
- 249.Lemons PP, Chen D, Whiteheart SW. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: requirements for alpha- granule release. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 267: 875–880.
- 250.Ye S, Karim ZA, Al Hawas R, Pessin JE, Filipovich AH, Whiteheart SW. Syntaxin-11, but not syntaxin-2 or syntaxin-4, is required for platelet secretion. *Blood* 2012; 120 (12): 2484-92.
- 251.Ma L, Perini R, McKnight W, et al. Proteinase-activated receptors 1 and 4 counter-regulate endostatin and VEGF release from human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102: 216–220.
- 252.Morimoto T, Ogihara S, Takisawa H. Anchorage of secretion-competent dense granules on the plasma membrane of bovine platelets in the absence of secretory stimulation. *J Cell Biol*. 1990; 111: 79–86.
- 253.Polgar J, Reed GL. A critical role for N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) in platelet granule secretion. *Blood*. 1999; 94: 1313–1318.
- 254.Whiteheart SW, Schraw T, Matveeva EA. N-ethylmaleimide sensitive factor (NSF) structure and function. *Int Rev Cytol*. 2001; 207: 71–112.
- 255.Schwarz TL. NSF is up to new tricks. *Nat Cell Biol*. 1999; 1: E141–E143.
- 256.Clary DO, Griff IC, Rothman JE. SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast. *Cell*. 1990; 61: 709–721.
- 257.Chen D, Bernstein AM, Lemons PP, Whiteheart SW. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: role of SNAP-23 and syntaxin 2 in dense core granule release. *Blood*. 2000; 95: 921–929.
- 258.Hata Y, Slaughter CA, Sudhof TC. Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin. *Nature*. 1993; 366: 347–351.
- 259.Reed GL, Houg AK, Fitzgerald ML. Human platelets contain SNARE proteins and a Sec1p homologue that interacts with syntaxin 4 and is phosphorylated after thrombin activation: implications for platelet secretion. *Blood*. 1999; 93: 2617–2626.
- 260.Dent J, Kato K, Peng XR, Martinez C, Cattaneo M, Poujol C, Nurden P, Nurden A, Trimble WS, Ware J. A prototypic platelet septin and its participation in secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99: 3064–3069.
- 261.Chen D, Guo J, Miki T, Tachibana M, Gahl WA. Molecular cloning and characterization of rab27a and rab27b, novel human rab proteins shared by melanocytes and platelets. *Biochem Mol Med*. 1997; 60: 27–37.
- 262.Karniguian A, Zahraoui A, Tavitian A. Identification of small GTP-binding rab proteins in human platelets: thrombin-induced phosphorylation of rab3B, rab6, and rab8 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90: 7647–7651.
- 263.Richards-Smith B, Novak EK, Jang EK, He P, Haslam RJ, Castle D, Whiteheart SW, Swank RT. Analyses of proteins involved in vesicular trafficking in platelets of mouse models of Hermansky Pudlak syndrome. *Mol Genet Metab*. 1999; 68: 14–23.

264. Fitzgerald ML, Reed GL. Rab6 is phosphorylated in thrombin-activated platelets by a protein kinase C-dependent mechanism: effects on GTP/GDP binding and cellular distribution. *Biochem J.* 1999; 342: 353–360.
265. Shirakawa R, Yoshioka A, Horiuchi H, Nishioka H, Tabuchi A, Kita T. Small GTPase rab4 regulates Ca²⁺-induced alpha-granule secretion in platelets. *J Biol Chem.* 2000; 275: 33844–33849.
266. Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2:107–117.
267. Stenberg PE, Shuman MA, Levine SP, Bainton DF. Redistribution of alpha-granules and their contents in thrombin-stimulated platelets. *J Cell Biol.* 1984; 98:748–760.
268. Ginsberg MH, Taylor L, Painter RG. The mechanism of thrombin-induced platelet factor 4 secretion. *Blood.* 1980; 55:661–668.
269. Escolar G, White JG. The platelet open canalicular system: a final common pathway. *Blood Cells.* 1991; 17: 467–485.
270. Morgenstern E, Neumann K, Patscheke H. The exocytosis of human blood platelets: a fast freezing and freeze-substitution analysis. *Eur J Cell Biol.* 1987; 43: 273–282.
271. Berry S, Dawicki DD, Agarwal KC, Steiner M. The role of microtubules in platelet secretory release. *Biochim Biophys Acta.* 1989; 1012: 46–56.
272. Gerrard JM, Israels SJ, Friesen LL. Protein phosphorylation and platelet secretion. *Nouv Rev Fr Hematol.* 1985; 27: 267–273.
273. Marcu MG, Zhang L, Nau-Staudt K, Trifaro JM. Recombinant scinderin, an F-actin severing protein, increases calcium-induced release of serotonin from permeabilized platelets, an effect blocked by two scinderin-derived actin-binding peptides and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *Blood.* 1996; 87: 20–24.
274. Hartwig JH, Thelen M, Rosen A, Janmey PA, Nairn AC, Aderem A. MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature.* 1992; 356: 618–622.
275. Trifaro JM, Lejen T, Rose SD, Pene TD, Barkar ND, Seward EP. Pathways that control cortical F-actin dynamics during secretion. *Neurochem Res.* 2002; 27: 1371–1385.
276. Suzuki Y, Yamamoto M, Wada H, Ito M, Nakano T, Sasaki Y, Narumiya S, Shiku H, Nishikawa M. Agonist-induced regulation of myosin phosphatase activity in human platelets through activation of Rho-kinase. *Blood.* 1999; 93: 3408–3417.
277. Watanabe Y, Ito M, Kataoka Y, Wada H, Koyama M, Feng J, Shiku H, Nishikawa M. Protein kinase C-catalyzed phosphorylation of an inhibitory phosphoprotein of myosin phosphatase is involved in human platelet secretion. *Blood.* 2001; 97: 3798–3805.
278. Nishikawa M, Tanaka T, Hidaka H. Ca²⁺-calmodulin-dependent phosphorylation and platelet secretion. *Nature.* 1980; 287: 863–865.
279. Lokeshwar VB, Bourguignon LY. The involvement of Ca²⁺ and myosin light chain kinase in collagen-induced platelet activation. *Cell Biol Int Rep.* 1992; 16: 883–897.
280. Saitoh M, Naka M, Hidaka H. The modulatory role of myosin light chain phosphorylation in human platelet activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986; 140: 280–287.
281. Tanaka T, Saitoh M, Ito M, Shin T, Naka M, Endo K, Hidaka H. Inhibition of human platelet secretion and of Ca²⁺, calmodulin-dependent protein phosphorylation by the antiallergic agent GMCHA. *Biochem Pharmacol.* 1988; 37: 2537–2542.
282. Rose SD, Lejen T, Casaletti L, Larson RE, Pene TD, Trifaro JM. Molecular motors involved in chromaffin cell secretion. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 971: 222–231.
283. Neco P, Gil A, Del Mar Frances M, Viniegra S, Gutierrez LM. The role of myosin in vesicle transport during bovine chromaffin cell secretion. *Biochem J.* 2002; 368: 405–413.
284. Knight DE, Scrutton MC. Direct evidence for a role for Ca²⁺ in amine storage granule secretion by human platelets. *Thromb Res.* 1980; 20: 437–446.
285. Niki I, Hidaka H. Roles of intracellular Ca²⁺ receptors in the pancreatic beta-cell in insulin secretion. *Mol Cell Biochem.* 1999; 190: 119–124.

286. Tomida Y, Terasawa M, Kobayashi R, Hidaka H. Calcyclin and calvasculin exist in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992; 189: 1310–1316.
287. Grinstein S, Furuya W. Binding of 125I-calmodulin to platelet alpha-granules. *FEBS Lett*. 1982; 140: 49–52.
288. Croce K, Flaumenhaft R, Rivers M, Furie B, Furie BC, Herman IM, Potter DA. Inhibition of calpain blocks platelet secretion, aggregation, and spreading. *J Biol Chem*. 1999; 274: 36321–36327.
289. Rutledge TW, Whiteheart SW. SNAP-23 is a target for calpain cleavage in activated platelets. *J Biol Chem*. 2002; 277: 37009–37015.
290. Lai KC, Flaumenhaft R. SNARE protein degradation upon platelet activation: Calpain cleaves SNAP-23. *J Cell Physiol*. 2003; 194: 206–214.
291. Brass LF. The molecular basis of platelet activation. In: Hoffman R, Shattil S, Furie B, Cohen H, Silberstein LE, eds. *Hematology: Basic Principles and Practice*. New York: Churchill Livingstone; 2000.
292. Reed GL, Hough AK, Fitzgerald ML. Human platelets contain SNARE proteins and a Sec1p homologue that interacts with syntaxin 4 and is phosphorylated after thrombin activation: implications for platelet secretion. *Blood*. 1999; 93: 2617–2626.
293. Dent J, Kato K, Peng XR, Martinez C, Cattaneo M, Poulou C, Nurden P, Nurden A, Trimble WS, Ware J. A prototypic platelet septin and its participation in secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99: 3064–3069.
294. Chung SH, Polgar J, Reed GL. Protein kinase C phosphorylation of syntaxin 4 in thrombin-activated human platelets. *J Biol Chem*. 2000; 275: 25286–25291.
295. Elzagallaai A, Rose SD, Trifaro JM. Platelet secretion induced by phorbol esters stimulation is mediated through phosphorylation of MARCKS: a MARCKS-derived peptide blocks MARCKS phosphorylation and serotonin release without affecting pleckstrin phosphorylation. *Blood*. 2000; 95: 894–902.
296. Wang J, Arbuzova A, Hangyas-Mihalyne G, McLaughlin S. The effector domain of myristoylated alanine-rich C kinase substrate binds strongly to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem*. 2001; 276: 5012–5019.
297. Arbuzova A, Schmitz AA, Vergeres G. Cross-talk unfolded: MARCKS proteins. *Biochem J*. 2002; 362: 1–12.
298. Rozenvayn N, Flaumenhaft R. Phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate mediates Ca²⁺-induced platelet alpha-granule secretion: evidence for type II phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase function. *J Biol Chem*. 2001; 276: 22410–22419.
299. Rozenvayn N, Flaumenhaft R. Protein kinase C mediates translocation of type II phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase required for platelet alpha-granule secretion. *J Biol Chem*. 2003; 278: 8126–8134.
300. Patel Y, Kakkar VV, Authi KS. Calpain-induced down-regulation of protein kinase C inhibits dense-granule secretion in human platelets: inhibition of platelet aggregation or calpain activity preserves protein kinase C and restores full secretion. *Biochim Biophys Acta*. 1994; 1224: 480–488.
301. Li Z, Zhang G, Liu J, Stojanovic A, Ruan C, Lowell CA, Du X. An important role of the SRC family kinase Lyn in stimulating platelet granule secretion. *J Biol Chem*. 2010; 285: 12559–12570.
302. Woulfe D, Jiang H, Morgans A, Monks R, Birnbaum M, Brass LF. Defects in secretion, aggregation, and thrombus formation in platelets from mice lacking Akt2. *J Clin Invest*. 2004; 113: 441–450.
303. Chen J, De S, Damron DS, Chen WS, Hay N, Byzova TV. Impaired platelet responses to thrombin and collagen in AKT-1-deficient mice. *Blood*. 2004; 104: 1703–1710.
304. Stojanovic A, Marjanovic JA, Brovkovich VM, Peng X, Hay N, Skidgel RA, Du X. A phosphoinositide 3-kinase-AKT-nitric oxide-cGMP signaling pathway in stimulating platelet secretion and aggregation. *J Biol Chem*. 2006; 281: 16333–16339.
305. Li Z, Zhang G, Marjanovic JA, Ruan C, Du X. A platelet secretion pathway mediated by cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. 2004; 279: 42469–42475.

- 306.Randriamboavonjy V, Schrader J, Busse R, Fleming I. Insulin induces the release of vasodilator compounds from platelets by a nitric oxide-G kinase-VAMP-3-dependent pathway. *J Exp Med*. 2004; 199: 347–356.
- 307.Flevaris P, Li Z, Zhang G, Zheng Y, Liu J, Du X. Two distinct roles of mitogen-activated protein kinases in platelets and a novel Rac1-MAPK-dependent integrin outside-in retractile signaling pathway. *Blood*. 2009; 113: 893–901.
- 308.Adam F, Kauskot A, Nurden P, Sulpice E, Hoylaerts MF, Davis RJ, Rosa JP, Bryckaert M. Platelet JNK1 is involved in secretion and thrombus formation. *Blood* 2010; 115: 4083–4092.
- 309.Walter TR, Watson SP. Synergy between Ca²⁺ and protein kinase C is the major factor in determining the level of secretion from human platelets. *Biochem J* 1993; 289: 277-282.
- 310.Yoshioka A, Shirakawa R, Nishioka H, Tabuchi A, Higashi T, Ozaki H, Yamamoto A, Kita T, Horiuchi H. Identification of protein kinase Calpha as an essential, but not sufficient, cytosolic factor for Ca²⁺-induced alpha- and dense- core granule secretion in platelets. *J Biol Chem* 2001; 276: 39379-85.
- 311.Berridge MJ. Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Physiol* 1997; 499 (2): 291-306.
- 312.Furuichi T, Yoshikawa S, Miyawaki A, Wada K, Maeda N, Mikoshiba K. Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P400. *Nature* 1989; 342:32-38.
- 313.Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 517-529.
- 314.Chadwick CC, Saito A, Fleischer S. Isolation and characterization of the inositol trisphosphate receptor from smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 2132-2136.
- 315.Taylor CW, Richardson A. Structure and function of inositol trisphosphate receptors. *Pharmacol Ther* 1991; 51: 97-137.
- 316.Missiaen L, Taylor CW, Berridge MJ. Spontaneous calcium release from inositol trisphosphate-sensitive calcium stores. *Natura* 1991; 352: 241-244.
- 317.Bezprozvanny I, Watras J, Ehrlich BE. Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P₃- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature* 1991; 351: 751-754.
- 318.Bezprozvanny I, Ehrlich BE. ATP modulates the function of inositol 1,4,5-trisphosphate-gated channels at two sites. *Neuron* 1993; 10: 1175-1184.
- 319.Endo M. Calcium-induced calcium release in skeletal muscle. *Physiol Rev* 2009; 89:1153-1176
- 320.Lopez JJ, Camello-Almaraz C, Pariente JA, Salido GM, Rosado JA. Ca²⁺ accumulation into acidic organelles mediated by Ca²⁺- and vacuolar H⁺-ATPases in human platelets. *Biochem J* 2005; 390: 243-252.
- 321.Zhu MX, Evans AM, Ma J, Parrington J, Galione A. Two-pore channels for integrative Ca signaling. *Commun Integr Biol* 2010; 3: 12-17.
- 322.Young KW, Bootman MD, Channing DR, Lipp P, Maycox PR, Meakin J, Challiss RA, Nahorski, SR. Lysophosphatidic acid-induced Ca²⁺ mobilization requires intracellular sphingosine 1-phosphate production. Potential involvement of endogenous EDG-4 receptors. *J Biol Chem* 2000; 275: 38532-38539.
- 323.McDonald TF, Pelzer S, Trautwein W, Pelzer DJ. Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells. *Physiol Rev* 1994; 74: 365-507.
- 324.Wang Y, Deng X, Mancarella S, Hendron E, Eguchi S, Soboloff J, Tang XD, Gill DL. The calcium store sensor, STIM1, reciprocally controls Orai and CaV1.2 channels. *Science* 2010; 330: 105-109.
- 325.Irvine RF, McNulty TJ, Schell MJ. Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate as a second messenger--a special role in neurones? *Chem Phys Lipids* 1999; 98: 49-57.
- 326.Rosado JA, Sage SO. Protein kinase C activates non-capacitative calcium entry in human platelets. *J Physiol* 2000; 529(1): 159-169.
- 327.Jardin I, Redondo PC, Salido GM, Rosado J A. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate enhances store-operated calcium entry through hTRPC6 channel in human platelets. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783: 84-97.

328. Benarroch EE. NMDA receptors: recent insights and clinical correlations. *Neurology* 2011; 76: 1750-1757.
329. Putney JW Jr. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 1986; 7: 1-12.
330. Parekh AB, Penner R. Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev* 1997; 77: 901-930.
331. 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: 7527-7533.
332. Fasolato C, Hoth M, Penner R. A GTP-dependent step in the activation mechanism of capacitative calcium influx. *J Biol Chem* 1993; 268: 20737-20740.
333. Yao Y, Ferrer-Montiel AV, Montal M, Tsien RY. Activation of store-operated Ca^{2+} current in *Xenopus* oocytes requires SNAP-25 but not a diffusible messenger. *Cell* 1999; 98: 475-485.
334. Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV, Ohlsen K, Liudyno M, Zhang S, Safrina O, Kozak JA, Wagner SL, Cahalan MD, Velicelebi G, Stauderman KA. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca^{2+} channel function. *J Cell Biol* 2005; 169: 435-445.
335. Zhang SL, Yu Y, Roos J, Kozak JA, Deerinck TJ, Ellisman MH, Stauderman KA, Cahalan MD. STIM1 is a Ca^{2+} sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca^{2+} store to the plasma membrane. *Nature* 2005; 437: 902-905.
336. Stathopoulos PB, Zheng L, Ikura M. Stromal interaction molecule (STIM) 1 and STIM2 calcium sensing regions exhibit distinct unfolding and oligomerization kinetics. *J Biol Chem* 2009; 284: 728-732.
337. Liou J, Kim ML, Heo WD, Jones JT, Myers JW, Ferrell JE Jr, Meyer T. STIM is a Ca^{2+} sensor essential for Ca^{2+} -store-depletion-triggered Ca^{2+} influx. *Curr Biol* 2005; 15: 1235-1241.
338. Deng X, Wang Y, Zhou Y, Soboloff J, Gill DL. STIM and Orai: dynamic intermembrane coupling to control cellular calcium signals. *J Biol Chem* 2009; 284: 22501-22505.
339. Stathopoulos PB, Li GY, Plevin MJ, Ames JB, Ikura M. 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* 2006; 281: 35855-35862.
340. 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: 337-343.
341. Muik M, Fahrner M, Derler I, Schindl R, Bergsmann J, Frischauf I, Groschner K, Romanin CA. Cytosolic Homomerization and a Modulatory Domain within STIM1 C Terminus Determine Coupling to ORAI1 Channels. *J Biol Chem* 2009; 284: 8421-8426.
342. Park CY, Hoover PJ, Mullins FM, Bachhawat P, Covington ED, Raunser S, Walz T, Garcia KC., Dolmetsch RE, Lewis RS. STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell* 2009; 136: 876-890.
343. 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 U S A* 2009; 106: 15495-15500.
344. Lee KP, Yuan JP, Zeng W, So I, Worley PF, Muallem S. Molecular determinants of fast Ca^{2+} -dependent inactivation and gating of the Orai channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 14687-14692.
345. Srikanth S, Jung HJ, Kim KD, Souda P, Whitelegge J, Gwack Y. A novel EF-hand protein, CRACR2A, is a cytosolic Ca^{2+} sensor that stabilizes CRAC channels in T cells. *Nat Cell Biol* 2010; 12:436-446.
346. Liou J, Fivaz M, Inoue T, Meyer T. 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 U S A* 2007; 104:9301-9306.
347. Huang GN, Zeng W, Kim JY, Yuan JP, Han L, Muallem S, Worley PF. STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, *I*(crac) and TRPC1 channels. *Nat Cell Biol* 2006; 8:1003-1010.
348. Smyth JT, Petranka JG, Boyles RR, DeHaven WI, Fukushima M, Johnson KL, Williams JG, Putney JW Jr. Phosphorylation of STIM1 underlies suppression of store-operated calcium entry during mitosis. *Nat Cell Biol* 2009; 11: 1465-1472.

349. Pozo-Guisado E, Campbell DG, Deak M, Alvarez-Barrientos A, Morrice NA, Alvarez IS, Alessi DR, Martin-Romero FJ. Phosphorylation of STIM1 at ERK1/2 target sites modulates store-operated calcium entry. *J Cell Sci* 2010; 123:3084-3093.
350. Birnbaumer L, Zhu X, Jiang M, Boulay G, Peyton M, Vannier B, Brown D, Platano D, Sadeghi H, Stefani E, Birnbaumer M. On the molecular basis and regulation of cellular capacitative calcium entry: roles for Trp proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 93:15195-15202.
351. 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: 191-198.
352. Hardie RC, Minke B. The trp gene is essential for a light-activated Ca^{2+} channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* 1992; 8: 643-651.
353. Montell C. Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* 2001; re1.
354. Parekh AB, Putney JW Jr. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* 2005; 85: 757-810.
355. Zhu X, Jiang M, Peyton M, Boulay G, Hurst R, Stefani E, Birnbaumer L. trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca^{2+} entry. *Cell* 1996; 85: 661-671.
356. Zitt C, Zobel A, Obukhov AG, Harteneck C, Kalkbrenner F, Luckhoff A, Schultz G. Cloning and functional expression of a human Ca^{2+} -permeable cation channel activated by calcium store depletion. *Neuron* 1996; 16: 1189-1196.
357. Rosado JA, Sage SO. Coupling between inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and human transient receptor potential channel 1 when intracellular Ca^{2+} stores are depleted. *Biochem J* 2000; 350(3): 631-635.
358. Brough GH, Wu S, Cioffi D, Moore TM, Li M, Dean N, Stevens T. Contribution of endogenously expressed Trp1 to a Ca^{2+} -selective, store-operated Ca^{2+} entry pathway. *FASEB J* 2001; 15:1727-1738.
359. 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; 277:42157-42163.
360. Ambudkar IS, Ong HL, Liu X, Bandyopadhyay B, Cheng KT. TRPC1: the link between functionally distinct store-operated calcium channels. *Cell Calcium* 2007; 42:213-223.
361. Sinkins WG, Estacion M, Schilling WP. Functional expression of TrpC1: a human homologue of the *Drosophila* Trp channel. *Biochem J* 1998; 331: 331-339.
362. Lintschinger B, Balzer-Geldsetzer M, Baskaran T, Graier WF, Romanin C, Zhu MX, Groschner K. Coassembly of Trp1 and Trp3 proteins generates diacylglycerol- and Ca^{2+} -sensitive cation channels. *J Biol Chem* 2000; 275: 27799-27805.
363. Dietrich A, Chubanov V, Kalwa H, Rost BR, Gudermann T. Cation channels of the transient receptor potential superfamily: their role in physiological and pathophysiological processes of smooth muscle cells. *Pharmacol Ther* 2006; 112: 744-760.
364. Varga-Szabo D, Authi KS, Braun A, Bender M, Ambily A, Hassock SR, Gudermann T, Dietrich A, Nieswandt B. Store-operated Ca^{2+} entry in platelets occurs independently of transient receptor potential (TRP) C1. *Pflugers Arch* 2008; 457: 377-387.
365. Wes PD, Chevesich J, Jeromin A, Rosenberg C, Stetten G, Montell C. TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 9652-9656.
366. Zhu X, Chu PB, Peyton M, Birnbaumer L. Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the *Drosophila* trp gene. *FEBS Lett* 1995; 373: 193-198.
367. Cohen AW, Hnasko R, Schubert W, Lisanti MP. Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol Rev* 2004; 84: 1341-1379.
368. Tang J, Lin Y, Zhang Z, Tikunova S, Birnbaumer L, Zhu MX. Identification of common binding sites for calmodulin and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors on the carboxyl termini of trp channels. *J Biol Chem* 2001; 276: 21303-21310.
369. 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: 739-750.

- 370.Liu X, Bandyopadhyay BC, Singh BB, Groschner K, Ambudkar IS. Molecular analysis of a store-operated and 2-acetyl-sn-glycerol-sensitive non-selective cation channel. Heteromeric assembly of TRPC1-TRPC3. *J Biol Chem* 2005; 280: 21600-21606.
- 371.Plant TD, Schaefer M. Receptor-operated cation channels formed by TRPC4 and TRPC5. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2005; 371: 266-276.
- 372.Zagranichnaya TK, Wu X, Villereal ML. Endogenous TRPC1, TRPC3, and TRPC7 proteins combine to form native store-operated channels in HEK-293 cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 29559-29569.
- 373.Eder P, Schindl R, Romanin C, Groschner K. Protein-Protein Interactions in TRPC Channel Complexes. In: Liedtke WB, Heller S editors. TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades. Boca Raton (FL): CRC Press; 2007. Chapter 24.
- 374.Trebak M, Vazquez G, Bird GS, Putney JW Jr. The TRPC3/6/7 subfamily of cation channels. *Cell Calcium* 2003; 33: 451-461.
- 375.Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G. Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 1999; 397: 259-263.
- 376.Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel SH, Tanasa B, Hogan PG, Lewis RS, Daly M, Rao A. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 2006; 441: 179-185.
- 377.Xiao B, Tu JC, Worley PF. Homer: a link between neural activity and glutamate receptor function. *Curr Opin Neurobiol* 2000; 10: 370-374.
- 378.Soloviev MM, Ciruela F, Chan WY, McIlhinney RA. Mouse brain and muscle tissues constitutively express high levels of Homer proteins. *Eur J Biochem*. 2000; 267; 634-9.
- 379.Yuan JP, Kiselyov K, Shin DM, Chen J, Shcheynikov N, Kang SH, Dehoff MH, Schwarz MK, Seeburg PH, Muallem S, Worley PF. Homer binds TRPC family channels and is required for gating of TRPC1 by IP3 receptors. *Cell* 2003; 114: 777-89.
- 380.Yuan JP, Lee KP, Hong JH, Muallem S. The closing and opening of TRPC channels by Homer1 and STIM1. *Acta Physiol* 2012; 204: 238-247.
- 381.Pani B, Ong HL, Liu X, Rauser K, Ambudkar IS, Singh BB. Lipid rafts determine clustering of STIM1 in endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions and regulation of store-operated Ca²⁺ entry (SOCE). *J Biol Chem* 2008; 283: 17333-17340.
- 382.Baba Y, Hayashi K, Fujii Y, Mizushima A, Watarai H, Wakamori M, Numaga T, Mori Y, Iino M, Hikida M, Kurosaki T. Coupling of STIM1 to store-operated Ca²⁺ entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 16704-16709.
- 383.Yuan JP, Zeng W, Huang GN, Worley PF, Muallem S. STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 636-645.
- 384.Lopez JJ, Salido GM, Pariente JA, Rosado JA. Interaction of STIM1 with endogenously expressed human canonical TRP1 upon depletion of intracellular Ca²⁺ stores. *J Biol Chem* 2006; 281: 28254-28264.
- 385.Sundivakkam PC, Kwiatek AM, Sharma TT, Minshall RD, Malik AB, Tiruppathi C. 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* 2009; 296: C403-413.
- 386.Adebiyi A, Narayanan D, Jaggar JH. 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* 2012; 286: 4341-4348.
- 387.SpasoVA MA, Soboloff J, He LP, Xu W, Dziadek MA, Gill DL. STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca²⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 4040-4045.
- 388.Mercer JC, Dehaven WI, Smyth JT, Wedel B, Boyles RR, Bird GS, Putney JW Jr. Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1. *J Biol Chem* 2006; 281: 24979-24990.
- 389.Soboloff J, SpasoVA MA, Hewavitharana T, He LP, Xu W, Johnstone LS, Dziadek MA, Gill DL. STIM2 is an inhibitor of STIM1-mediated store-operated Ca²⁺ Entry. *Curr Biol* 2006; 16: 1465-1470.

390. Kiselyov K, Shin DM, Shcheynikov N, Kurosaki T, Muallem S. Regulation of Ca²⁺-release-activated Ca²⁺ current (*I*_{crac}) by ryanodine receptors in inositol 1,4,5-trisphosphate-receptor-deficient DT40 cells. *Biochem J* 2001; 360: 17-22.
391. Stefanini L, Bergmeier W. CalDAG-GEFI and platelet activation. *Platelets* 2010; 21:239-243.
392. Enouf J, Bobe R, Lacabaratz-Porret C, Bredoux R, Corvazier E, Kovacs T, Papp B. The platelet Ca²⁺ transport ATPase system. *Platelets* 1997; 8: 5-14.
393. Toyoshima C. Structural aspects of ion pumping by Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys* 2008; 476: 3-11.
394. Simmerman HK, Jones LR. Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol Rev* 1998; 78: 921-947.
395. Lacabaratz-Porret C, Corvazier E, Kovacs T, Bobe R, Bredoux R, Launay S, Papp B, Enouf J. Platelet sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ATPase isoform 3b and Rap 1b: interrelation and regulation in physiopathology. *Biochem J* 1998; 332: 173-181.
396. Thastrup O, Dawson AP, Scharff O, Foder B, Cullen PJ, Drobak BK, Bjerrum PJ, Christensen SB, Hanley MR. Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. *Agents Actions* 1989; 27: 17-23.
397. Davidson GA, Varhol RJ. Kinetics of thapsigargin-Ca²⁺-ATPase (sarcoplasmic reticulum) interaction reveals a two-step binding mechanism and picomolar inhibition. *J Biol Chem* 1995; 270: 11731-11734.
398. Cavallini L, Coassin M, Alexandre A. 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* 1995; 310: 449-452.
399. Carafoli E, Stauffer T. The plasma membrane calcium pump: functional domains, regulation of the activity, and tissue specificity of isoform expression. *J Neurobiol* 1994; 25: 312-324.
400. Strehler EE, Zacharias DA. Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol Rev* 2001; 81: 21-50.
401. Adunyah SE, Dean WL. Regulation of human platelet membrane Ca²⁺ transport by cAMP- and calmodulin-dependent phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1987; 930: 401-409.
402. Moore C, Tymvios C, Emerson M. Functional regulation of vascular and platelet activity during thrombosis by nitric oxide and endothelial nitric oxide synthase. *Thromb Haemost* 2010; 104: 342-349.
403. Watson SP. Platelet activation by extracellular matrix proteins in haemostasis and thrombosis. *Curr Pharm Des* 2009; 15: 1358-1372.
404. Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P, Meldolesi J. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev* 1994; 74: 595-636.
405. Camello-Almaraz C, Pariente JA, Salido G, Camello PJ. Differential involvement of vacuolar H⁺-ATPase in the refilling of thapsigargin- and agonist-mobilized Ca²⁺ stores. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 271: 311-317.
406. Christensen KA, Myers JT, Swanson JA. pH-dependent regulation of lysosomal calcium in macrophages. *J Cell Sci* 2002; 115: 599-607.
407. Camacho M, Machado JD, Alvarez J, Borges R. Intravesicular calcium release mediates the motion and exocytosis of secretory organelles: a study with adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem* 2008; 283: 22383-22389.
408. Camello-Almaraz MC, Pozo MJ, Murphy MP, Camello PJ. Mitochondrial production of oxidants is necessary for physiological calcium oscillations. *J Cell Physiol* 2006; 206: 487-494.
409. de la Fuente S, Montenegro P, Fonteriz RI, Moreno A, Lobaton CD, Montero M, Alvarez J. The dynamics of mitochondrial Ca²⁺ fluxes. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1797: 1727-1735.
410. Redondo PC, Salido GM, Pariente JA, Rosado JA. Dual effect of hydrogen peroxide on store-mediated calcium entry in human platelets. *Biochem Pharmacol* 2004; 67: 1065-1076.
411. Jardin I, Ben Amor N, Bartegi A, Pariente JA, Salido GM, Rosado JA. Differential involvement of thrombin receptors in Ca²⁺ release from two different intracellular stores in human platelets. *Biochem J* 2007; 401: 167-174.

- 412.Zbidi H, Jardin I, Woodard GE, Lopez JJ, Berna A, Salido GM, Rosado JA. STIM1 and STIM2 are located in the acidic Ca²⁺ stores and associates with Orai1 upon depletion of the acidic stores in human platelets. *J Biol Chem* 2011; 286: 12257-70.
- 413.Redondo, PC, Salido GM, Pariente JA, Sage SO, Rosado JA. SERCA2b and 3 play a regulatory role in store-operated calcium entry in human platelets. *Cell Signal* 2008; 20: 337-346.
- 414.Salido GM, Jardin I, Rosado JA. The TRPC ion channels: association with Orai1 and STIM1 proteins and participation in capacitative and non-capacitative calcium entry. *Adv Exp Med Biol* 2011; 704: 413-433.
- 415.Morales S, Camello PJ, Rosado JA, Mawe GM, Pozo MJ. Disruption of the filamentous actin cytoskeleton is necessary for the activation of capacitative calcium entry in naive smooth muscle cells. *Cell Signal* 2005; 17: 635-645.
- 416.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: 2147-2154.
- 417.Galan C, Zbidi H, Bartegi A, Salido GM, Rosado JA. STIM1, Orai1 and hTRPC1 are important for thrombin- and ADP-induced aggregation in human platelets. *Arch Biochem Biophys* 2009; 490: 137-144.
- 418.Baur H, Kasperek S, Pfaff E. Criteria of viability of isolated liver cells. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1975; 356: 827-838 Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY.
- 419.A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985; 260 : 3440-3450.
- 420.Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W, Lechleiter JD. Chemical calcium indicators. *Methods* 2008; 46: 143-151.
- 421.Sage SO, Merritt JE, Hallam TJ, Rink TJ. Receptor-mediated calcium entry in fura-2-loaded human platelets stimulated with ADP and thrombin. Dual-wavelengths studies with Mn²⁺. *Biochem J* 1989; 258: 923-926.
- 422.Rosado JA, Sage SO. Farnesylcysteine analogues inhibit store-regulated Ca²⁺ entry in human platelets: evidence for involvement of small GTP-binding proteins and actin cytoskeleton. *Biochem J* 2000; 347: 183-192.
- 423.Hisatsune C, Nakamura K, Kuroda Y, Nakamura T, Mikoshiba K. Amplification of Ca²⁺ signaling by diacylglycerol-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production. *J Biol Chem* 2005; 280: 11723-11730.
- 424.Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
- 425.Burnette WN. "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* 1981; 112: 195-203.
- 426.Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
- 427.Bonifacino JS, Dell'Angelica EC, Springe TA. Immunoprecipitation. *Curr Protoc Immunol* 2001; Chapter 8, Unit 83.
- 428.Neumann E. Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* 1982; 1: 841-845.
- 429.Yamasaki M, Masgrau R, Morgan AJ, Churchill GC, Patel S, Ashcroft SJ. Galione AJ. Organelle selection determines agonist-specific Ca²⁺ signals in pancreatic acinar and beta cells. *Biol Chem*. 2004; 279: 7234-7240.
- 430.Wedel B, Boyles RR, Putney JW Jr, Bird GS. 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*. 2007; 579: 679-89.
- 431.Bird GS, Hwang SY, Smyth JT, Fukushima M, Boyles RR, Putney JW Jr. STIM1 is a calcium sensor specialized for digital signaling. *Curr Biol* 2009; 19: 1724-9.
- 432.Hoth M, Penner R. Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *J Physiol*. 1993; 465: 359-86.

433. Bakowski D y Parekh AB. Voltage-dependent conductance changes in the store-operated Ca^{2+} current ICRAc in rat basophilic leukaemia cells. *J Physiol*. 2000; 529 Pt 2: 295-306.
434. Luik RM, Wang B, Prakriya M, Wu MM, Lewis RS. Oligomerization of STIM1 couples ER calcium depletion to CRAC channel activation. *Nature* 2008; 454: 538-42.
435. Trepakova ES, Gericke M, Hirakawa Y, Weisbrod RM, Cohen RA, Bolotina VM. Properties of a native cation channel activated by Ca^{2+} store depletion in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 7782-90.
436. Smani T, Zakharov SI, Csutora P, Leno E, Trepakova ES, Bolotina VM. A novel mechanism for the store-operated calcium influx pathway. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 113-20.
437. Albert AP, Saleh SN, Peppiatt-Wildman CM, Large WA. Multiple activation mechanisms of store-operated TRPC channels in smooth muscle cells. *J Physiol*. 2007; 583: 25-36.
438. Guibert C, Ducret T, Savineau JP. Voltage-independent calcium influx in smooth muscle. *Prog Biophys Mol Biol*. 2008; 98: 10-23.
439. Woodard GE, Salido GM, Rosado JA. Enhanced exocytotic-like insertion of Orai1 into the plasma membrane upon intracellular Ca^{2+} store depletion. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 294: C1323-31.
440. Cahalan MD. STIMulating store-operated Ca^{2+} entry. *Nat Cell Biol* 2009; 11: 669-77.
441. Liu X, Wang W, Singh BB, Lockwich T, Jadlowiec J, O'Connell B, Wellner R, Zhu MX, Ambudkar IS. Trp1, a candidate protein for the store-operated Ca^{2+} influx mechanism in salivary gland cells. *J Biol Chem*. 2000; 275: 3403-11.
442. Xu SZ, Beech DJ. TrpC1 is a membrane-spanning subunit of store-operated Ca^{2+} channels in native vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 2001; 88: 84-7.
443. 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: 42157-42163.
444. Louis M, Zanou N, Van Schoor M, Gailly P. TRPC1 regulates skeletal myoblast migration and differentiation. *J Cell Sci*. 2008; 121: 3951-9.
445. Liao Y, Erxleben C, Abramowitz J, Flockerzi V, Zhu MX, Armstrong DL, Birnbaumer L. Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/ICRAc channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105: 2895-900.
446. Liao Y, Erxleben C, Yildirim E, Abramowitz J, Armstrong DL, Birnbaumer L. Orai proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 4682-7.
447. Yeromin AV, Zhang SL, Jiang W, Yu Y, Safrina O, Cahalan MD. Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature* 2006; 443: 226-9.
448. Jardin I, Lopez JJ, Salido GM, Rosado JA. Orai1 mediates the interaction between STIM1 and hTRPC1 and regulates the mode of activation of hTRPC1-forming Ca^{2+} channels. *J Biol Chem* 2008; 283: 25296-25304.
449. Jardin I, Gomez LJ, Salido GM, Rosado JA. 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* 2009; 420: 267-276.
450. Liao Y, Plummer NW, George MD, Abramowitz J, Zhu MX, Birnbaumer L. 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 U S A* 2009; 106: 3202-6.
451. Lee HJ, Bae GU, Leem YE, Choi HK, Kang TM, Cho H, Kim ST, Kang JS. Phosphorylation of Stim1 at serine 575 via netrin-2/Cdo-activated ERK1/2 is critical for the promyogenic function of Stim1. *Mol Biol Cell*. 2012; 23: 1376-87.
452. Lopez E, Jardin I, Berna-Erro A, Bermejo N, Salido GM, Sage SO, Rosado JA, Redondo PC. STIM1 tyrosine-phosphorylation is required for STIM1-Orai1 association in human platelets. *Cell Signal*. 2012; 24: 1315-22.
453. Jardin I, Albarran L, Bermejo N, Salido GM, Rosado JA. Homers regulate calcium entry and aggregation in human platelets: a role for Homers in the association between STIM1 and Orai1. *Biochem J* 2012; 445: 29-38.

454. Jardín I, Lopez JJ, Salido GM, Rosado JA. Functional relevance of the de novo coupling between hTRPC1 and type II IP3 receptor in store-operated Ca²⁺ entry in human platelets. *Cell Signal* 2008; 20: 737-47.