

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO  
NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**“Inhibidores de las cinasas Akt y PKC activan la  
fuga de calcio del retículo endoplásmico vía el  
translocón Sec61 en células HeLa”**

Tesis que presenta

**M. en C. Lizeth Sandoval Vázquez**

Para obtener el grado de:

**Doctora en ciencias en la especialidad en  
Bioquímica**

Director de Tesis:

**Dr. Agustín Guerrero Hernández**

## Agradecimientos

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de calcio intracelular y su función celular del departamento de Bioquímica del CINVESTAV, bajo la dirección del Dr. Agustín Guerrero Hernández. Para la realización de este trabajo la autora fue becaria CONACYT (No. 278093); por lo que agradezco profundamente al CONACYT, al CINVESTAV y al departamento de Bioquímica por apoyarme en todo este gran proceso del doctorado.

Quiero agradecer al Dr. Guerrero por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y siempre estar en la mejor disposición para enseñarme, explicarme y apoyarme en este largo proceso. A mis asesores, los Dres. Guillermo Ávila, Jesús Valdés, Antonio Arias y Julio Morán; gracias por su tiempo, asesoría, conocimientos y sus valiosos comentarios brindados para el enriquecimiento de este trabajo.

A los Dres. Jesús Olivares y Eduardo Monjaraz, mi más profundo agradecimiento por ser parte fundamental en mi desarrollo tanto personal como profesional; para mi ha sido un honor formar parte de sus laboratorios y llevo una parte de ellos en mi corazón.

A mis padres por estar siempre presentes en mi vida y brindarme su apoyo, consejo y cuidado; esta etapa fue difícil para mí, ya que conocí la ansiedad, y ellos me brindaron su fortaleza para continuar y culminar el doctorado, los amo mucho y sin duda son mi ejemplo para seguir adelante; estaré muy feliz si llego a tener una mínima parte de su determinación, fuerza y resiliencia.

A mis hermanos, Alfredo, Vero, Claus, Goyo, por siempre brindarme un consejo, tener tiempo para escucharme, demostrarme que no hay imposibles y sobre todo tener toda la confianza en mí para lograr cualquier cosa que me proponga, aunque para mí parezca difícil tirando a imposible; los amo, cada uno con un matiz diferente, pero sin duda alguna con la misma intensidad.

A mis sobrinos, Dani y Mena, y mi cuñado por brindarme una tranquilidad que pensé perdida por momentos; además de ofrecerme su cariño y comprensión sin necesidad de alguna explicación, los quiero desde lo más profundo de mi corazón.

A Belisario Maximiliano Tettlepanquetzal gracias por tu amor, apoyo y estar ahí para mí. Gracias infinitas por ser mi pepun.

# TEMARIO

1.- <a href="#">Abreviaturas</a>	3
2.- <a href="#">Resumen</a>	4
2.- <a href="#">Abstract</a>	5
3.- <a href="#">Introducción</a>	6
3.1.- <a href="#">Retículo endoplásmico</a>	6
3.1.1.- <a href="#">Funciones del ER</a>	6
3.1.2.- <a href="#">Ca<sup>2+</sup> como segundo mensajero</a>	8
3.2.- <a href="#">Canales de liberación</a>	9
3.3.- <a href="#">Bomba SERCA</a>	11
3.4.- <a href="#">Canales de fuga</a>	12
3.4.1.- <a href="#">Presenilina</a>	12
3.4.2.- <a href="#">Canales Orai</a>	14
3.4.3.- <a href="#">TRPM8</a>	14
3.4.4.- <a href="#">TRPV1</a>	15
3.5.- <a href="#">Translocón</a>	16
3.5.1.- <a href="#">Proteínas asociadas al translocón</a>	16
3.5.2.- <a href="#">Estructura</a>	18
3.5.3.- <a href="#">Translocación cotraduccional</a>	19
3.5.4.- <a href="#">Translocación postraduccional</a>	20
3.5.5.- <a href="#">Retrotranslocación</a>	21
3.5.6.- <a href="#">El translocón como canal de fuga de Ca<sup>2+</sup></a>	22
3.5.7.- <a href="#">Mecanismos que regulan la fuga de Ca<sup>2+</sup></a>	24
3.5.8.- <a href="#">Proteínas fosforiladas</a>	26
3.6.- <a href="#">Estaurosporina (Sts), inhibidor generalizado de cinasas</a>	27
3.6.1.- <a href="#">La cinasa C de proteínas o PKC</a>	27
3.6.2.- <a href="#">La cinasa B de proteínas o Akt</a>	29
3.6.3.- <a href="#">Sts induce movimiento de cationes</a>	30
3.6.4.- <a href="#">Sts induce apoptosis</a>	31
3.7.- <a href="#">Apoptosis</a>	31
4.- <a href="#">Antecedentes</a>	33
4.1.- <a href="#">El Translocón como canal de fuga de Ca<sup>2+</sup></a>	33
4.2.- <a href="#">Sts induce liberación de Ca<sup>2+</sup> de almacenes intracelulares</a>	35
5.- <a href="#">Justificación</a>	36
6.- <a href="#">Hipótesis</a>	37
7.- <a href="#">Objetivos</a>	37

7.1 <a href="#">Objetivo general</a>	37
7.2 <a href="#">Objetivos particulares</a>	37
8.- <a href="#">Material y Métodos</a>	38
8.1.- <a href="#">Cultivo celular y transfección</a>	38
8.2.- <a href="#">Registros simultáneos de Ca<sup>2+</sup> intracelular y Ca<sup>2+</sup> luminal</a>	39
8.3.- <a href="#">Registros con indicadores de Ca<sup>2+</sup> proteicos</a>	43
8.4.- <a href="#">Medición de la actividad de la caspasa 3</a>	44
8.5- <a href="#">Análisis estadístico</a>	45
9.- <a href="#">Resultados</a>	46
9.1.- <a href="#">La Estaurosporina, un inhibidor generalizado de cinasas, reduce el Ca<sup>2+</sup> luminal siendo la PKC uno de sus blancos</a>	46
9.2.- <a href="#">Los inhibidores de PKC liberan Ca<sup>2+</sup> proveniente del retículo endoplásmico</a>	51
9.3.- <a href="#">Los inhibidores de PKC inducen la fuga de Ca<sup>2+</sup> a través del translocón</a>	55
9.4.- <a href="#">Participación de PKC en la salida de Ca<sup>2+</sup> del retículo endoplásmico</a>	61
9.5.- <a href="#">PKC participa en la fuga de Ca<sup>2+</sup> estimulada por Sts</a>	65
9.6.- <a href="#">La participación de otras cinasas en el efecto de Sts</a>	68
9.7.- <a href="#">El inhibidor de Akt VIII induce fuga de Ca<sup>2+</sup> del retículo endoplásmico</a>	71
9.8.- <a href="#">Akt es la otra cinasa involucrada en la fuga de Ca<sup>2+</sup> inducida por Sts</a>	73
9.9.- <a href="#">La participación de las fosfatasas en la fuga de Ca<sup>2+</sup></a>	77
9.10.- <a href="#">La fuga de Ca<sup>2+</sup> del ER no incrementa la actividad de la caspasa 3</a>	80
9.11.- <a href="#">La fuga de Ca<sup>2+</sup> inducida por Sts se presenta en otros tipos celulares diferentes a las células HeLa</a>	81
10.- <a href="#">Discusión</a>	83
11.- <a href="#">Conclusiones</a>	89
12.- <a href="#">Perspectivas</a>	90
13.- <a href="#">Apéndice</a>	91
14.- <a href="#">Bibliografía</a>	94

## 1.- Abreviaturas

**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>**: Concentración intracelular de calcio

**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>RE</sub>**: Concentración de calcio en el retículo endoplásmico

**2-APB** 2-Aminoetoxidifenil borato

**Akt** Cinasa B de proteínas o PKB

**Akti VIII** Inhibidor de Akt VIII

**Ca<sup>2+</sup>** Calcio

**CaM** Calmodulina

**CaMK** Proteína cinasa dependiente de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina

**DAG** Diacilglicerol

**DMSO** Dimetilsulfóxido

**DTT** Ditiotreitól

**GAP** Proteína activadora de GTP-asas

**Glut4** Transportador de glucosa 4

**His** Histamina

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

**PDBu** Forbol 12,13-Dibutirato

**PDK1** Proteína cinasa 1 dependiente de fosfoinosítidos

**PKA** Cinasa A de proteínas

**PKC** Cinasa C de proteínas

**PKG** Cinasa G de proteínas

**PP1** Proteína fosfatasa 1

**PP2a** Proteína fosfatasa 2a

**RE** Retículo endoplásmico

**RyR** Receptor de Rianodina

**SOCE** Entrada de Ca<sup>2+</sup> operada por depósitos

**SRP** Partícula de reconocimiento de péptido señal

**Sts** Estaurosporina

**TEA<sup>+</sup>** Trihidroxietilamina

**Tg** Tapsigargina

**TM** Transmembrana

## 2.- Resumen

El retículo endoplásmico (RE) participa en una gran variedad de procesos celulares entre los que se encuentran: la detoxificación de xenobióticos, síntesis de lípidos, translocación, plegamiento y modificación de proteínas; generación de lisosomas y de gránulos de secreción, además de ser el principal reservorio de  $\text{Ca}^{2+}$ . La membrana del RE presenta la bomba SERCA, que utiliza ATP para bombear  $\text{Ca}^{2+}$  al interior del RE, canales de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , como son el  $\text{IP}_3\text{R}$  y el RyR, y también canales de fuga de  $\text{Ca}^{2+}$ , entre los que se propone están el translocón, la presinilina, los Orai2 y 3, y los TRPVs. La homeostasis de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$  depende de la acción balanceada de la bomba SERCA y los canales de fuga, y estos últimos evitan la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE. El translocón es un complejo formado por fosfoproteínas que permite la translocación de proteínas al interior del RE de dos maneras, la cotraduccional y la postraduccional; adicionalmente, se ha reportado que presenta actividad de fuga de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por otro lado, la estaurosporina (Sts, un inhibidor generalizado de cinasas) induce un incremento transitorio de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$  que involucra a los almacenes intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por lo anterior, decidimos identificar el canal iónico implicado en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del ER en respuesta a la Sts e identificar las cinasas de proteínas que estarían participando. La Sts, al igual que los inhibidores específicos de la PKC (Gö6983 y Gö6976) y de Akt (Akti VIII), redujeron la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$  y este efecto fue eliminado por emetina y puromicina, aunque la reducción de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$  fue mayor con puromicina que con Sts. Estos datos sugieren la participación del translocón en el efecto de la Sts. La reducción selectiva de la PKC por el proceso conocido como “down-regulation” demostró que la PKC no es la única cinasa involucrada. El inhibidor de la cinasa de tirosina Src, PP1, redujo la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$  al mismo nivel que Gö6976 y el “down-regulation” de la PKC inhibió el efecto de PP1. Esto sugiere una intercomunicación entre Src y la PKC. El inhibidor de Akt (Akti VIII) redujo la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$  al mismo nivel que Sts; la ausencia de suero por 24 horas eliminó el efecto de Akti VIII, sin modificar el efecto de Sts. La PKC no reemplazó la ausencia de Akt por lo que sugerimos que una tercera cinasa de naturaleza desconocida estaría participando además de PKC y Akt. El efecto de Sts en la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$  requiere parcialmente de la actividad de las fosfatasas PP1 y PP2A. La reducción de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$  por Sts se observó también en otros tipos celulares como las células HEK, MEF y MCF-7 por lo que podemos decir que este efecto no es exclusivo de las células HeLa. Por último, el efecto de activar la caspasa-3 por Sts no requirió el vaciamiento del RE por lo que Sts activa caspasa-3 sin involucrar al translocón. En resumen, este trabajo sugiere que la fosforilación del translocón evita la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico.

## 2.- Abstract

The endoplasmic reticulum participates in a large variety of cell functions, among others are xenobiotics elimination, lipid synthesis, translocation, folding and maturation of proteins, lysosome, and secretory granule biogenesis, in addition to being the main intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  store. For this purpose, the ER membrane expresses three different types of proteins: the SERCA pump, release channels, and  $\text{Ca}^{2+}$  leak channels. The SERCA pump introduces  $\text{Ca}^{2+}$  to the ER against its electrochemical gradient by hydrolyzing ATP. The  $\text{Ca}^{2+}$  release channels,  $\text{IP}_3\text{R}$  and RyR, respond with  $\text{Ca}^{2+}$  release, the former to  $\text{IP}_3$ -producing agonists, while the latter is instrumental in excitation contraction-coupling in striated muscles. The  $\text{Ca}^{2+}$  leak channels are the least studied of the three types of ER proteins and involve many  $\text{Ca}^{2+}$  permeable channels that are highly selective, like Orai channels or non-selective cation channels such as the translocon, presenilin, and TRPVs. The  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  is kept constant due to the combined action of the SERCA pump and the leak channels; the latter prevent ER  $\text{Ca}^{2+}$  overloading. The translocon is an ER membrane phosphoprotein involved in protein translocation during protein synthesis (cotranslational) or after the protein has been synthesized (posttranslational) that also present a  $\text{Ca}^{2+}$  leak activity. Staurosporine (Sts), a potent but unspecific kinase inhibitor, induces  $\text{Ca}^{2+}$  release from internal stores in HeLa cells. Therefore, this work aims to identify the channel involved in ER  $\text{Ca}^{2+}$  leak and the nature of the kinase involved. Sts and PKC (Gö6983 and Gö6976) and Akt (Akti VIII) inhibitors reduce  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ , and this effect was inhibited by emetine and puromycin, suggesting that kinase inhibition activates the translocon to induced ER  $\text{Ca}^{2+}$  leak. PKC down-regulation eliminated the reduction in the  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  induced by Gö6976 and Gö6983, while the absence of serum for 24 hours eliminated the effect on the  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  by Akti VIII. None of these two maneuvers inhibited Sts-induced  $\text{Ca}^{2+}$  leak. Since the inhibition of PKC and Akt does not suffice to explain the effect of Sts on the  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ , these data suggest the participation of a third unidentified kinase in addition to PKC and Akt. Sts reduced the  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  in HeLa cells and HEK, MEF, and MCF-7 cells arguing for a generalized effect by Sts. The activation of caspase-3 by Sts is not required to reduce the  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  implying that translocon is not participating in the Sts-induced apoptosis. The data shown here suggest that phosphorylation is a mechanism to limit ER  $\text{Ca}^{2+}$  leak activity by translocon.

## 3.- Introducción

### 3.1.- Retículo Endoplásmico

El retículo endoplásmico es un sistema continuo de membranas que delimita un espacio luminal, el cual es muy diferente al espacio citosólico; y presenta varios dominios que realizan distintas funciones y favorecen el contacto con diferentes organelos. Entre las funciones del retículo endoplásmico se encuentran: la translocación de proteínas a través de la membrana del retículo endoplásmico, integración de proteínas en la membrana, plegamiento y modificación de proteínas en la luz del retículo, síntesis de fosfolípidos y esteroides, detoxificación de xenobióticos, biogénesis de lisosomas y de gránulos de secreción, además del almacenamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  y su liberación regulada al citosol (Gia K. Voeltz 2002; Schwarz and Blower 2016).

#### 3.1.1 Funciones del retículo endoplásmico

**Destoxificación de xenobióticos:** en el retículo endoplásmico se localizan varias enzimas involucradas en la eliminación de xenobióticos, como el citocromo P450, las monooxigenasas que contiene flavinas, las esterasas, la epóxido hidrolasa, la UDP-glucuronosiltransferasa y la glutatión-S-transferasa (Crib et al. 2005).

**Síntesis de fosfolípidos:** el retículo endoplásmico contiene una gran variedad de enzimas involucradas en la síntesis de fosfolípidos y triglicéridos, entre ellas están GPAT y AGPAT, enzimas que generan el ácido fosfatídico, que es el precursor de los fosfolípidos. También se encuentran las enzimas PAP involucrada en la defosforilación del diacilglicerol fosfato, CEPT encargada de sintetizar la fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, PSS1 y PSS2 encargadas de la formación de fosfatidilserina y PIS que sintetiza el fosfatidilinositol. Además, en el retículo endoplásmico se inicia la síntesis de los esfingolípidos (Carman y Han 2009).

**Translocación, plegamiento y modificaciones de las proteínas:** el translocón es un canal proteico que se ubica en la membrana del retículo endoplásmico y es responsable de la translocación co- y post- traduccional de proteínas al lumen del retículo. Ya dentro del retículo, las chaperonas BiP, GRP94, GRP170, calnexina, calreticulina, calmegina y PDI ayudan con el plegamiento de las proteínas recién sintetizadas. Además, en el lumen del retículo se encuentran enzimas que se encargan de las modificaciones postraduccionales de las proteínas, como son: la peptidasa señal, la cual remueve al péptido señal de la proteína nascente; la OST que es la enzima encargada de la N-glicosilación; y la carboxilasa dependiente de vitamina K que está encargada de la  $\gamma$ -carboxilación del glutamato. También se encuentran las enzimas involucradas en la hidroxilación de las proteínas recién sintetizadas como la lisil hidroxilasa (Chevet et al. 2001; Rowling y Freedman 1993).

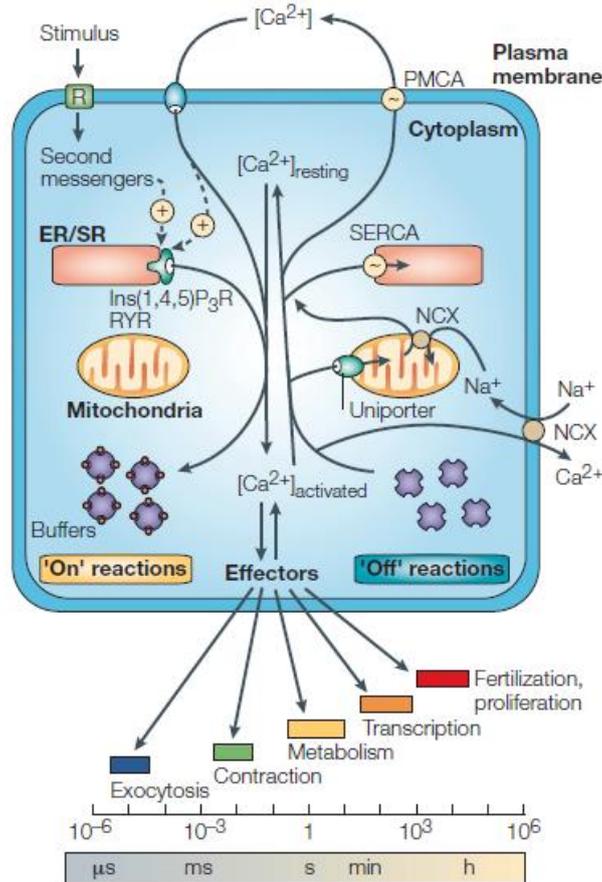
**Almacenamiento y liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ :** El retículo representa el principal reservorio intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , y en el lumen se expresan proteínas de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ , las cuales secuestran el  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de este organelo. La bomba SERCA, ubicada en la membrana del retículo, utiliza ATP para bombear  $\text{Ca}^{2+}$  al interior del retículo, donde es amortiguado por proteínas como calsecuestrina o calreticulina, que se caracterizan por tener baja afinidad y alta capacidad. Otros elementos presentes en la membrana del retículo son los canales de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  entre los que se encuentra el receptor de inositol 1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) y el receptor de rianodina (RyR). Ambos son sensibles a  $\text{Ca}^{2+}$  por lo cual presentan el fenómeno de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por  $\text{Ca}^{2+}$  (CIRC), este proceso ayuda a un rápido incremento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Además de los canales de liberación, también se expresan otros canales permeables al  $\text{Ca}^{2+}$  que tienen cierta fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  y por lo tanto juegan un papel importante en la regulación de las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que evita la sobrecarga del retículo y mantienen una concentración en reposo de alrededor de 600  $\mu\text{M}$  (Berridge et al. 2003; Clapham 2007).

### 3.1.2 Ca<sup>2+</sup> como segundo mensajero

El Ca<sup>2+</sup> citosólico juega un papel importante en la regulación de una amplia variedad de procesos intracelulares tales como: liberación de neurotransmisores, acople excitación-contracción en el músculo, desarrollo embrionario, diferenciación celular, el control del tono vascular, proliferación y migración celular, angiogénesis y apoptosis, entre otros. La versatilidad del ion Ca<sup>2+</sup> para regular estos procesos se debe a que modifica la actividad de una gran variedad de proteínas efectoras como cinasas, fosfatasas, canales iónicos y transportadores; dichas alteraciones dependen de la amplitud del cambio en la concentración, del tiempo y la región subcelular donde ocurren dichos incrementos del Ca<sup>2+</sup>. Un incremento prolongado de las concentraciones citosólicas de Ca<sup>2+</sup> puede resultar tóxico, por lo cual la célula gasta una cantidad importante de energía para mantener las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> citosólico cercanas a 100 nM contra un gradiente de 4 órdenes de magnitud (Clapham 2007; Guerrero-Hernandez et al. 2010)

La concentración de Ca<sup>2+</sup> citosólico está determinada por el balance entre los procesos que permiten la entrada de Ca<sup>2+</sup> al citoplasma y los procesos encargados de la remoción del ión; dichos procesos incluyen la acción concertada de bombas, canales, amortiguadores e intercambiadores. Un incremento en las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> puede deberse a la entrada de calcio del medio extracelular, a la liberación de calcio de los almacenes intracelulares o a la combinación de ambos procesos (Berridge et al. 2003).

La membrana plasmática presenta diversos canales que permiten la entrada de Ca<sup>2+</sup> del medio extracelular, y que pueden activarse en respuesta a una gran variedad de estímulos como son la despolarización (canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje), agonistas (receptores a glutamato, entre otros), segundos mensajeros (canales activados por diacilglicerol) y depleción de almacenes intracelulares (canales de calcio operados por almacenes intracelulares); mientras que la liberación de Ca<sup>2+</sup> de almacenes intracelulares es regulada por un amplio grupo de mensajeros como son el IP<sub>3</sub>, ADP ribosa cíclica, NAADP y proteínas (FKBP12, CaM), así como por las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> citosólico (Figura 3.1, Clapham 1995).



**Figura 3.1** Señalización, dinámica y homeostasis del ion  $\text{Ca}^{2+}$ . Del lado izquierdo se representan las condiciones que estimulan el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (on reaction) y del lado derecho se representa los mecanismos de remoción de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (off reaction). Tomado de Berridge 2003.

### 3.2.- Canales de liberación

#### 3.2.1 Receptor de Rianodina

El receptor de rianodina (RyR) es un canal de calcio implicado en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de almacenes intracelulares; se identificó por primera vez en el retículo sarcoplásmico del músculo esquelético, en el cual ejerce un papel esencial en la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  durante el acople excitación-contracción (Building 1997).

Se han identificado tres isoformas (RyR1, RyR2 y RyR3), las cuales están codificadas por distintos genes y presentan un 70% de homología. El RyR1 se expresa en células de músculo esquelético, RyR2 en el músculo cardíaco y el RyR3 se encuentra expresado de manera ubicua en tejidos como cerebro,

cerebelo, hígado, páncreas, glándula suprarrenal, pulmón, bazo, testículos y ovarios (Fill and Copello 2002).

El RyR es un homotetrámero y cada subunidad tiene una masa molecular de aproximadamente 565 kDa; RyR presenta un dominio N-terminal grande en el lado citoplasmático que funciona como andamio para la interacción de proteínas reguladoras, además de modular la apertura del poro del canal localizado en el C-terminal (Zalk et al. 2007).

RyR es activado por  $\text{Ca}^{2+}$ , ATP, cafeína, bajas concentraciones de rianodina ( $<10 \mu\text{M}$ ) y ADP-ribosa cíclica, pero es inhibido por  $\text{Mg}^{2+}$  y altas concentraciones de rianodina ( $\geq 10 \mu\text{M}$ ). La actividad del RyR está modulada por fosforilaciones mediadas por las cinasas PKA, PKG y CAMKII; además, por la interacción con proteínas como la calmodulina, calsecuestrina y la proteína de unión a FK506 (Ozawa 2010; Willegems and Efremov 2017).

### **3.2.2 Receptor de $\text{IP}_3$**

El receptor de  $\text{IP}_3$  ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) es un canal de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular expresado en todos los tejidos del cuerpo; presenta tres isoformas ( $\text{IP}_3\text{R1}$ ,  $\text{IP}_3\text{R2}$  e  $\text{IP}_3\text{R3}$ ) codificadas por diferentes genes. El  $\text{IP}_3\text{R}$  tiene un papel importante en la generación y propagación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  que coordinan varias funciones celulares como la muerte celular (Joseph 1996).

El  $\text{IP}_3\text{R}$  está constituido por cuatro subunidades de un peso molecular de 310 kDa, y cada subunidad presenta 3 dominios. El extremo N-terminal contiene el sitio de unión a  $\text{IP}_3$ , el cual está constituido por 10 aminoácidos con carga positiva, la región reguladora que presenta sitios de unión para ATP y  $\text{Ca}^{2+}$  y de otras proteínas como calmodulina; el extremo C-terminal se puede dividir en dos partes, la región que forma el poro constituida por 6 pases transmembrana y la región citoplasmática importante en el ensamble de las subunidades (Szlufcik et al. 2006).

El  $\text{IP}_3\text{R}$  puede ser modulado por varias cinasas como CaMK, PKG, PKC y PKA; también se ha reportado que el  $\text{IP}_3\text{R}$  es blanco de cinasas de tirosina como Lyn, además de interactuar con fosfatasa como la PP1 y la PP2a; este complejo

de fosfatasa, cinasa y sustrato permite la rápida regulación de la actividad del IP<sub>3</sub>R por ciclos reversibles de fosforilación/desfosforilación (Berridge, Bootman, and Roderick 2003). Además, las proteínas de la familia Bcl-2 interaccionan con el IP<sub>3</sub>R para regular la liberación de calcio inducido por IP<sub>3</sub> que participa en el control de la muerte celular programada (Parys 2014).

### 3.3.- Bomba SERCA

La ATPasa de Ca<sup>2+</sup> del retículo sarco/endoplásmico (SERCA) es una proteína transmembranal de la familia de ATPasas tipo P con una masa molecular de 110 kDa; una característica de este tipo de ATPasas es que la autofosforilación reversible de un residuo de ácido aspártico modifica la afinidad por Ca<sup>2+</sup> permitiendo el movimiento vectorializado de este ion en contra de su gradiente electroquímico mediante grandes cambios conformacionales reversibles (Periasamy and Kalyanasundaram 2007).

Se ha reportado tres distintos genes que codifican SERCA1, 2 y 3, los cuales producen 10 isoformas diferentes debido al “*splicing*” alternativo de sus regiones carboxilo terminal; la expresión de las isoformas de SERCA depende del estadio de desarrollo y del tipo de tejido (Periasamy and Huke 2001; Rahate 2019).

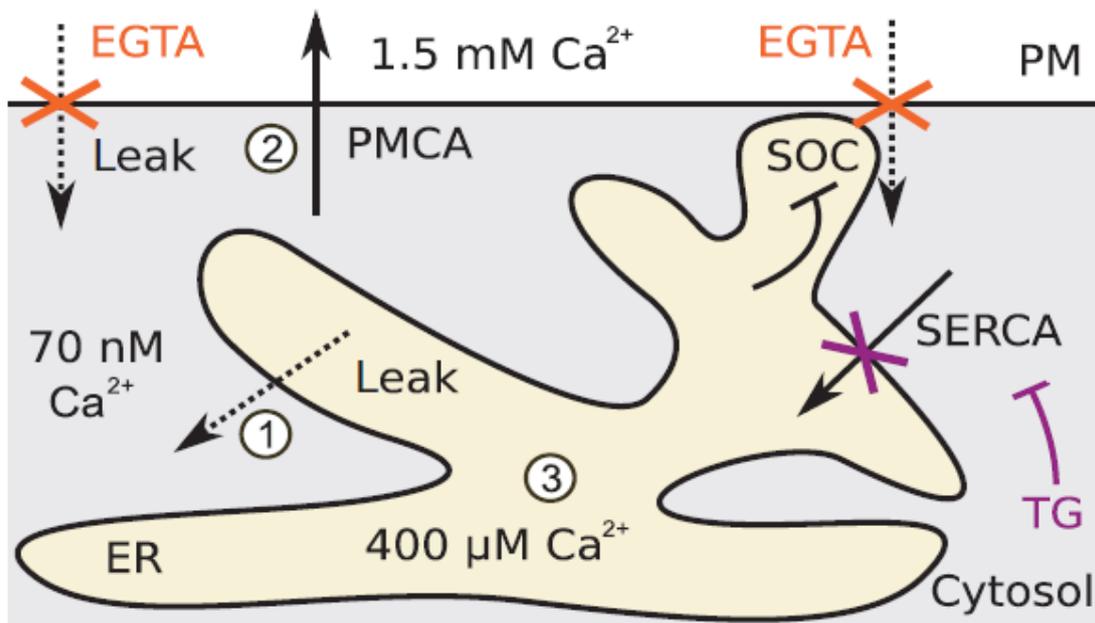
La bomba SERCA presenta 10 hélices transmembrana, tres dominios citoplasmáticos: el dominio A o dominio acoplador; dominio P que presenta el residuo de aspartato 351 cuya autofosforilación permite los cambios de afinidad y conformacionales; y por último un dominio N, de unión a nucleótidos, en este caso el ATP (Carafoli and Brini 2000).

El transporte de Ca<sup>2+</sup> ocurre debido a un cambio en la afinidad de la bomba SERCA de un estado de alta afinidad (E1) a un estado de baja afinidad (E2) por el Ca<sup>2+</sup> citoplásmico. La unión de Ca<sup>2+</sup> del lado citoplasmático de la bomba SERCA facilita la unión del ATP al dominio N seguido de la fosforilación del residuo D351 del dominio P generando un intermediario E1P-2Ca<sup>2+</sup>; este estado intermediario sufre un cambio conformacional pasando al estado E2P-2Ca<sup>2+</sup>, el cual tiene menor afinidad por el Ca<sup>2+</sup> y lo expone al lado luminal del retículo donde es liberado; por último, se desfosforila quedando en el estado E2. La

bomba SERCA transporta 2 iones  $\text{Ca}^{2+}$  al lumen del retículo por cada molécula de ATP hidrolizado y 2 a 3 protones son cotransportados (Toyoshima and Nomura 2002).

### 3.4.- Canales de Fuga

La homeostasis en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE se debe el balance entre la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por la acción de la bomba SERCA y la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales diferentes al RyR y el  $\text{IP}_3\text{R}$ . La naturaleza de los canales de fuga es desconocida; sin embargo se han propuesto diferentes candidatos como la presenilina, el Orai2, Orai3 y el translocón, puesto que hay evidencia que estas proteínas pueden funcionar como canales de fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico (Figura 3.2; (Lomax et al. 2002; Sammels et al. 2010).



**Figura 3.2** Estado estacionario de  $[\text{Ca}^{2+}]$  en el ER. En el estado estacionario participan dos factores importantes para mantener las  $[\text{Ca}^{2+}]$  en el retículo, la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales de fuga y la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  dada por la actividad de la bomba SERCA. Tomado de Meyer 2013.

#### 3.4.1 Presenilina

La presenilina es la subunidad catalítica del complejo  $\gamma$ -secretasa, la cual es una aspartil proteasa intramembranal que se expresa de forma ubicua y su función

es escindir proteínas de membrana tipo 1 de la bicapa lipídica. La presenilina está constituida por 9 hélices transmembrana y transita por endo-proteólisis produciendo dos fragmentos estables, el C- terminal y el N-terminal, que se asocian como un heterodímero. La presenilina se localiza en las membranas del retículo endoplásmico y aparato de Golgi (Brunkan y Goate 2005; Honarnejad y Herms 2012; Selkoe y Wolfe 2007; Supnet y Bezprozvanny 2011).

La sobreexpresión de presenilina induce un incremento en la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  (Brunello et al 2009); mientras que el doble *knockout* de presenilina, en fibroblastos de ratón, muestra una disminución de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  basal y un incremento en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por el  $\text{IP}_3\text{R}$ , debido a que el retículo endoplásmico está sobrecargado con  $\text{Ca}^{2+}$ . Además, la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  revelada por la inhibición de la bomba SERCA está reducida, y estos efectos se eliminan por la expresión de la presenilina silvestre o de presenilina sin actividad de  $\gamma$ -secretasa. Esto sugiere que la función de presenilina como canal de fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  no está relacionada con su actividad de  $\gamma$ -secretasa (Nelson et al. 2007; Tu et al. 2006).

La presenilina también interactúa con los canales de liberación del ER, esto es, con el  $\text{IP}_3\text{R}$  y el RyR; la interacción de presenilina con el  $\text{IP}_3\text{R}$  provoca un incremento en el tiempo promedio de apertura del canal, un aumento en el porcentaje de células que muestran oscilaciones espontáneas de  $\text{Ca}^{2+}$ , incremento de las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  por concentraciones sub-saturantes de  $\text{IP}_3$  y la disminución de la latencia (Cai et al. 2006; K. H. Cheung et al. 2008). La interacción con el RyR induce un aumento en la probabilidad de apertura del canal (Hayrapetyan et al. 2008; Rybalchenko et al. 2008). Estos datos sugieren que la presenilina incrementa la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de dos mecanismos, ya sea directamente como canal de fuga o por aumentar la actividad del  $\text{IP}_3\text{R}$  y del RyR.

Las mutaciones en la presenilina se han asociado con la enfermedad de Alzheimer hereditaria, para presenilina 1 (M146L, L166P, A246E, G384A) y presenilina 2 (N141I), que muestran una disminución de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  e incremento en las oscilaciones espontáneas de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de  $\text{IP}_3\text{R}$ , debido a un aumento en la probabilidad de apertura del canal, además de incrementar la

sensibilidad a  $IP_3$  (Cheung et al. 2010; Cheung et al. 2008). Por otro lado, existen mutaciones en presenilina tipo 1 (M139V, K239E, V261F, A431E) que pierden su función como canal e inducen una sobrecarga de  $Ca^{2+}$  en el ER (Nelson et al. 2010).

### 3.4.2 Canales Orai

Los canales Orai son proteínas de la membrana plasmática que se encuentran en forma de tetrámero o hexámero formando un canal selectivo a  $Ca^{2+}$ ; su función principal, junto con la proteína STIM, es la entrada de  $Ca^{2+}$  en respuesta al agotamiento de  $Ca^{2+}$  del retículo endoplásmico. La familia de canales Orai incluye tres homólogos (Orai1, Orai2 y Orai3) que presentan distintas propiedades electrofisiológicas (Gwack et al. 2007; Jairaman and Prakriya 2013; Muik et al. 2012). Orai1 y Orai2 se ubican en compartimentos vesiculares, como son los gránulos secretores (Dickson et al. 2012; Ikeya et al. 2014); así como Orai2 y Orai3 que se localizan en el retículo endoplásmico (Leon-Aparicio et al. 2017a; Varadarajan et al. 2013).

El *knockdown* de Orai2, en células HEK 293T, induce un incremento de la  $[Ca^{2+}]_{RE}$ . Por otro lado, la sobreexpresión de Orai2 resulta en la disminución de la  $[Ca^{2+}]_{RE}$  junto con la elevación sostenida de la  $[Ca^{2+}]_i$ ; (Bandara et al. 2013), mientras que Orai3 reduce la  $[Ca^{2+}]_{RE}$  en respuesta al 2-APB (un activador del canal Orai3) puesto que la reducción en la expresión de Orai3 redujo la fuga de  $Ca^{2+}$  provocada por 2-APB. El vaciamiento parcial del RE, por reducir el  $Ca^{2+}$  externo, reduce la fuga de  $Ca^{2+}$  por 2-APB, sugiriendo que Orai3 funciona como un mecanismo de seguridad para evitar la sobrecarga de  $Ca^{2+}$  en el RE (Leon-Aparicio et al. 2017a; Leon-Aparicio et al. 2017b).

### 3.4.3 TRPM8

El TRPM8 es un canal catiónico permeable al  $Ca^{2+}$  presente en la membrana plasmática y que pertenece a la familia de los canales TRP. El TRPM8 es un sensor fisiológico de bajas temperaturas ambientales, se activa por temperaturas menores a 26 °C o con sustancias como el mentol y la icilina (McKemy 2005;

Yudin and Rohacs 2012). Se ha reportado que TRPM8 también se ubica en membranas intracelulares, como es el retículo endoplásmico ( Bidaux et al. 2005; Zhang et al. 2004).

TRPM8 participa en la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE. En neuronas se observó que bajas temperaturas causan transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo que no involucran al  $\text{IP}_3\text{R}$  o al  $\text{RyR}$  (Yamamoto et al. 2016). Además, el cultivo primario de células de próstata (normales o cancerígenas) y líneas celulares de cáncer de próstata (PC3 y LNCaP) mostraron un incremento transitorio de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  junto con la reducción de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  en respuesta a los agonistas de TRPM8, mentol e icilina. Por otro lado, el *knock down* de TRPM8 previene cualquier efecto en la dinámica de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por icilina y mentol (Gabriel Bidaux et al. 2007; Thebault et al. 2005)

#### 3.4.4 TRPV1

TRPV1 forma un complejo tetramérico en la membrana plasmática que funciona como canal catiónico permeable al  $\text{Ca}^{2+}$  que pertenece a la familia de canales TRP. Al igual que TRPM8, TRPV1 es un sensor fisiológico de temperatura ambiental pero que se activa a temperaturas mayores de  $43^\circ \text{C}$ ; además se activa por protones, la capsaicina y otros compuestos vaniloides. También, participa en la percepción del dolor periférico y en la termorregulación (Gavva et al. 2007; Liao et al. 2013; Tominaga and Tominaga 2005). El canal TRPV1 también se localiza en la membrana del RE (Gallego-Sandín et al. 2009; Liu et al. 2003; Olah et al. 2001).

El canal TRPV1 puede funcionar como canal de fuga a temperatura ambiente, ya que la capsazepina, un antagonista del TRPV1, reduce la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  revelada por la inhibición de la bomba SERCA (Lotteau et al. 2013). Además, líneas celulares (HEK 293T, COS-7 y Sf9) transfectadas con TRPV1 mostraron un incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  junto con la reducción de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  en respuesta a los activadores del canal como la capsaicina y la resiniferatoxina. El vaciamiento previo del  $\text{Ca}^{2+}$  reticular (por inhibir la bomba SERCA o activar al  $\text{RIP}_3$ ) inhibe el efecto de los agonistas de TRPV1 (Gallego-Sandín et al. 2009; Kárai et al. 2004; Marshall et al. 2003; Wisnoskey et al. 2003).

Por otro lado, tanto en neuronas como en musculo esquelético, que expresan TRPV1 de forma endógena, se observa un transitorio de la  $[Ca^{2+}]_i$  en ausencia de  $Ca^{2+}$  externo en respuesta a los agonistas de TRPV1, capsaicina, resiniferatoxina y temperatura de 45 °C y que se evita al vaciar previamente al RE con Tg o al inhibir al TRVP1 con capsazepina (Kárai et al. 2004; Liu et al. 2003; Lotteau et al. 2013; Olah et al. 2001).

Además, se ha reportado que RyR participa en la salida de  $Ca^{2+}$  inducida por los agonistas de TRPV1, ya que la presencia de inhibidores de RyR, como son el rojo de rutenio o el dantroleno, disminuye el transitorio de  $Ca^{2+}$  en musculo esquelético y en neuronas se eliminó por completo el transitorio de  $Ca^{2+}$  inducido por los agonistas de TRPV1 (Eun et al. 2001; Lotteau et al. 2013).

### **3.5.- Translocón**

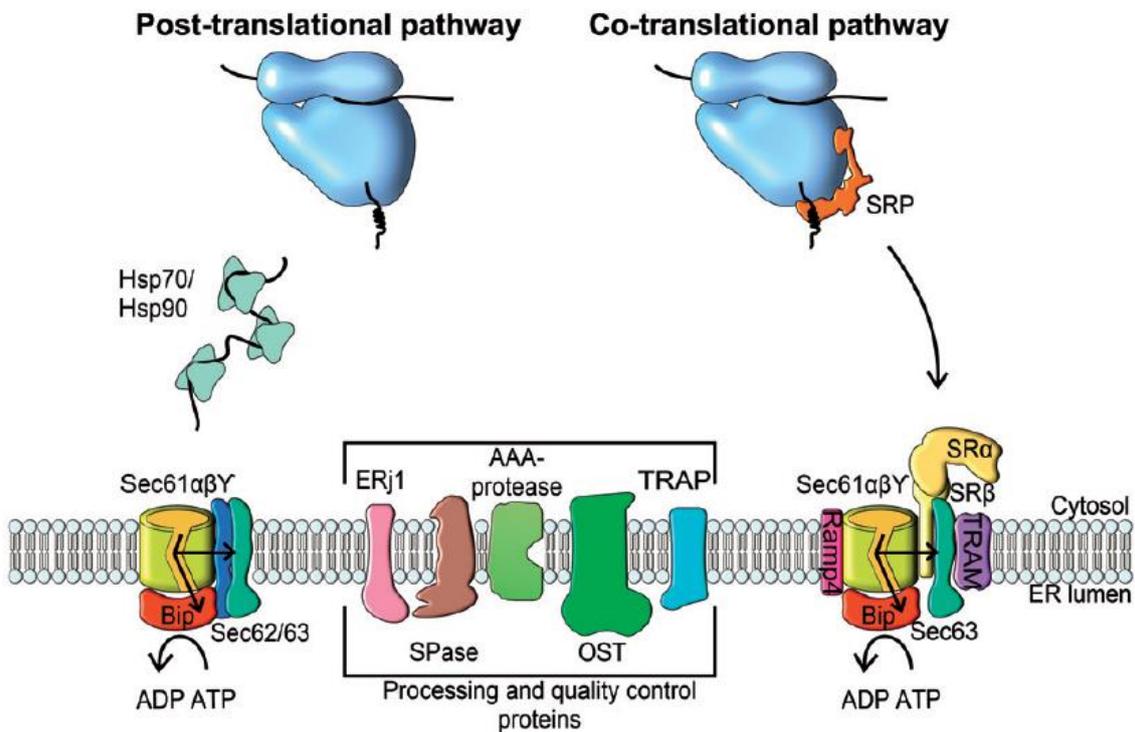
En 1986 Walter y Lingappa acuñaron el nombre de translocón para identificar el complejo transmembranal del RE que permite que las proteínas de secreción sean translocadas al lumen del retículo o la inserción en membrana de las proteínas integrales de membrana (Walter and Lingappa 1986). Por medio de experimentos de entrecruzamiento inducido por luz, se identificaron las proteínas que son los componentes básicos del translocón, entre las que se encuentran TRAM y el complejo Sec61, el cual está formado por tres proteínas, Sec61 $\alpha$ , Sec61 $\beta$  y Sec61 $\gamma$ . Un solo complejo de Sec61 es capaz de formar el poro acuoso y translocar a las proteínas nacientes al lumen del retículo (Johnson and Waes 1999).

#### **3.5.1 Proteínas asociadas al translocón**

Hay varias proteínas que se asocian y ayudan al translocón durante el proceso de translocación de proteínas (Denks et al. 2014; Gemmer and Förster 2020; Pfeffer et al. 2016; Walter and Lingappa 1986), entre las que se encuentran las siguientes (Figura 3.3):

**Partícula de reconocimiento del péptido señal (SRP):** es un complejo ribonucleoproteico citoplasmático, conformado por 6 proteínas y el RNA 7S; funciona como adaptador entre la maquinaria de la síntesis proteica en el citoplasma y la maquinaria de translocación de proteínas en el RE.

**Receptor de SRP:** es un heterodímero de GTPasas, SRa y SRb, que se ubica en la membrana del RE e interacciona con Sec61 $\beta$ . Además, participa en el reclutamiento del complejo ribosoma-cadena naciente-SRP a la membrana del RE.



**Figura 3.3** Proteínas asociadas con el Translocón. Existen dos vías de translocación de proteínas; el translocón se asocia con diversas proteínas accesorias, dependiendo de la vía de translocación, éstas están involucradas en el procesamiento y control de calidad de las proteínas translocadas. Tomado de Denks K. 2014.

**Peptidasa del péptido señal (SP):** es un complejo hetero-tetramérico presente en el RE que se encarga de escindir la secuencia señal de la proteína naciente y es capaz de distinguir el péptido señal de los segmentos transmembrana.

**Complejo Sec62/Sec63:** son proteínas integrales de la membrana del RE involucradas en la translocación postraduccional de proteínas. Sec63 pertenece a la familia de chaperonas Hsp40 y tiene un dominio J para reclutar a la proteína BiP.

**BiP:** es una chaperona luminal de la familia Hsp70, la cual interacciona con Sec61 $\alpha$  y Sec63. BiP tiene varias funciones en la translocación de proteínas, entre las que se encuentran la de bloquear el poro del complejo Sec61 del lado luminal y sirve como trinquete molecular para el transporte de proteínas.

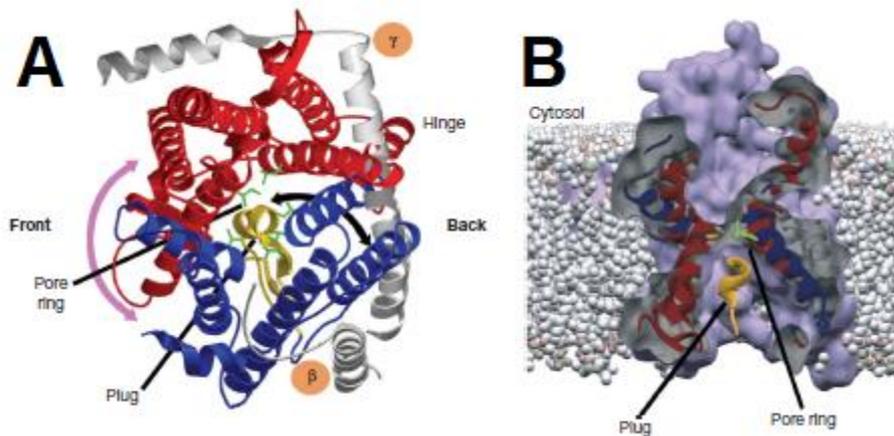
**TRAM:** es una glicoproteína de la membrana del RE y se ha sugerido que actúa como una chaperona durante la integración a la bicapa lipídica de las proteínas con segmentos transmembranales.

**OST:** es un complejo hetero-oligomérico presente en la membrana del RE, el cual se une al complejo ribosoma-Sec61 y es responsable de la glicosilación en residuos de asparagina (N-glicosilación).

### 3.5.2 Estructura

El complejo Sec61 es un hetero-trímero que en estado cerrado tiene un diámetro de 9-15 Å y en estado abierto puede llegar a medir de 40 a 60 Å; las subunidades que lo forman son las siguientes:

Sec61 $\alpha$  es la subunidad formadora del poro, la cual tiene forma de reloj de arena que consiste en dos embudos, uno que abre hacia la cara citosólica y otro hacia la cara luminal, que están separados por una constricción central. La subunidad alfa está constituida por 10 segmentos transmembrana arreglados en dos mitades, una N-terminal y una C-terminal, y presenta una puerta lateral formada por la interfaz entre los dominios TM2b-3 y TM7-8. Además, para mantener la barrera de permeabilidad en estado basal, es decir en un estado de no translocación, Sec61 $\alpha$  cuenta con un tapón intraproteico formado por el segmento TM2a que es estabilizado por el anillo del poro, el cual está constituido por 6 aminoácidos hidrofóbicos que proyectan sus cadenas laterales al interior del poro ocasionando la constricción central del canal. (Figura 3.4; Denks et al.



**Figura 3.4** Estructura del complejo Sec61. En A se muestra una vista del lado citosólico, en gris las subunidades Sec61 $\beta$  y Sec61 $\gamma$  que solo presentan un pase transmembrana, mientras que las dos mitades de Sec61 $\alpha$  están de color azul y rojo (TM1-5 y TM6-10, respectivamente), el anillo del poro se encuentra en verde y el tapón intraproteico es amarillo; en B se muestra una vista lateral de Sec61 $\alpha$  mostrando una forma de reloj de arena. Tomado de Rapoport T. 2007.

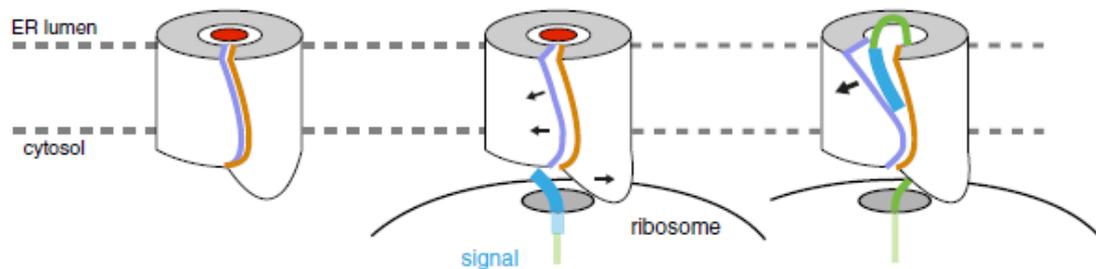
2014; Gemmer y Förster 2020; Pfeffer et al. 2015, 2016; Rapoport 2007; Voorhees et al. 2014; Voorhees y Hegde 2016b).

Sec61 $\gamma$  es una proteína de un solo segmento transmembrana, la cual no participar en la formación del poro, y es esencial para la interacción del ribosoma con el translocón. Mientras que Sec61 $\beta$ , la cual también cuenta con un solo segmento transmembrana, no es esencial para la translocación de proteínas a pesar de interactuar con SRP y su receptor; además se considera de alta movilidad, ya que no se ha podido cristalizar junto con el complejo Sec61 (Denks et al. 2014; Gemmer y Förster 2020; T. A. Rapoport 2007; Voorhees et al. 2014).

### 3.5.3 Translocación Cotraduccional

La translocación cotraduccional inicia cuando el péptido señal, que es una secuencia de 15-20 aminoácidos en el extremo N-terminal, emerge del ribosoma y es reconocida por la proteína SRP, ocasionando la detención de la elongación de la síntesis de la proteína. El complejo SRP-cadena nascente-ribosoma es reclutado a la membrana del retículo endoplásmico por el receptor de SRP, el cual se ubica únicamente en el RE rugoso, y favorece la interacción del ribosoma y el complejo Sec61; además, promueve la transferencia de la cadena nascente al translocón. Por otro lado, la proteína BiP se disocia del complejo Sec61

durante la translocación de la proteína, solo cuando la proteína alcanza una longitud de 70 aminoácidos; ya que BiP funciona como un mecanismo de seguridad (Denks et al. 2014; Haßdenteufel et al. 2014; Johnson y Waes 1999).



**Figura 3.5** Modelo de la apertura del complejo Sec61 durante el proceso de translocación cotraduccional. De izquierda a derecha, el translocón en estado basal se encuentra cerrado la puerta lateral (líneas azul y naranja) y el poro se encuentra ocupado por el tapón (círculo rojo); al unirse el ribosoma con las asas L6/7 y L8/9 citosólicas de Sec61 induce la apertura de la puerta lateral y se intercala el péptido señal (rectángulo azul) provocando el desplazamiento del tapón. Tomado de Voorhees R. 2016.

La apertura del poro del translocón inicia con la unión del ribosoma; esta interacción involucra al ARNr 28s y las proteínas ribosomales uL23, eL19 y eL39 con el N-terminal de Sec61 $\gamma$  y las asas citosólicas L6/7 y L8/9 de Sec61 $\alpha$ , provocando cambios conformacionales de Sec61 $\alpha$  induciendo la apertura de la puerta lateral en la cara citosólica. Por otro lado, el péptido señal se intercala con los dominios transmembrana que forman la puerta lateral y desplaza la TM2b provocando el ensanchamiento de la constricción central del canal y la subsecuente desestabilización del tapón intraproteico, por lo que el tapón se desplaza hacia la periferia del canal permitiendo el paso de la cadena nascente a través de la luz del poro; al terminar la translocación de la proteína, el tapón intraproteico regresa a su posición basal y el péptido señal se escinde por la peptidasa del péptido señal (Figura 3.5, Rapoport 2007; Voorhees et al. 2014; Voorhees and Hegde 2016b, 2016a).

### 3.5.4 Translocación Postraduccional

La translocación postraduccional es la vía utilizada por proteínas pequeñas (100 a 160 residuos) que tienen un péptido señal con hidrofobicidad moderada y son reconocidas por Sec62. La translocación inicia cuando el dímero Sec62/Sec63 reclutan a las chaperonas citosólicas, Hsp70 y Hsp40, y favorece su acoplamiento con Sec61 $\alpha$ ; por otro lado, el dominio FN3 de Sec63, ubicado en el extremo citosólico C-terminal, interacciona con el asa citosólica L6/7 de Sec61 $\alpha$ , la misma asa donde interacciona con el ribosoma, e induce la apertura de la puerta lateral y el desplazamiento del tapón intraproteico para permitir el paso de la proteína. La translocación ocurre por un mecanismo de trinquete, en el cual BiP se une a la proteína evitando que retroceda hacia el citosol; esto se debe a que BiP unido al ATP se encuentra en estado abierto y su cierre alrededor de la proteína translocada ocurre ante la hidrólisis de ATP, que es debido a su interacción con el dominio J de Sec63 (Denks et al. 2014; Itskanov y Park 2019; Johnson y Waes 1999; Rapoport 2007).

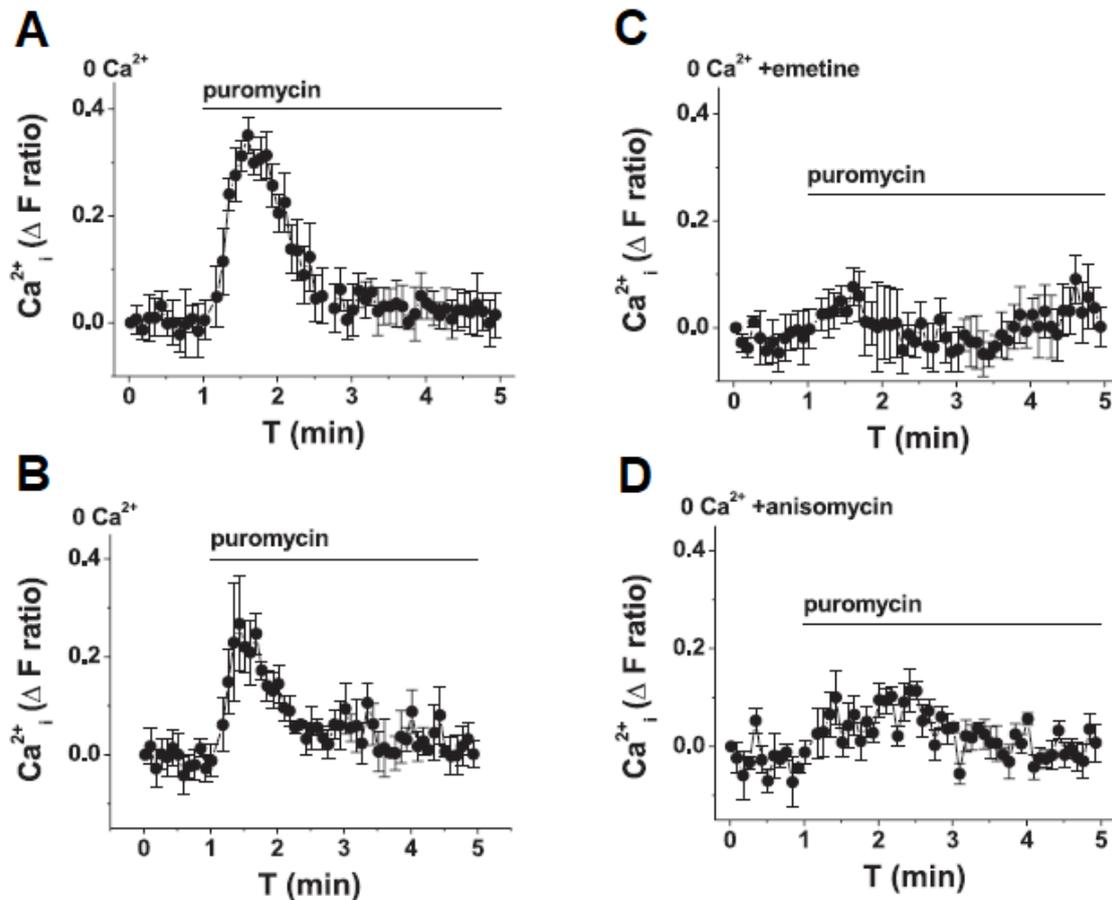
### 3.5.5 Retrotanslocación

La retrotanslocación es el proceso en el cual las proteínas mal plegadas o complejos proteicos mal ensamblados en el lumen del retículo endoplásmico son translocados al citosol para ser degradadas por el proteosoma 26S. La retrotanslocación comienza cuando las proteínas mal plegadas son reconocidas por diversas chaperonas luminales, entre las que se encuentran la calnexina y PD1, formando un complejo que es reclutado hacia Sec61 para su translocación y su posterior ubiquitinación y degradación. Durante la retrotanslocación, de acuerdo con el sustrato a translocar, el complejo Sec61 se asocia con diversas proteínas, entre las que se encuentran: Hrd1 que es una E3 ubiquitin ligasa, cofactores de Hrd1 como son Hrd3 y Der1, p97 que es una ATPasa citosólica y la partícula reguladora proteosomal 19S. Se ha sugerido que la partícula reguladora proteosomal19S interacciona con el asa L6/7 de Sec61 $\alpha$ , la cual es una de las asas con la que interacciona el ribosoma para inducir la apertura de la puerta lateral de Sec61 $\alpha$  (Hampton y Sommer 2012; Meusser et al. 2005; Römisch 2016; B. Tsai y Rapoport 2002).

### 3.5.6 El translocón como canal de fuga de $\text{Ca}^{2+}$

El complejo Sec61, además de su función principal en la translocación de proteínas, tiene actividad de fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE, que se puede entender como un efecto colateral de la actividad de translocación de proteínas debido a que el poro no se cierra inmediatamente después de pasar la cadena peptídica. El tamaño del poro es lo suficientemente grande que permite el paso de  $\text{Ca}^{2+}$  y también la entrada al lumen del RE de la sacarosa, el citrato, la 4-metilumbeliferil  $\alpha$ -D-glucopiranosido y el ácido UDP-glucurónico estimuladas por puromicina, un antibiótico análogo al tRNA que inhibe la elongación de la cadena naciente e induce su liberación de forma prematura, pero que deja el ribosoma unido a Sec61 $\alpha$  y por lo tanto el poro abierto del canal (Heritage y Wonderlin 2001; Lizák et al. 2006, 2008).

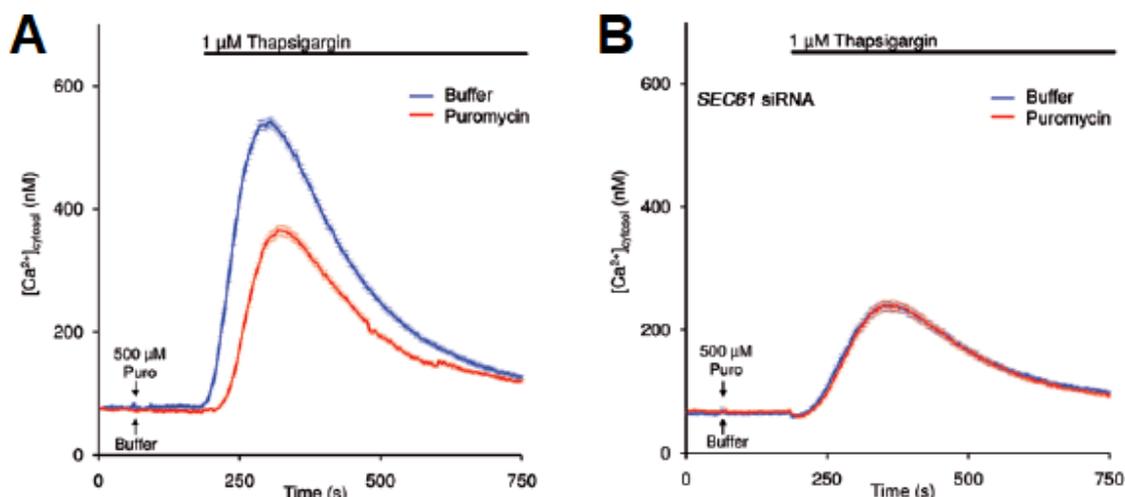
Por otro lado, se ha reportado que la puromicina acelera la salida de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  de microsomas de retículo endoplásmico rugoso de hígado (Giunti et al. 2007). Este efecto es generalizado, se ha reportado que la aplicación de puromicina, en células LNCaP y células acinares pancreáticas, induce el vaciamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE, sin la participación de los canales de liberación. Este efecto se inhibe con anisomicina, un inhibidor de la elongación de la síntesis de proteínas, debido a que inhibe la actividad de la peptidil transferasa, que deja a la cadena naciente en la luz del poro del translocón funcionando como un tapón (Van Coppenolle 2004; Flourakis et al. 2006; Lomax et al. 2002). La puromicina provoca un incremento transitorio de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en células humanas de músculo liso vascular, el cual es eliminado por la presencia de inhibidores de la elongación de la síntesis de proteínas, como son la anisomicina y la emetina (Figura 3.6; Amer et al. 2009). En conjunto estos datos sugieren que el translocón puede participar como canal de fuga de  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Figura 3.6** El translocón funciona como un canal de  $Ca^{2+}$  del RE. En células de músculo liso vascular sin  $Ca^{2+}$  externo, se observa en A y B que la presencia de puromicina ocasiona un transitorio de  $Ca^{2+}$  citosólico, mientras que en C y D la presencia de emetina o anisomicina elimina el transitorio de  $Ca^{2+}$  inducido por puromicina. Tomado de Amer 2009.

El estado estacionario del  $Ca^{2+}$  en el RE se puede observar al aplicar inhibidores de la bomba SERCA como la tapsigargina o el ácido ciclopiazónico, lo que revela la fuga de  $Ca^{2+}$  del RE, provocando un incremento transitorio de la  $[Ca^{2+}]_i$  y la correspondiente reducción de la  $[Ca^{2+}]_{RE}$ , aunque estos cambios son de menor amplitud a la observada en respuesta a los agonistas del  $IP_3R$  o  $RyR$ , además que la naturaleza molecular del canal implicado sigue sin resolverse. Uno de los canales propuesto es el complejo Sec61, ya que la presencia de inhibidores de la elongación de la síntesis de proteínas sean puromicina, anisomicina o emetina, reduce el efecto de Tg en el transitorio de  $Ca^{2+}$  citosólico y vaciamiento de  $Ca^{2+}$  del RE, que ha sido reportado en las líneas celulares LNCaP y HSG (Van Coppenolle 2004; Flourakis et al. 2006; Hammadi et al. 2013; Ong et al. 2007). Además, en las células HeLa el silenciamiento de Sec61 $\alpha$  disminuye el incremento transitorio de la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por la Tg y también inhibe el efecto de la puromicina en la respuesta a la Tg, indicando que el translocón es uno de

los canales involucrados en la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$ , aunque no parece que sea el único canal que participa en la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  provocada por la Tg (Figura 3.7, Lang et al. 2011).



de  $\text{Ca}^{2+}$  externo se observa en A que la presencia de puromicina reduce el transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico inducido por Tg, mientras que en B el silenciamiento de  $\text{Sec61}\alpha$  reduce el efecto de Tg e inhibe el efecto de puromicina de reducir el transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Tomado de Lang S. 2011.

Por otro lado, en las células LNCaP y HSG la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por Tg o puromicina induce la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  operada por el depósito, llamado SOCE por sus siglas en inglés; además la presencia de emetina o anisomicina previene la SOCE inducida por Tg o puromicina (Flourakis et al. 2006; Ong et al. 2007).

### 3.5.7 Mecanismos que regulan la fuga de $\text{Ca}^{2+}$

La fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del translocón está limitada por diferentes mecanismos, entre los que se encuentran proteínas accesorias, la proteína naciente y la propia estructura de  $\text{Sec61}\alpha$  (tapón intraproteico).

**Cadena naciente:** La permeabilidad del translocón está acoplada con la translocación de proteínas, ya que durante la translocación de la proteína la cadena naciente bloquea el poro del translocón; el uso de puromicina, la cual promueve la liberación prematura de la cadena naciente y evita que bloquee la luz del poro del translocón, favorece el movimiento de pequeñas moléculas y la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$ ; por el contrario, el uso de inhibidores de la elongación de la síntesis de proteínas, como la emetina, la anisomicina y la cicloheximida, que promueven

que la cadena nascente ocupe el poro del translocón, resulta en el bloqueo del movimiento de pequeñas moléculas y la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  estimulada por puromicina (Amer et al. 2009; Roy and Wonderlin 2003).

**Tapón intraproteico:** es una hélice corta conformada por el segmento transmembrana 2a de  $\text{Sec61}\alpha$ , que se localiza en el centro del poro del translocón y es requerido para mantener al translocón en estado cerrado y evitar el movimiento de pequeñas moléculas y iones a través del translocón. La eliminación de la TM2a ocasiona la creación de un nuevo tapón, el cual pierde numerosas interacciones con la puerta lateral y el anillo del poro, pero se mantiene la translocación de proteínas, aunque permite el paso de proteínas con defectos o pérdida del péptido señal, indicando que el tapón es importante para mantener la barrera de permeabilidad del translocón (Li et al. 2007; Rapoport 2007).

**BiP:** es una chaperona del lumen del retículo endoplásmico e interacciona con el asa 7 de  $\text{Sec61}\alpha$ , siendo el residuo Y344 importante en dicha interacción. El silenciamiento de BiP provoca el incremento en la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$ , ya que se observó el aumento en el transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por Tg, prevenido al silenciar  $\text{Sec61}\alpha$ ; del mismo modo, se ha reportado una mayor fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  al utilizar fármacos que inducen el secuestro de BiP por proteínas mal plegadas, como DTT y tunicamicina. Por otro lado, las co-chaperonas de BiP, específicamente ERj3 y ERj6, tienen un papel importante puesto que su silenciamiento promueve la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por Tg, la cual depende de BiP y de  $\text{Sec61}\alpha$ , indicando que la disponibilidad de BiP es un mecanismo para regular la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  a través el translocón (Schäuble et al. 2012; Schorr et al. 2015).

**Calmodulina (CaM):** El extremo N-terminal citosólico de la proteína  $\text{Sec61}\alpha$  cuenta con un el motivo IQ, el cual se caracteriza por ser un sitio de unión al complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM y la unión del complejo provoca el cierre del translocón. De igual forma, el uso de antagonistas de CaM, como son la ophiobalina A y la trifluoperazina, causan un incremento en el transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por Tg que se previene al silenciar  $\text{Sec61}\alpha$ ; es decir, el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM contribuye

a reducir y regular la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del translocón (Erdmann et al 2011; Lang et al. 2011a).

**Sec62:** forma un complejo con Sec63 y se asocian con el translocón durante la translocación postraducciona de proteínas. Por otro lado, el silenciamiento de Sec62 induce un incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  basal y en el transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por Tg, indicando una mayor fuga de  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que el silenciamiento simultáneo de Sec62 y Sec61 evita el incremento de la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  observada cuando se silencia únicamente Sec62; lo anterior muestra que Sec62 es un mecanismo de regulación de la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por el translocón (Greiner et al. 2011; Linxweiler et al. 2013).

### 3.5.8 Proteínas fosforiladas

Diferentes estudios de fosfoproteómica depositados en el repositorio electrónico conocido como Phosphosite plus reportan que las proteínas que forman o regulan el translocón se encuentran fosforiladas en estado basal. Así podemos hallar reportes de sitios de fosforilación para las proteínas Sec61 $\alpha$ , Sec61 $\beta$ , Sec61 $\gamma$ , TRAM, Sec62 y Sec63 (Tabla 3.1; Huang et al. 2016; Mertins et al. 2013; Tsai et al. 2015; Zhou et al. 2013). La cinasa involucrada en la fosforilación de Sec61 $\beta$  y TRAM es alguna isoforma de PKC dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que CK2 fosforila a Sec63 (Ampofo et al. 2013; Gruss et al. 1999). Por otro lado, se ha reportado que los residuos T407 y S408 de Sec61 $\alpha$  se encuentran fosforilados en condiciones basales. Estos residuos se encuentran en el asa citosólica L8/9 que interactúa con el ribosoma durante la translocación cotraducciona; sin embargo, se desconoce la cinasa involucrada (Voorhees et al. 2014; Zhou et al. 2013).

Proteína	Residuos
<b>Sec61<math>\alpha</math></b>	T105, T407, <b>S408</b> , Y272, Y276
<b>Sec61<math>\beta</math></b>	T5, S7, S13, S14, <b>S17</b> , S19, S49
<b>Sec61<math>\gamma</math></b>	S18
<b>TRAM</b>	S327, T339, T350, <b>S365</b>
<b>Sec62</b>	T158, S335, S356, <b>T375</b>
<b>Sec63</b>	<b>T537</b> , S570, S593, S597, S748

**Tabla 3.1** Proteínas del translocón fosforiladas. Sec61 $\alpha$ , Sec61 $\beta$ , sec61 $\gamma$ , TRAM, Sec62 y Sec63 se encuentran fosforiladas en condiciones basales; en negritas se marca el residuo que se ha reportado fosforilado con mayor frecuencia.

La función que ejerce la fosforilación de las proteínas que forman y regulan el translocón no se ha dilucidado; además, desconocemos la naturaleza de las cinasas involucradas en la fosforilación de los residuos reportados.

### 3.6.- Estaurosporina, un inhibidor generalizado de cinasas

La estaurosporina (Sts) es un inhibidor generalizado de cinasas, tanto de serina/treonina como de tirosina, que interacciona con el sitio de unión al ATP, y que esto explica su inespecificidad. Entre las cinasas que inhibe la Sts se encuentran: PKC, MLCK, PKA, S6K, CaMKII, PDK1, Src, Lyn, y Fgr, entre otras (Hill et al. 2001; Meggio et al. 1995; Omura et al. 1995).

#### 3.6.1 La cinasa C de proteínas o PKC

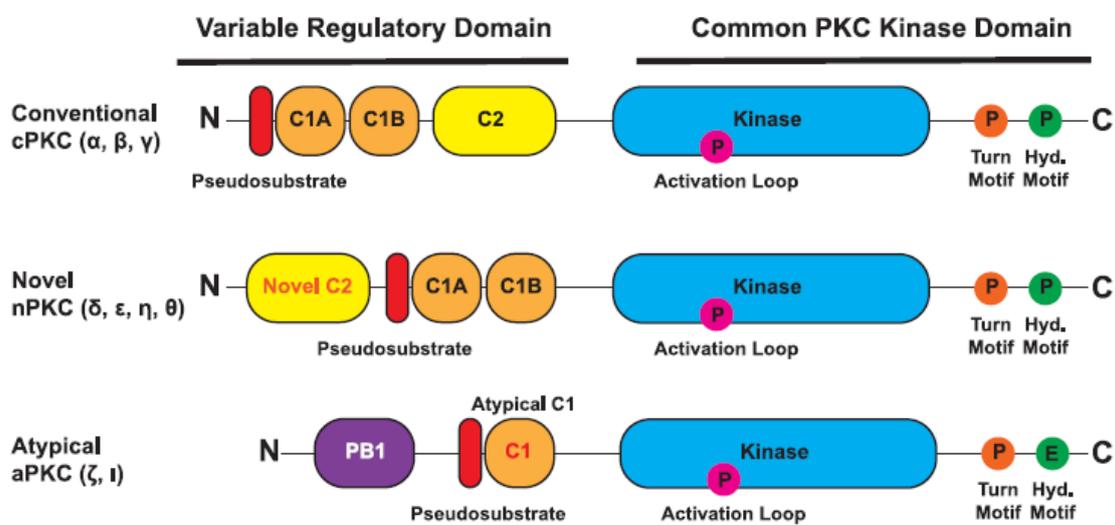
La cinasa C de proteínas (PKC) es una familia de enzimas que fosforila residuos de serina o treonina y está conformada por diez isoenzimas, clasificadas en 3 subfamilias, según los segundos mensajeros que regulan su actividad. Estas subfamilias son las siguientes (Antal et al. 2015; Coronado-Parra et. al. 2013; Newton 2018):

**PKC clásicas o convencionales** (cPKC:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ): presentan dominio C1 en tándem que une al DAG y el dominio C2 que permite la unión de Ca<sup>2+</sup> y

fosfolípidos ácidos, como la fosfatidilserina. Este dominio permite la unión de la cinasa a la membrana plasmática en respuesta a un incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$ .

**PKC nuevas** (nPKC:  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\nu$ ,  $\eta$  y  $\theta$ ): al igual que las cPKC, presenta un dominio C1 en tándem donde se unen el DAG y fosfatidilserina y un dominio C2 nuevo que no responde a  $Ca^{2+}$ .

**PKC atípicas** (aPKC:  $\iota$  y  $\zeta$ ): presenta un dominio C1 atípico que no une el DAG y carecen del dominio C2, pero sí presentan un dominio PB1 que permite la interacción entre la cinasa y otras proteínas.



**Figura 3.8** Estructura y clasificación de las PKCs. Las cinasas PKC se clasifican en convencionales, nuevas y atípicas, las cuales presentan una estructura similar, un dominio regulatorio en el extremo N-terminal y un dominio cinasa en el C-terminal. El dominio regulatorio presenta la región llamada pseudo-sustrato, el motivo C1 en tándem para unir DAG, además de un dominio C2 para unir  $Ca^{2+}$  en las cPKC, mientras que las nPKC presentan un motivo C2 nuevo y las aPKC carecen de él. En el dominio cinasa están presentes el asa de activación, el motivo de giro y el motivo hidrofóbico, los cuales contienen residuos de aminoácidos que se requiere su fosforilación para lograr la maduración de PKC. Tomado de Tovell 2021

La maduración de las PKC involucra una serie de fosforilaciones que inicia con la fosforilación por mTORC2 tanto en el motivo de interacción con TOR y con el motivo de giro, seguida por la fosforilación por PDK1 del asa de activación y finaliza con la autofosforilación en el motivo hidrofóbico. Además, la PKC madura, aunque activa, está constitutivamente inhibida por la unión de la región pseudo-sustrato al sitio activo. La interacción con segundos mensajeros, como DAG y  $Ca^{2+}$ , induce la liberación del pseudo-sustrato y la subsecuente activación de PKC (Baffi et al. 2021; Newton 2018).

La activación prolongada de PKC resulta en la reducción de la cantidad de esta cinasa, porque la PKC unida a la membrana incrementa su susceptibilidad a la desfosforilación, siendo el motivo hidrofóbico el primero en ser desfosforilado por la fosfatasa PHLPP, seguido por la desfosforilación del asa de activación y el motivo de giro por la fosfatasa PP2A, lo que resulta en la degradación de PKC por el proteosoma (Newton 2018; Tovell and Newton 2021). Este fenómeno de degradación inducida por la activación sostenida de la PKC se conoce como “*dowregulation*” y se utiliza como una estrategia para verificar la participación de la PKC en procesos celulares fisiológicos.

### 3.6.2 La cinasa B de proteínas o Akt

La cinasa B de proteínas (comúnmente conocida como Akt) pertenece a la familia de cinasas de serina y treonina y presenta tres isoformas (Akt 1-3), que están conformadas por un dominio PH en el extremo N-terminal, seguido del dominio cinasa y un motivo hidrofóbico en el C-terminal. La activación de Akt responde a la activación de los receptores de membrana con actividad de cinasas de tirosina, como los receptores para factores de crecimiento. Estos receptores promueven la fosforilación del dominio de cinasa por PDK1 y el motivo hidrofóbico por mTORC2. La Akt presenta una gran variedad de sustratos entre los que se encuentran los siguientes (Hanada et al. 2004; Lawlor and Alessi 2001; Yudushkin 2020):

**TSC2:** es una GAP (proteína activadora de GTP-asa) que forma un complejo con TSC1. La fosforilación de TSC2 por Akt disocia este complejo induciendo la activación del complejo mTORC1 y la subsecuente síntesis de proteínas.

**AS160:** es una GAP de la GTPasa Rab. La AS160 se expresa en las vesículas de Glut 4 (transportador de glucosa). La fosforilación de AS160 inactiva su acción de GAP por lo que Rab permanece más tiempo activa y se promueve la translocación de Glut4 a la membrana plasmática con la subsecuente incorporación de glucosa.

**GSK3:** es una cinasa que inhibe la actividad de la sintasa de glucógeno. La fosforilación de GSK3 inactiva a esta cinasa y resulta en la activación de la sintasa de glucógeno y por ende la síntesis de glucógeno.

**FoxO:** es un factor de transcripción que controla la expresión de genes tanto gluconeogénicos como lipogénicos. La fosforilación de FoxO previene su translocación al núcleo y por lo mismo se reduce la actividad transcripcional de sus genes blanco.

**Bax, Bad y caspasa 9:** son proteínas con actividad pro-apoptótica y su fosforilación por Akt inhibe su actividad y por lo tanto se promueve la supervivencia celular.

Aunque la Sts no inhibe directamente a la Akt, si afecta su activación al inhibir la acción de la PDK1, que es la cinasa que al fosforilar a la T308 resulta en la activación de la Akt (Hill et al. 2001).

### 3.6.3 Sts induce movimiento de cationes

La Sts tiene efectos agudos y crónicos en la fisiología celular. Uno de los efectos agudos de la Sts es promover el movimiento de iones a través de las membranas celulares. La aplicación de la Sts provoca una fuerte reducción en los niveles de  $K^+$  citosólicos, debido a que incrementa la amplitud de las corrientes de  $K^+$  a través de canales sensibles a  $TEA^+$  y a 4-aminopiridina; la Sts también activa canales catiónicos permeables al  $Ca^{2+}$  sensibles al ácido flufenámico (Benítez-Rangel et al. 2011; Wang et al. 2008).

Adicionalmente, la Sts moviliza el ion  $Ca^{2+}$  de los depósitos intracelulares puesto que produce un incremento transitorio de la  $[Ca^{2+}]_i$  en ausencia de  $Ca^{2+}$  externo. Se ha sugerido que la Sts puede liberar  $Ca^{2+}$  de gránulos secretorios en células acinares (Himpens et al. 1993; Kim et al. 2002; Wong y Kwan 1992).

### **3.6.4 Sts induce apoptosis**

Desde que se describió su acción inhibitoria en la actividad de la PKC, también se reportó un efecto citotóxico de la Sts después de la incubación prolongada con este inhibidor (Tamaoki et al. 1986), y hoy en día se conoce que es un buen inductor de apoptosis. Uno de los eventos iniciales inducidos por la Sts es la reducción de los niveles de  $K^+$  del citoplasma, que está asociado con la disminución del volumen celular en el proceso apoptótico, y el incremento de las concentraciones de  $Ca^{2+}$  citosólico que pueden activar a diversas endonucleasas, proteasas y caspasas (Angosto et al. 2003; Benítez-Rangel et al. 2011; Himpens et al. 1993; Rizzuto et al. 2003). Por otro lado, la Sts altera la permeabilidad de la membrana mitocondrial favoreciendo la liberación del citocromo C, iniciando la vía intrínseca de la apoptosis (Tafari et al. 2001); además, la Sts induce la activación de caspasas iniciadoras, caspasa 8 y 9; y de la caspasas efectora 3 (Nicolier et al. 2009; Tang et al. 2000).

La preincubación con inhibidores de canales de  $K^+$ , como el  $TEA^+$  y la 4-aminopiridina, junto con el ácido flufenámico, un inhibidor inespecífico de canales catiónicos, resulta en la reducción parcial de los efectos de la Sts, de tal forma que se reduce en un 40% la liberación del citocromo C y un 75% la activación de la caspasa 3 inducidas por la Sts. La incubación en alto  $K^+$  isotónico inhibe la actividad apoptótica de la Sts. Estos datos indican la importancia que tiene la actividad de los canales iónicos en el proceso apoptótico inducido por Sts (Benítez-Rangel et al. 2011).

## **3.7.- Apoptosis**

La muerte celular programada es un proceso celular fundamental para el desarrollo de un individuo y la homeostasis de los tejidos adultos; ya que este proceso bioquímico permite la eliminación de células superfluas, dañadas, infectadas o transformadas. La apoptosis se diferencia de la necrosis en que se mantiene la membrana plasmática intacta, lo cual evita la reacción inflamatoria y permite la eliminación por fagocitosis y reciclamiento de componentes celulares por las células vecinas. La morfología de células apoptóticas incluye la condensación citoplasmática y nuclear, la escisión específica de proteínas

celulares, la fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos, y la escisión inter-nucleosomal del DNA. Los cuerpos apoptóticos son fagocitados por macrófagos o incluso por células vecinas. Las fases del proceso apoptótico son tres y se describen a continuación (Angosto et al. 2003; Comella et al. 2015):

**Fase de iniciación:** se caracteriza por el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, que origina la activación de endonucleasas, proteasas y caspasas, junto con cambios en el citoesqueleto.

**Fase de ejecución:** en esta fase las endonucleasas se encargan de fragmentar el DNA, las caspasas cortan diferentes proteínas en regiones específicas, se producen cambios marcados en el citoesqueleto y se condensa la cromatina.

**Fase de eliminación:** los macrófagos fagocitan a los cuerpos apoptóticos, donde la exposición de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática de las células apoptóticas tiene un papel crítico para este proceso.

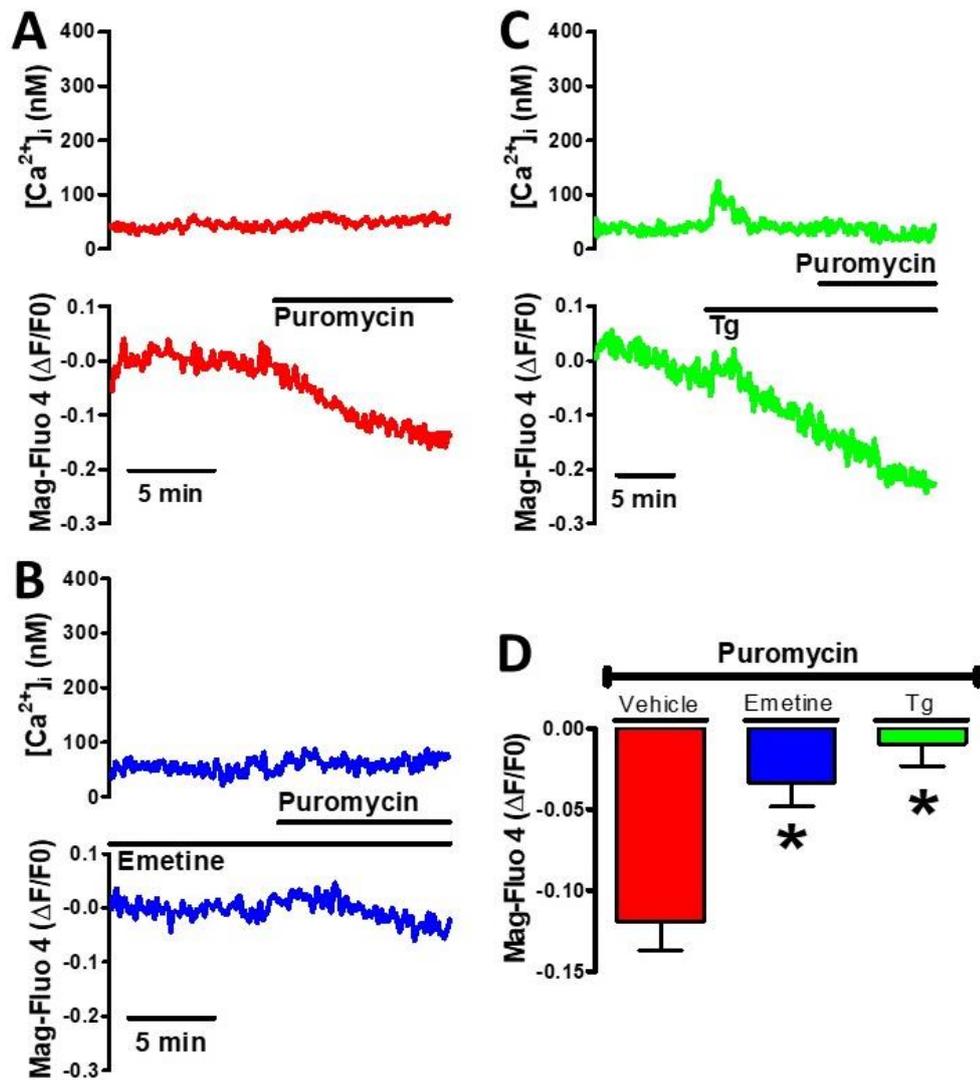
Se han descrito dos vías principales por las cuales se lleva a cabo la apoptosis, llamadas extrínseca y la intrínseca. La vía extrínseca depende de la activación de un receptor (DR) de la membrana plasmática que conduce a la activación de la caspasa 8. El mecanismo intrínseco está inducido por estrés celular; en éste, la mitocondria juega un papel central, ya que se liberan al citoplasma, proteínas pro-apoptóticas como el citocromo c, Diablo, AIF y pro-caspasa 9. El citocromo c citoplásmico en combinación con Apaf-1 forman un complejo conocido como apoptosoma que recluta a la pro-caspasa 9 y esto permite la activación de la caspasa 9, la cual a su vez termina activando a las caspasas efectoras, como la caspasa 3 (Bascones et al. 2005).

## 4.- Antecedentes

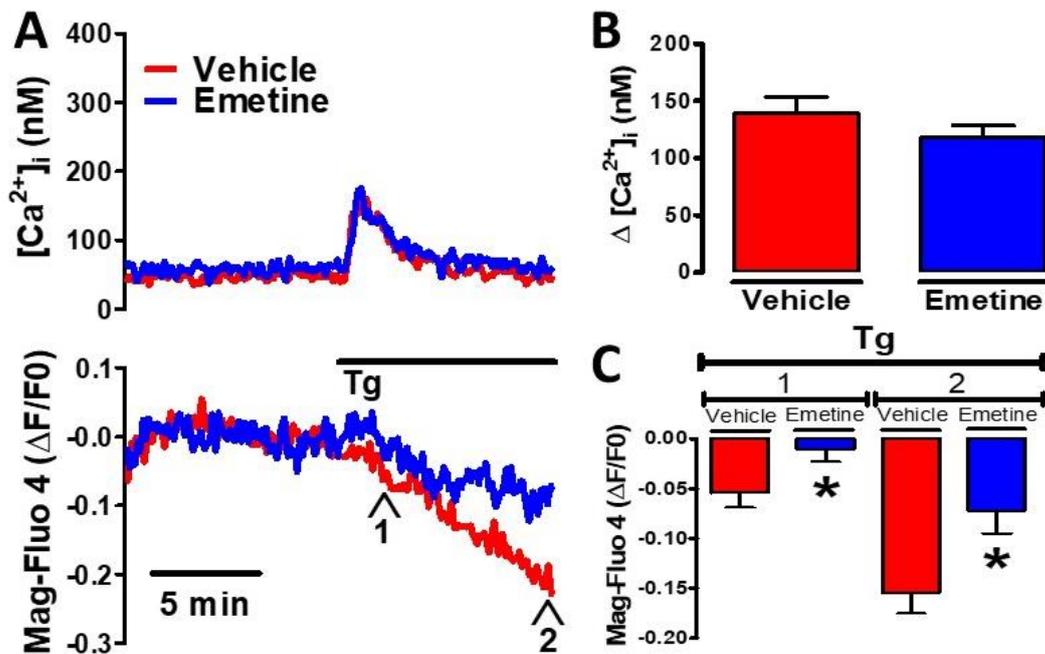
### 4.1.- El Translocón como canal de fuga de $\text{Ca}^{2+}$

El translocón es uno de los canales iónicos involucrados en la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE y por lo tanto está involucrado en regular la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$  (Sammels et al. 2010); previamente en nuestro laboratorio se evaluó la participación del complejo Sec61 en la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  en células HeLa, y para ello se realizaron registros simultáneos con Fura-2 y Mag-Fluo 4 en solución de registro libre de  $\text{Ca}^{2+}$  con 0.1 mM de EGTA. La adición de puromicina (500  $\mu\text{M}$ ), un inhibidor de la elongación de la proteína naciente que induce su liberación de forma prematura dejando el poro abierto y desocupado, provoca una reducción del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal ( $-0.13 \pm 0.02$ ) sin modificar la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Figura 4.1 A y D, trazo rojo); por otro lado, la incubación con emetina (50  $\mu\text{M}$ ), un inhibidor de la síntesis de proteína que deja anclada la cadena naciente y por lo tanto el poro queda bloqueado, redujo en un 75% la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  estimulada por puromicina ( $-0.033 \pm 0.014$ , 4.1 B y D, trazo azul). El RE es el blanco de la puromicina ya que el vaciamiento del RE con Tg (1  $\mu\text{M}$ ) elimina por completo el efecto de puromicina en el  $\text{Ca}^{2+}$  luminal ( $-0.01 \pm 0.01$ , Figura 4.1 C y D, trazo verde). Esto confirma que el translocón es un canal permeable al  $\text{Ca}^{2+}$  del RE.

Para determinar la participación del translocón en la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE se utilizó un inhibidor de la bomba SERCA para desenmascarar la fuga; la presencia de Tg (1  $\mu\text{M}$ ) ocasiona un transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (139.3  $\pm$  13.8 nM, Figura 4.2 A y B, trazo rojo) y la disminución de  $\text{Ca}^{2+}$  del ER, que se midió a los 2 min del estímulo ( $-0.054 \pm 0.01$ ) y a los 10 min ( $-0.15 \pm 0.02$ , Figura 4.2 A y C, trazo rojo); la presencia de emetina (50  $\mu\text{M}$ ) redujo el vaciamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  del ER inducido por Tg, se observó una disminución del 80% a los 2 min ( $-0.01 \pm 0.01$ ) y de un 53% a los 10 min ( $-0.07 \pm 0.02$ , Figura 4.2 A y C, trazo azul) del estímulo, sin afectar el transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (118.3  $\pm$  10.52 nM). Esto implica que el translocón es uno de los canales que participa en la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE, aunque no es el único implicado en la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  estimulada por Tg.



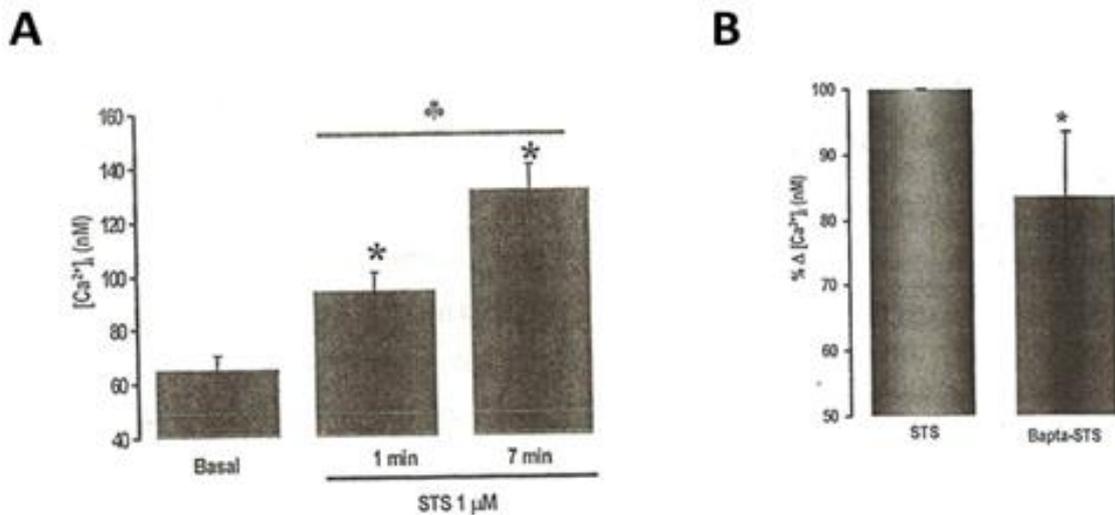
**Figura 4.1** El translocón Sec61 es un canal de fuga de  $Ca^{2+}$  del ER cuya actividad está modificada por los inhibidores de la síntesis de proteínas. (A) trazo representativo del efecto de puromicina. (B) trazo representativo del efecto de puromicina en células incubadas con emetina. (C) trazo representativo del efecto de Tg seguida por puromicina. (D) estadística de la amplitud en la reducción del  $Ca^{2+}$  luminal inducido por puromicina en presencia de emetina y Tg. Se realizó una prueba t de Student pareada \*  $p < 0.05$ ,  $n = 5$ .



**Figura 4.2** El translocón es uno de los canales involucrados en la fuga de  $Ca^{2+}$  revelada por la inhibición de la bomba SERCA con Tg en células HeLa. (A) trazos representativos de Tg con emetina. (B) Estadística del transitorio de  $Ca^{2+}$  provocado por Tg en presencia de emetina. (C) Estadística de la amplitud en la reducción del  $Ca^{2+}$  luminal inducido por Tg con emetina. Se hizo una prueba T de Student pareada \*  $p < 0.05$ ,  $n = 5$

#### 4.2.- Sts induce liberación de $Ca^{2+}$ de almacenes intracelulares

Además de ser un inhibidor generalizado de cinasas, se ha reportado que la Sts promueve la actividad de diversos canales iónicos, por lo decidimos estudiar si la Sts modifica la  $[Ca^{2+}]_i$ . La aplicación de Sts ocasionó un aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  en un 50% a partir de los 2 min y su efecto máximo se observó a los 7 min con un incremento de 120% comparado con los niveles basales. Para determinar si la fuente de  $Ca^{2+}$  era el medio extracelular se adicionó BAPTA (2 mM), para quelar el  $Ca^{2+}$  extracelular, ocasionando una pequeña reducción del 17% en el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  estimulado por Sts (Figura 4.3 tesis doctoral de Edaena Benítez-Rangel 2011); estos datos sugieren que el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  inducido por Sts proviene principalmente de la liberación de  $Ca^{2+}$  de almacenes intracelulares.



**Figura 4.3** Sts incrementa la concentración de Ca<sup>2+</sup> citosólico proveniente de almacenes intracelulares. (A) grafica del efecto de Sts en la concentración de Ca<sup>2+</sup> citosólicas. (B) grafica del efecto de BAPTA en el incremento de Ca<sup>2+</sup> citosólico inducido por Sts. Tomado de la Tesis doctoral de Benítez-Rangel Edaena. 2011.

## 5.- Justificación

La estaurosporina (inhibidor generalizado de cinasas e inductor de apoptosis) provoca un incremento inicial de los flujos iónicos que conducen a la liberación del citocromo c y la activación de caspasas efectoras. Debido a que uno de los canales involucrados en la fuga de Ca<sup>2+</sup> del RE es el translocón Sec61, y muchas de las proteínas de este complejo están fosforiladas en estado basal, pensamos que la estaurosporina pudiera reducir el nivel de fosforilación de las proteínas del translocón y esto afectar su actividad como fuga de Ca<sup>2+</sup> del RE. Por todo esto decidimos estudiar si la Sts es capaz de provocar la liberación de Ca<sup>2+</sup> del RE por activación del translocón Sec61, y tratar de identificar la naturaleza molecular de las cinasas involucradas y el papel de dicha liberación de Ca<sup>2+</sup> en la inducción de apoptosis.

## 6.- Hipótesis

La estaurosporina induce la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  por activar al translocón Sec61 al inhibir cinasas que están activas en condiciones basales y este incremento de la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por el inhibidor de cinasa tiene un papel relevante en la inducción de apoptosis.

## 7.- Objetivos

### 7.1.- Objetivo general

Estudiar el papel del translocón Sec61 como un canal de fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico, y determinar la identidad de las cinasas involucradas en su inhibición, así como su posible participación en el efecto proapoptótico de la estaurosporina.

### 7.2.- Objetivos particulares

- ❖ Determinar si la Sts causa liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de almacenes intracelulares.
- ❖ Determinar si el retículo endoplásmico es el único blanco de la Sts en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ .
- ❖ Identificar la participación del translocón Sec61 en el efecto de la Sts.
- ❖ Investigar si la PKC participa en el efecto de la Sts utilizando inhibidores con mayor especificidad por PKC (Gö6983, y Gö6976).
- ❖ Investigar si la PKC participa en la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por Tg.
- ❖ Investigar si la PKC es suficiente para explicar el efecto de la Sts.
- ❖ Determinar si cinasas como la CaMKII y la Src pudieran explicar el efecto de Sts.
- ❖ Investigar si la Akt es uno de los blancos de la Sts utilizando el inhibidor específico de Akt (Akti VIII).
- ❖ Determinar si la Akt es suficiente para explicar el efecto de Sts.

- ❖ Identificar la participación de las fosfatasas en la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$ .
- ❖ Investigar la participación del translocón en la inducción de apoptosis por Sts (caspasa-3).

## 8.- Material y Métodos

Histamina (His), Tapsigargina (Tg), estaurosporina (Sts), Emetina, 2-APB, inhibidor de Akt VIII (Akti VIII), puromicina y anisomicina fueron comprados de Sigma, mientras que Gö6983 y Gö6976 fueron obtenidos de Calbiochem y el PDBu de Biomol. Los indicadores orgánicos de  $\text{Ca}^{2+}$  fueron adquiridos de Invitrogen. Todos los químicos fueron disueltos en dimetilsulfóxido deshidratado (DMSO) a excepción de la histamina y la emetina, las cuales se disolvieron en agua.

### 8.1.- Cultivo celular y transfección

Las células HeLa se cultivaron en medio DMEM con alta glucosa (25 mM) suplementado con 10 % de suero fetal bovino, 100 mg/mL de estreptomina y 100 unidades/mL de penicilina a 37 °C en ambiente húmedo y 5% de  $\text{CO}_2$ .

Para la realización de los experimentos de regulación negativa de PKC (*down-regulation*) y en la desactivación de Akt, las células se cultivaron en condiciones normales hasta alcanzar un 70% de confluencia. Para lograr la regulación negativa de PKC se suplementó el medio DMEM con 1  $\mu\text{M}$  de PDBu por 24 h, mientras que en la desactivación de Akt las células se cultivaron por 24 h en medio DMEM carente de suero.

Para determinar el  $\text{Ca}^{2+}$  luminal del RE se utilizaron dos diferentes indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$  codificados genéticamente y dirigidos al RE, el erGAP3 y el R-CEPIA1er. Toda vez que las células alcanzaron 70 % de confluencia, se transfectaron utilizando lipofectamina 2000 con 2  $\mu\text{g}$  de plásmido codificando los indicadores proteicos mencionados. Los experimentos de cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$  se llevaron a cabo a las 48 h de iniciada la transfección.

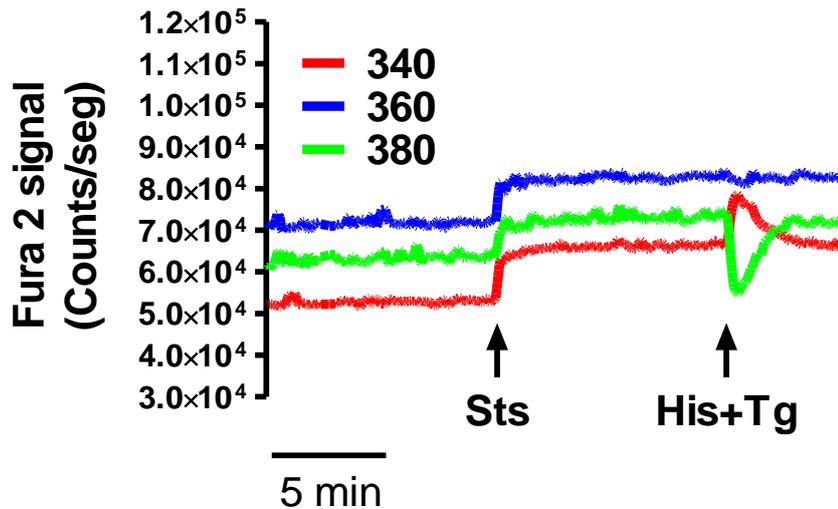
## 8.2.- Registros simultáneos de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular y $\text{Ca}^{2+}$ luminal

Una vez que las células HeLa alcanzaron el 90 % de confluencia, se cosecharon con tripsina y se lavaron por centrifugación. La pastilla celular se resuspendió en solución salina que contenía en mM: 121 NaCl, 5.4 KCl, 0.8  $\text{MgCl}_2$ , 1.8  $\text{CaCl}_2$ , 6  $\text{NaHCO}_3$ , 25 HEPES y 5.5 glucosa, con un pH ajustado a 7.3, y se evaluó la viabilidad celular con azul de tripano. Las células se utilizaron cuando la exclusión de tripano fue como mínimo de 90%.

Para determinar los cambios simultáneos de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) y la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre luminal del retículo endoplásmico ( $[\text{Ca}^{2+}]_{RE}$ ), la suspensión celular ( $1 \times 10^6$  células / ml) se incubó con 1  $\mu\text{M}$  de los colorantes Fura 2-AM y Mag-Fluo 4-AM por 2 h a temperatura ambiente y protegida de la luz. Para cada experimento se utilizó medio millón de células, se lavaron dos veces con solución salina sin  $\text{Ca}^{2+}$  añadido y suplementada con 0.1 mM de EGTA y se resuspendieron en 2.5 ml de solución sin  $\text{Ca}^{2+}$ .

Las señales de Fura-2 y Mag-Fluo 4 se registraron al alternar la excitación entre 340, 360, 380 y 485 nm, y se colectó la emisión a una longitud de onda fija de 515 nm. La calibración del Fura-2 se llevó a cabo al término de cada uno de los registros, mediante la adicción de 1.8 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  y de 0.01% de digitonina para exponer el colorante a concentraciones saturantes de  $\text{Ca}^{2+}$ . Una vez estabilizada la fluorescencia, se agregó 10 mM de EGTA para obtener la fluorescencia de Fura-2 sin  $\text{Ca}^{2+}$ ; por último, se añadió 12 mM de manganeso para apagar la fluorescencia de Fura-2 y obtener la fluorescencia de fondo.

La Sts es fluorescente en las mismas longitudes de onda utilizadas para excitar al Fura-2; incluida la longitud de 360 nm. Esta señal del Fura-2 es completamente insensible a cambios de la  $[\text{Ca}^{2+}]$ , por lo cual los cambios de fluorescencia del Fura-2 a 360 nm producidos por Sts no se deben a cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]$ , sino más bien a un artefacto introducido por la adición de la Sts (figura 8.1).



**Figura 8.1** La estaurosporina aumenta la fluorescencia en las tres longitudes de onda, mientras que el  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta la fluorescencia del Fura-2 a 340 nm, no afecta a 360 nm y reduce la fluorescencia a 380 nm.

Para corregir el artefacto producido por la Sts en la fluorescencia del Fura-2, se utiliza la señal de 360 nm, la cual es insensible a los cambios de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , y así eliminar los cambios de fluorescencia independientes de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Para ello decidimos utilizar el siguiente proceso de normalización de la señal de Fura-2, utilizado previamente en nuestro laboratorio (tesis doctoral Benítez-Rangel Edaena, 2011). Primeramente, a los registros de 340 y 380 nm se les restó el registro de 360 nm; posteriormente, a los datos resultantes se les sumó el valor basal del registro de 360 nm (promedio de la fluorescencia de 360 nm de los primeros 10 min); al llevar a cabo esta corrección se eliminó parcialmente la interferencia de Sts en la fluorescencia de Fura-2 independiente de los cambios de  $\text{Ca}^{2+}$ . Con los datos corregidos se calculó la variación en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  utilizando la ecuación de Grynkiewicz, la cual establece que:

$$\text{Calcio (nM)} = \frac{Kd\beta(R - R_{\min})}{R_{\max} - R}$$

Donde la  $Kd$  = Es la constante de disociación de Fura-2, la cual fue de 200 nM (Vorndran et al. 1995).

$\beta$  = Es el cociente de fluorescencia a 380 nm en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (con EGTA) y en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  saturante.

$R$  = Es el cociente de la fluorescencia entre 340 y 380 nm.

Rmin = Cociente de fluorescencia de 340 nm entre 380 nm en ausencia de Ca<sup>2+</sup> corregida por el cambio en la viscosidad (0.75; (Poenie 1990)).

Rmax = Cociente de fluorescencia de 340 nm entre 380 nm en presencia de Ca<sup>2+</sup> saturante por el cambio en la viscosidad (0.75; (Poenie 1990)).

Con respecto a Mag-Fluo 4, su señal no se pudo calibrar puesto que desconocemos la Kd dentro de los depósitos intracelulares de Ca<sup>2+</sup> (véase el apéndice) por lo que se realizó una normalización utilizando la señal registrada durante los primeros 10 min. El curso temporal de esta señal se calculó a partir de un ajuste no lineal de los 10 min iniciales con la siguiente ecuación:

$$Y = Y_{\max} \left[ \frac{X - C}{K(X - C)} \right]$$

Donde:

Y= Fluorescencia de Mag-Fluo 4 al tiempo X.

Ymax= Fluorescencia máxima de Mag-Fluo 4 a tiempo infinito.

X= tiempo en minutos

K= tiempo al cual se lleva a cabo la mitad del cambio máximo de fluorescencia

C= constante de tiempo que nos permite ajustar el tiempo cero para el Mag-Fluo 4 con el comienzo del registro.

Con el curso temporal observado durante los 10 min iniciales, se aplicó la ecuación para el resto del registro, y de esta manera se pudo calcular la diferencia en el comportamiento de la señal de Mag-Fluo 4 ante cada estímulo con respecto al comportamiento basal. Por último, se normalizaron los datos para obtener los cambios con respecto a la fluorescencia basal (F<sub>0</sub>) para tener un indicador de la concentración de Ca<sup>2+</sup> libre de los almacenes intracelulares ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>RE</sub>), aplicando la siguiente formula:

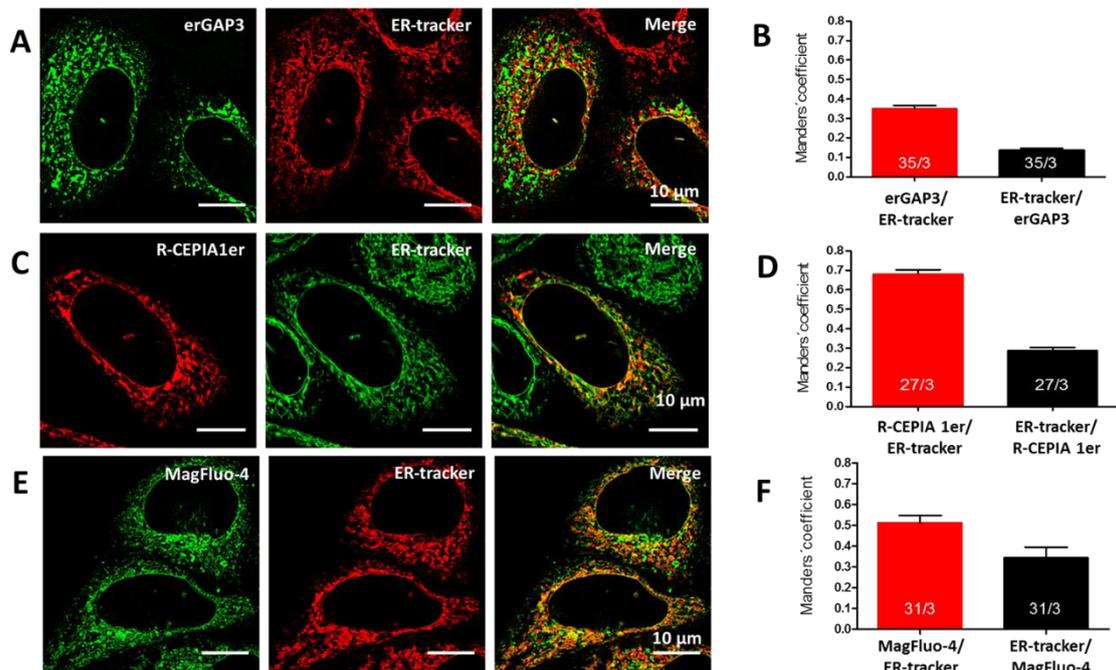
$$\frac{\Delta F}{F_0} = \frac{F - F_0}{F_0} = \left( \frac{F}{F_0} \right) - 1$$

ΔF = Diferencia de la fluorescencia de Mag-Fluo-4

$F_0$  = Fluorescencia basal (obtenida de la fórmula anterior)

F = Fluorescencia del registro

Se ha reportado que Mag-Fluo 4 colocaliza con Sec61 $\beta$  y  $\beta$ 4-GalT1 indicando que este indicador de Ca<sup>2+</sup> se ubica tanto en el RE como en el aparato de Golgi (Gallegos-Gómez et al. 2018). Además, el Mag-Fluo 4 colocaliza en aproximadamente 50% con el ER-tracker (indicador de retículo endoplásmico), mientras que otros indicadores de Ca<sup>2+</sup> codificados genéticamente dirigidos exclusivamente al retículo endoplásmico, como son erGAP3 y R-CEPIA1er, colocalizan en 30% y 60%, respectivamente, con ER-tracker (figura 8.2).



**Figura 8.2** Localización de los indicadores de Ca<sup>2+</sup> con respecto a ER-tracker. Adquisición y análisis de las imágenes por M. en C. Víctor Hugo Sánchez Vázquez

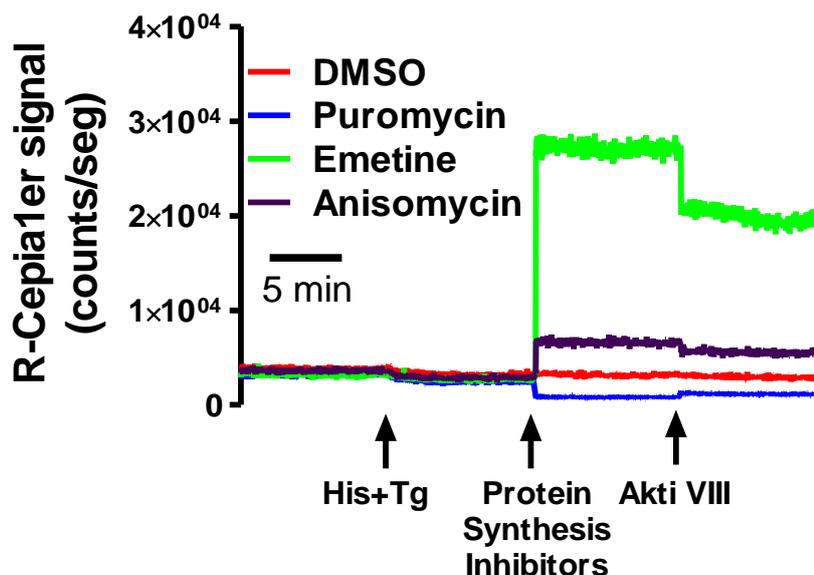
### 8.3 Registro con indicadores de Ca<sup>2+</sup> proteicos

Los registros con los indicadores de Ca<sup>2+</sup> codificados genéticamente dirigidos al RE se llevaron a cabo después de 48 h de transfección. Las células se cosecharon con tripsina y se centrifugaron, la pastilla celular se resuspendió en solución salina para evaluar su viabilidad con azul de tripano. Una exclusión del azul de tripano de un mínimo de 90% se consideró adecuada para registros de

Ca<sup>2+</sup> luminal. Para cada experimento se utilizó un millón de células, las cuales se lavaron dos veces con solución salina sin Ca<sup>2+</sup> añadido y con 0.1 mM de EGTA y se resuspendieron en 2.5 ml de solución salina sin Ca<sup>2+</sup>.

El erGAP3 es un indicador de Ca<sup>2+</sup> de cociente de excitación, y las células transfectadas con este indicador se excitaron a 410 y 485 nm y la fluorescencia resultante se colectó a 510 nm. Las células transfectadas con R-CEPIA1er se excitaron a 570 nm y la fluorescencia se colectó a 610 nm. Al igual que con Mag-Fluo 4, los primeros 10 min de registro se utilizaron como señal basal para normalizar la fluorescencia a 610 nm para R-CEPIA1er y el cociente 485/410 para erGAP3.

La presencia de los inhibidores de la síntesis de proteínas modifica la fluorescencia de las células transfectadas con R-CEPIA1er. La puromicina, que libera prematuramente la cadena nascente dejando el poro del translocón abierto, reduce la fluorescencia a pesar de vaciar previamente el retículo endoplásmico con la combinación de His+Tg, mientras que los inhibidores que bloquean el poro del translocón (emetina y anisomicina), incrementan la fluorescencia cuando la bomba está inhibida por Tg. Por el contrario, estos efectos no se observan en presencia de DMSO, el cual no modifica la fluorescencia ni altera el efecto de Akti VIII cuando el depósito ha sido vaciado previamente con His+Tg (sin ningún efecto de Akti VIII); así, los cambios inducidos por los inhibidores de la síntesis de proteínas no reflejan cambios en la concentración de Ca<sup>2+</sup> del retículo endoplásmico (figura 8.3).



**Figura 8.3** Los inhibidores de la síntesis de proteínas alteran la fluorescencia de R-CEPIA1er a pesar de que el depósito ha sido vaciado con la combinación de histamina y tapsigargina

#### 8.4 Medición de la actividad de la caspasa 3

Las células HeLa se cultivaron en cajas de 6 pozos con medio completo y 24 h antes de iniciar el experimento se cambió a DMEM libre de suero. Las células se incubaron por 4 h con  $1 \mu\text{M}$  Sts,  $10 \mu\text{M}$  Akti VIII,  $100 \text{ nM}$  Tg y  $0.1\%$  DMSO. Al finalizar el tiempo de incubación las cajas se colocaron en hielo y se retiró el medio cuidadosamente; se añadieron a cada pozo  $500 \mu\text{l}$  de solución de lisis fría que contiene en mM: 50 HEPES, 5 DTT y Triton X-100 al  $1\%$ ; posteriormente las muestras permanecieron en agitación sobre hielo durante 30 min, y por último se recuperó el lisado celular.

Se realizó el ensayo de caspasa 3 por duplicado. Se utilizaron  $2.5 \text{ ml}$  de solución de ensayo que contiene en mM: 20 HEPES, 5 DTT, 2 EDTA y Triton X-100 al  $1\%$  (pH 7.4), se agregó  $1 \mu\text{M}$  de Ac-DEVD-AMC, un sustrato fluorescente para caspasa 3, y a uno de los tubos se le adicionó  $2 \mu\text{M}$  de Ac-DEVD-CHO, un inhibidor específico de la caspasa 3, además de  $50 \mu\text{l}$  de lisado celular por tubo. Por último, las muestras se incubaron por 90 min en agitación constante a

temperatura ambiente y protegidas de la luz. Las muestras se leyeron con una excitación de 360 nm y se colectó la emisión a 460 nm.

La señal obtenida, que refleja la actividad de la caspasa 3, se normalizó sustrayendo el valor de la fluorescencia en la presencia del inhibidor Ac-DEVD-CHO de la muestra correspondiente. Esto permitió obtener los cambios de fluorescencia que se deben únicamente a la actividad de la caspasa 3. La respuesta obtenida con Sts se consideró como el 100% de actividad de la caspasa 3, por lo cual se calcularon los porcentajes de las otras condiciones experimentales con respecto a la actividad obtenida con Sts.

## **8.5 Análisis estadístico**

Todos los datos mostrados están expresados como el promedio  $\pm$  el error estándar y representan al menos tres experimentos independientes. La significancia de los datos se determinó con la prueba t de Student pareada para dos grupos, o ANOVA y una prueba posterior de Dunnett para la comparación de múltiples grupos. El valor de  $p < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

## 9.- Resultados

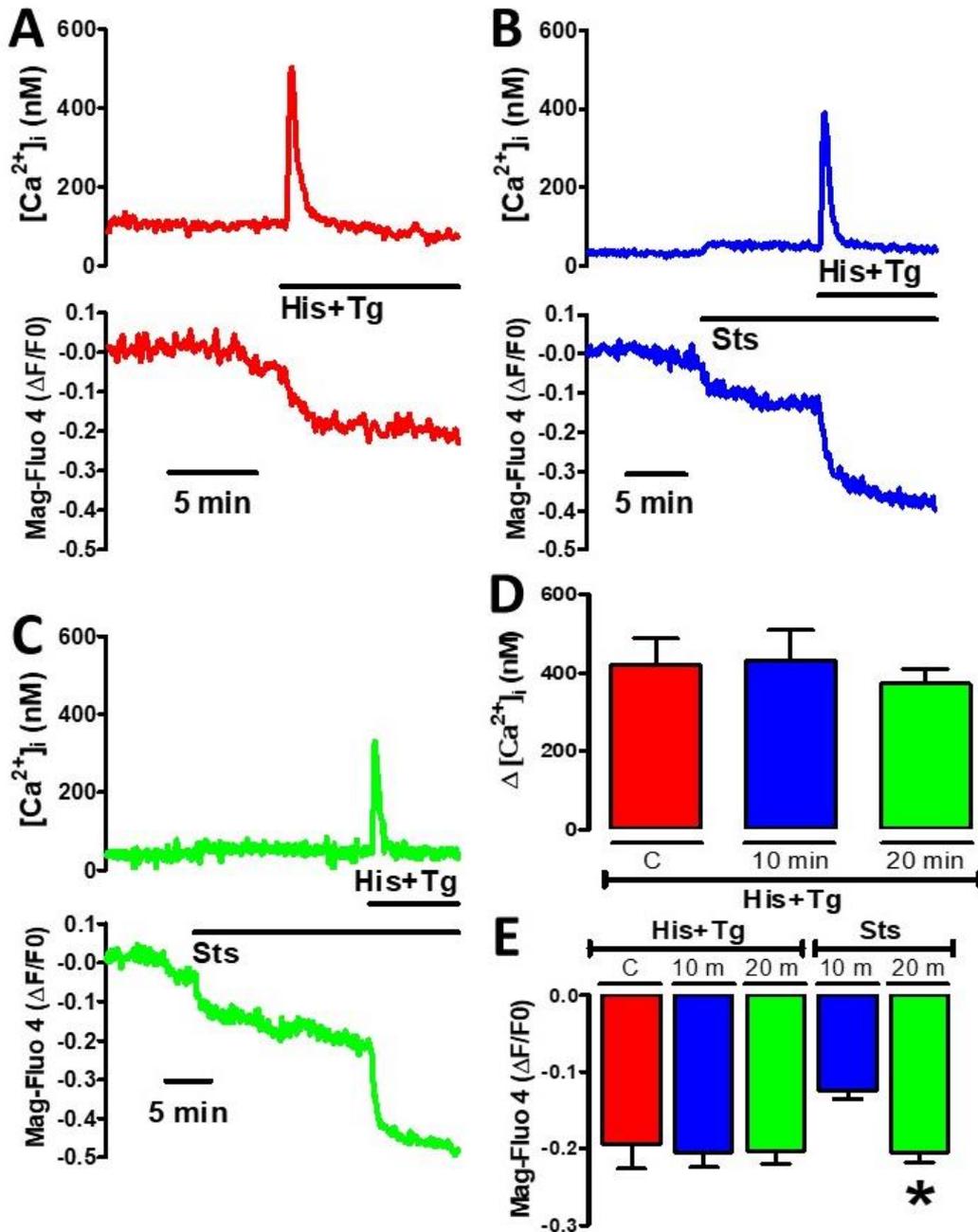
### 9.1.- La estaurosporina, un inhibidor generalizado de cinasas, reduce el $\text{Ca}^{2+}$ luminal siendo la PKC uno de sus blancos.

Datos previos de nuestro laboratorio indican que Sts, un inhibidor generalizado de cinasas (Meggio et al. 1995), ocasiona un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que se reduce parcialmente ante la ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo debido a la presencia de BAPTA, un quelante de  $\text{Ca}^{2+}$ . Lo anterior sugiere que parte del efecto de Sts se debe a la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de depósitos intracelulares.

Para conocer si Sts libera  $\text{Ca}^{2+}$  de almacenes intracelulares se realizaron registros simultáneos con Fura-2 (indicador de calcio citoplásmico) y Mag-Fluo 4 (indicador de calcio luminal) en solución de registro sin  $\text{Ca}^{2+}$  añadido y con 0.1 mM de EGTA. La adición de 1  $\mu\text{M}$  de Sts ocasionó una reducción rápida en la fluorescencia de Mag-Fluo 4 ( $-0.12 \pm 0.01$ ), al igual que la combinación de Histamina 100  $\mu\text{M}$  y Tapsigargina 1  $\mu\text{M}$  ( $-0.19 \pm 0.03$ ). La reducción del calcio luminal inducida por Sts fue aproximadamente 63% de la producida por His+Tg, y sin embargo no ocasionó ningún incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , a diferencia de la His+Tg ( $420 \pm 6$  nM, Figura 9.1 A, B, E). Estos datos se observaron a los 10 min de aplicada la Sts; a los 20 min de exposición se incrementó la reducción del calcio luminal ( $-0.20 \pm 0.01$ ), igualando a la amplitud observada a los 10 min de aplicada la His+Tg. Estos datos sugieren que la Sts tiene dos componentes de liberación de calcio, uno rápido y otro lento (Figura 9.1 A y C). Por otro lado, el efecto de Sts en el calcio luminal, ya sea por 10 ó 20 min, no modificó la respuesta de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducida por His+Tg ( $430 \pm 78$  nM y  $373 \pm 36$  nM) ni el vaciamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por la misma combinación ( $-0.205 \pm 0.01$  y  $-0.203 \pm 0.01$ , Figura 9.1). Estos datos sugieren que Sts y la His+Tg acceden a compartimientos diferentes del retículo endoplásmico.

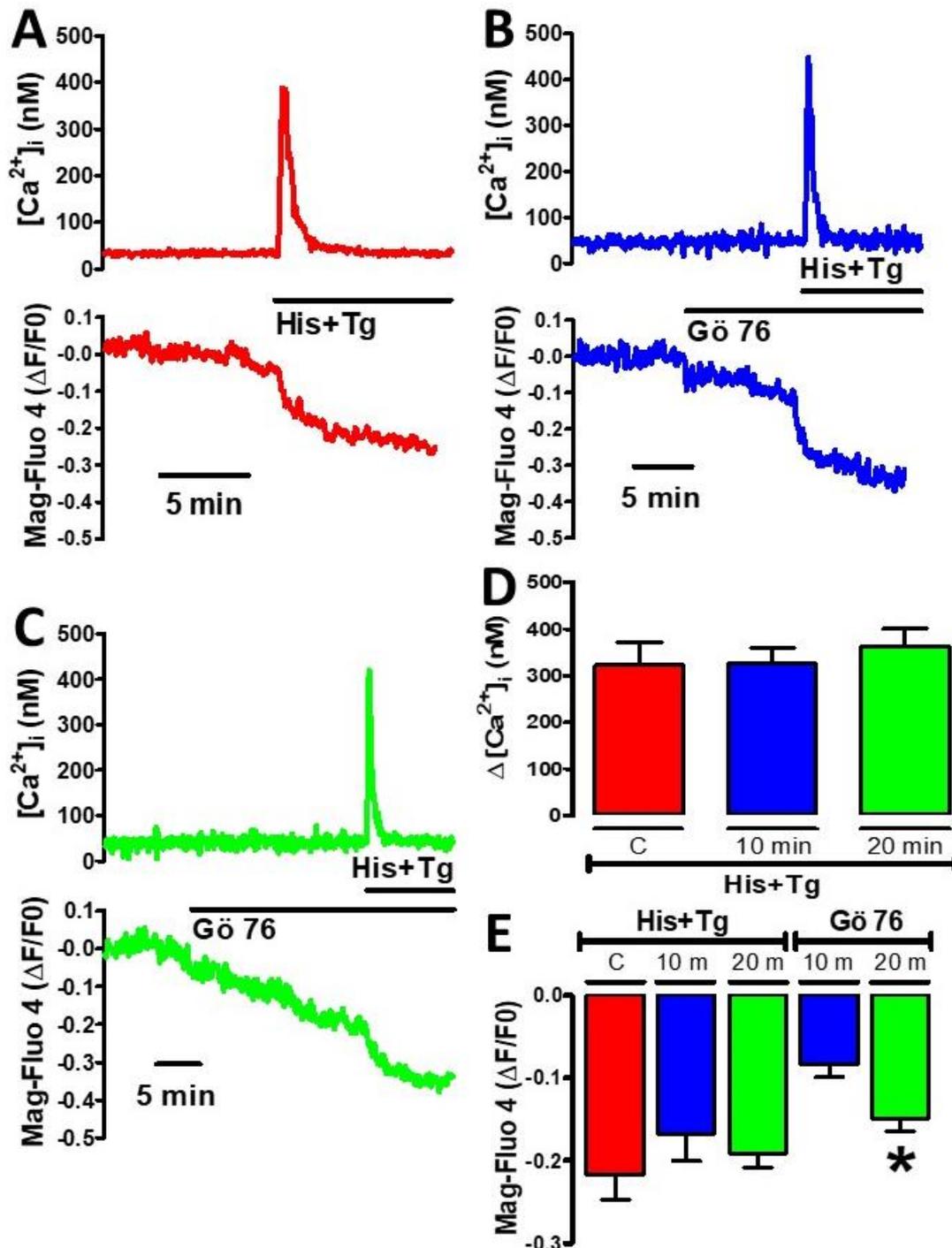
Las cinasas de la familia de PKC son uno de los blancos de la Sts (Omura et al. 1995), por lo cual decidimos emplear al Gö6976, un inhibidor específico de la PKC (Martiny-Baron et al. 1993), para estudiar la participación de esta familia de cinasas en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y el  $\text{Ca}^{2+}$  luminal. La aplicación de 200 nM de Gö6976 redujo

la  $[Ca^{2+}]_i$  luminal ( $-0.084 \pm 0.01$ , Figura 9.2 B) con la salvedad de que dicha reducción fue tan solo un 70% del efecto de Sts. El efecto del Gö6976 también fue dependiente del tiempo, incrementando un 77% la amplitud de su efecto a los 20 min ( $-0.149 \pm 0.01$ , Figura 9.2 C). Igualmente, el Gö6976 no alteró la respuesta de  $[Ca^{2+}]_i$  inducida por His+Tg ( $322 \pm 49$  nM, Figura 9.2 A-C).



**Figura 9.1** La Sts redujo el  $Ca^{2+}$  luminal en células HeLa. (A) trazo representativo de la respuesta a His+Tg, (B y C) trazos representativos del efecto de Sts, (D) análisis estadístico del transitorio de  $Ca^{2+}$  provocado por His+Tg, (E) análisis estadístico de la amplitud de la reducción del  $Ca^{2+}$  luminal inducida por His+Tg y Sts. Se realizó una prueba t de Student pareada o ANOVA y la prueba de Dunnett para la comparación de múltiples grupos \*  $p < 0.05$ ,  $n = 5$

Por otra parte, la presencia de Gö6976 por 10 ó 20 min, no modificó la respuesta de  $[Ca^{2+}]_i$  inducida por His+Tg ( $326 \pm 33$  nM y  $363 \pm 36$  nM) ni en la reducción del  $Ca^{2+}$  luminal ( $-0.167 \pm 0.03$  y  $-0.191 \pm 0.01$ , Figura 9.2 D-E).

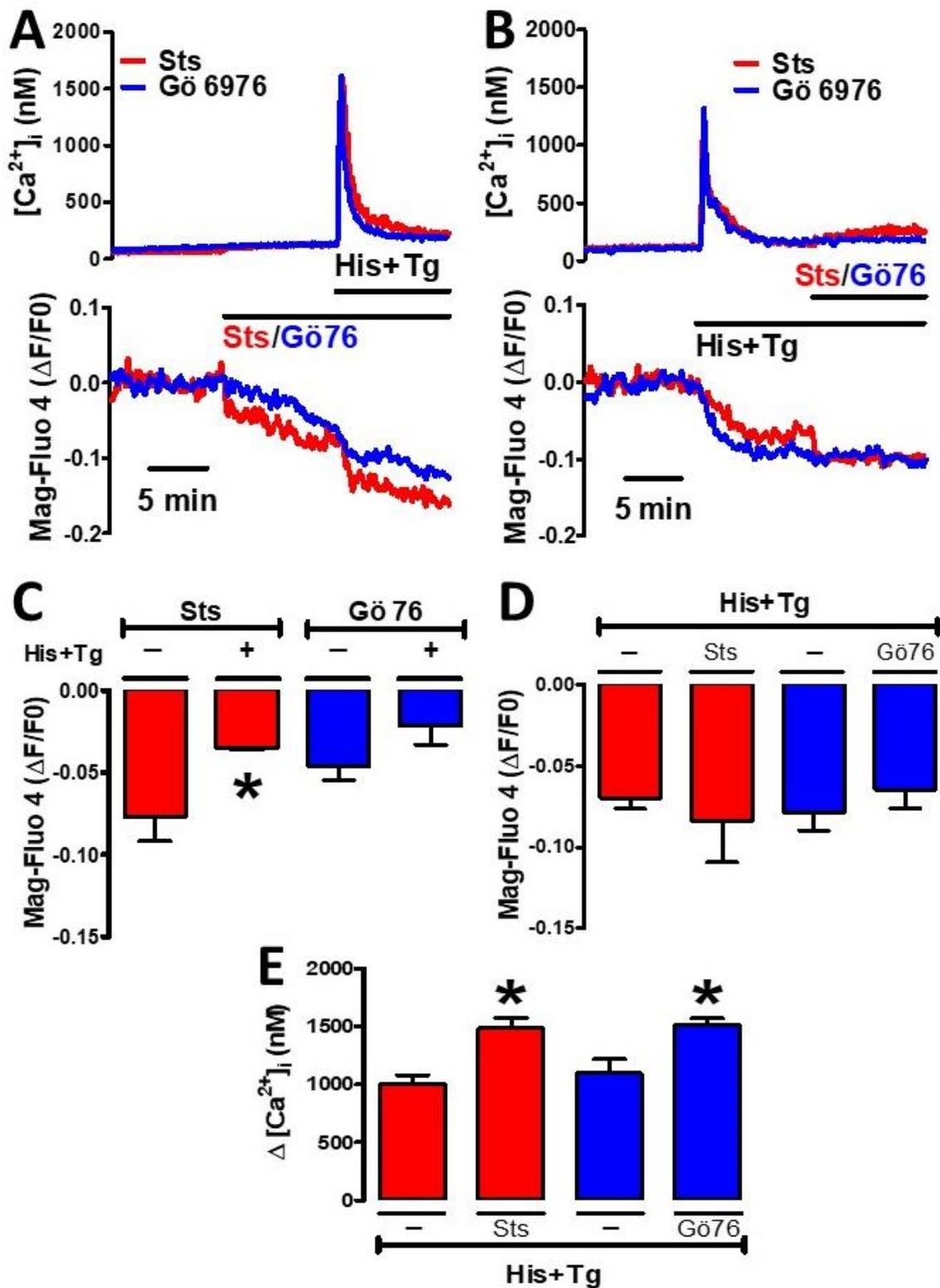


**Figura 9.2** Un inhibidor específico de la PKC, el Gö6976, redujo el calcio luminal en células HeLa. (A) trazo representativo de la respuesta a His+Tg, (B y C) trazos representativos del efecto de Gö6976, (D) análisis estadístico del transitorio de  $Ca^{2+}$  provocado por His+Tg después de Gö6976, (E) análisis estadístico de la amplitud en la reducción del  $Ca^{2+}$  luminal inducido por His+Tg y Gö6976. Se hizo una prueba t de Student pareada o ANOVA y la prueba de Dunnett para la comparación de múltiples grupos \*  $p < 0.05$ ,  $n = 5$

Los efectos de Sts y Gö6976 en la  $[Ca^{2+}]_i$  y el  $Ca^{2+}$  luminal se observaron en ausencia de  $Ca^{2+}$  extracelular, por lo que nos interesó conocer si la presencia de  $Ca^{2+}$  externo pudiera alterar dichas respuestas. En presencia de 1.8 mM de  $Ca^{2+}$  externo disminuyó la respuesta en el  $Ca^{2+}$  luminal a la Sts ( $-0.077 \pm 0.01$ ) y al Gö6976 ( $-0.046 \pm 0.008$ , Figura 9.3 A), sin ningún incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ . También se observó que la His+Tg tuvo un efecto menor en la reducción de  $Ca^{2+}$  luminal ( $-0.07 \pm 0.01$ ), aunque la respuesta de  $[Ca^{2+}]_i$  inducida por esta combinación fue mayor, cercana a 1000 nM (figura 9.3 B, D, E).

Por otro lado, la presencia de los inhibidores de cinasas incrementó la  $[Ca^{2+}]_i$  inducida por His+Tg a  $1,484 \pm 89$  nM después de Sts y  $1,510 \pm 62$  nM en presencia de Gö6976 (Figura 9.3 A y E), sin modificar la reducción de  $Ca^{2+}$  luminal inducida por His+Tg (Figura 9.3 D; Sts,  $-0.083 \pm 0.02$  y Gö6976,  $-0.065 \pm 0.01$ ). Aparentemente, los inhibidores de PKC incrementaron la  $[Ca^{2+}]_i$  inducida por His+Tg al favorecer la entrada de  $Ca^{2+}$  por canales de la membrana plasmática (tesis doctoral Benitez-Rangel Edaena, 2011, tesis doctoral de Martínez Ericka, 2021). Por otra parte, la adicción previa de His+Tg disminuyó un 55% el efecto de Sts en el  $Ca^{2+}$  luminal ( $-0.034 \pm 0.001$ ), pero no afectó la respuesta de Gö6976 ( $-0.021 \pm 0.01$ , Figura 9.3 B y D).

Los resultados anteriores nos permiten concluir que Sts y Gö6976 reducen el  $Ca^{2+}$  luminal sin modificar la  $[Ca^{2+}]_i$ . Ya que la presencia de  $Ca^{2+}$  externo no incrementó la respuesta a los inhibidores de PKC, se decidió realizar todos los experimentos en ausencia de  $Ca^{2+}$  externo, es decir soluciones salinas sin  $Ca^{2+}$  añadido y 0.1 mM de EGTA.

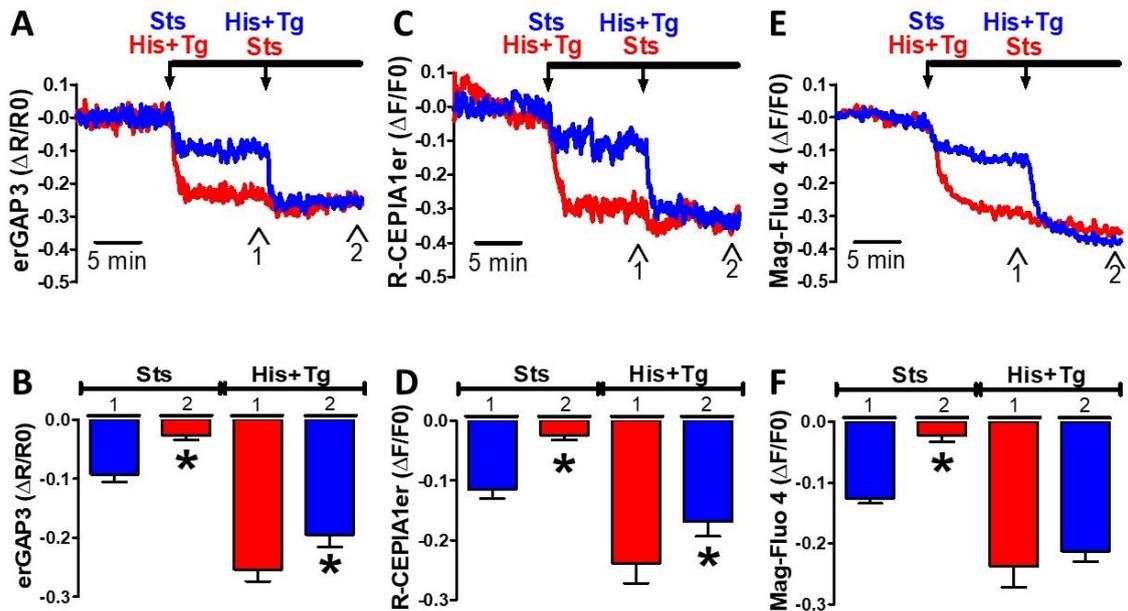


**Figura 9.3** La presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo redujo el efecto de Sts y Gö6976 en el  $\text{Ca}^{2+}$  luminal. (A) trazo representativo de la respuesta de los inhibidores de PKC e His+Tg, (B) trazo representativo del efecto a His+Tg con los inhibidores de PKC, (C y D) análisis estadístico de la amplitud en la reducción del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal inducido por los inhibidores de PKC y de His+Tg, (E) análisis estadístico del transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  provocado por His+Tg. Se hizo una prueba T-student pareada \*  $p < 0.05$ ,  $n = 5$

## 9.2.- Los inhibidores de PKC liberan Ca<sup>2+</sup> proveniente del Retículo Endoplásmico

Los experimentos anteriores demuestran que los inhibidores de PKC liberan Ca<sup>2+</sup> de almacenes intracelulares; sin embargo, el Mag-fluo 4 se localiza tanto en el retículo endoplásmico como en el aparato de Golgi (Gallegos-Gómez et al. 2018), por lo cual se decidió utilizar indicadores de Ca<sup>2+</sup> proteicos dirigidos exclusivamente al retículo endoplásmico, erGAP-3 y R-CEPIA1er, y se comparó con las respuesta observadas con el Mag-Fluo 4. Como se observó previamente en la figura 9.1, la Sts redujo el Ca<sup>2+</sup> luminal tanto con los indicadores de Ca<sup>2+</sup> dirigidos exclusivamente al retículo endoplásmico, erGAP3 (-0.092 ± 0.02, Figura 9.4 A y B; trazo azul) y R-CEPIA1er (-0.114 ± 0.02, Figura 9.4 C y D; trazo azul), al igual que con indicador de Ca<sup>2+</sup> orgánico, Mag-Fluo 4 (-0.12 ± 0.02, Figura 9.4 E y F; trazo azul). La adición de His+Tg produjo la misma respuesta independientemente del indicador utilizado fuera erGAP3 (-0.253 ± 0.1), R-CEPIA1er (-0.238 ± 0.03) o Mag-Fluo 4 (-0.237 ± 0.03, Figura 9.4 A, C, E; trazos rojos).

Para confirmar que Sts reduce los niveles de Ca<sup>2+</sup> del retículo endoplásmico se aplicó primero la combinación de His+Tg para vaciar al retículo endoplásmico (Barrero María Jose et al 1997); la adición previa de His+Tg eliminó el efecto de Sts observados con erGAP3 (-0.027 ± 0.006), con R-CEPIA1er (-0.024 ± 0.007) o con Mag-Fluo 4 (-0.022 ± 0.01), como se observa en la Figura 9.4 (trazo rojo 2a adición). La presencia previa de Sts disminuyó la respuesta de Ca<sup>2+</sup> luminal a His+Tg en un 25%, aunque esto fue significativo sólo para erGAP3 (-0.194 ± 0.02) y R-CEPIA1er (-0.168 ± 0.02 Figura 9.4; trazo azul 2º estímulo), que son los indicadores de Ca<sup>2+</sup> localizados exclusivamente en el retículo endoplásmico, mientras que con Mag-Fluo 4 la reducción no fue significativa (-0.212 ± 0.01). Esto pudiera deberse a que Mag-Fluo 4 tiene una distribución más amplia que el retículo endoplásmico y que esos otros depósitos capturan el Ca<sup>2+</sup> liberado por la His+Tg obscureciendo el efecto de estos agonistas en el retículo endoplásmico (Gallegos-Gómez et al. 2018). En resumen, la Sts libera únicamente Ca<sup>2+</sup> del retículo endoplásmico y tiene un efecto de vaciamiento menor con respecto al inducido por la combinación de His+Tg.

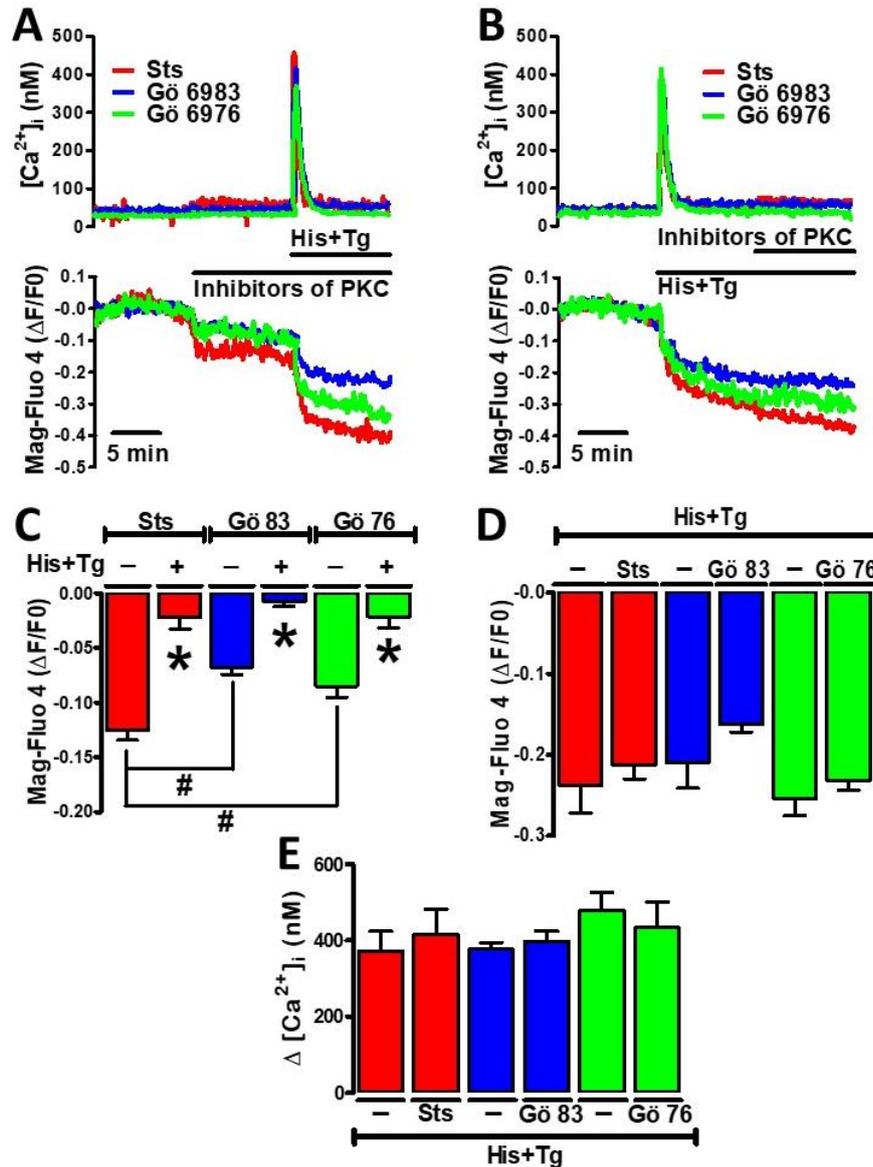


**Figura 9.4** La estaurosporina reduce el Ca<sup>2+</sup> luminal del retículo endoplásmico con tres diferentes indicadores de Ca<sup>2+</sup> luminal. Trazos representativos de la respuesta de Sts e His+Tg con diferentes indicadores de Ca<sup>2+</sup> (A) erGAP3 (C) R-CEPIA1er y (E) Mag-Fluo 4 y (B, D y F) análisis estadístico de la amplitud en la reducción del Ca<sup>2+</sup> luminal inducido por Sts o por His+Tg. Se hizo una prueba t de Student pareada \* p<0.05, n=4 y 5

Los diferentes indicadores de Ca<sup>2+</sup> luminal del retículo endoplásmico utilizados mostraron similar amplitud en respuesta a la Sts e His+Tg, y además reportaron la misma reducción en la fuga de Ca<sup>2+</sup> inducida por Sts al vaciar previamente el depósito con His+Tg; por lo anterior decidimos utilizar Mag-Fluo 4 para reportar los cambios en las [Ca<sup>2+</sup>]<sub>luminal</sub> del RE en los siguientes experimentos, ya que este indicador nos permite utilizar Fura-2 al mismo tiempo y así poder reportar cambios simultáneos en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y en el Ca<sup>2+</sup> luminal.

Ya que Sts es un inhibidor generalizado de cinasas, y uno de sus blancos es la PKC, decidimos comparar el efecto en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>ER</sub> y la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> de diferentes inhibidores de PKC como la Sts (1 μM), el Gö6983 (200 nM) y el Gö6976 (200 nM). La adición de los inhibidores específicos de PKC, Gö6983 y Gö6976, no modificó la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>; sin embargo, si disminuyeron los niveles de Ca<sup>2+</sup> luminal, con una amplitud cercana al 60% de la observada con Sts (-0.125 ± 0.008), sin diferencia significativa entre ambos inhibidores específicos de PKC (Figura 9.5 A y C), Gö6983 (-0.067 ± 0.006) y Gö6976 (-0.085 ± 0.009). Para conocer si los inhibidores específicos de PKC promueven la fuga de Ca<sup>2+</sup> del retículo endoplásmico utilizamos la combinación de His+Tg para vaciar el depósito; como

se observó previamente, la presencia de His+Tg eliminó la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal inducida por Sts ( $-0.022 \pm 0.01$ ), y también eliminó el efecto de Gö6983 ( $-0.007 \pm 0.004$ ) y Gö6976 ( $-0.021 \pm 0.01$ , Figura 9.5 B y C), confirmando que los inhibidores de PKC inducen la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico. Además, la presencia de cualquier inhibidor de PKC no modificó el transitorio de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , ni el vaciamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por His+Tg (Figura 9.5 D y E).

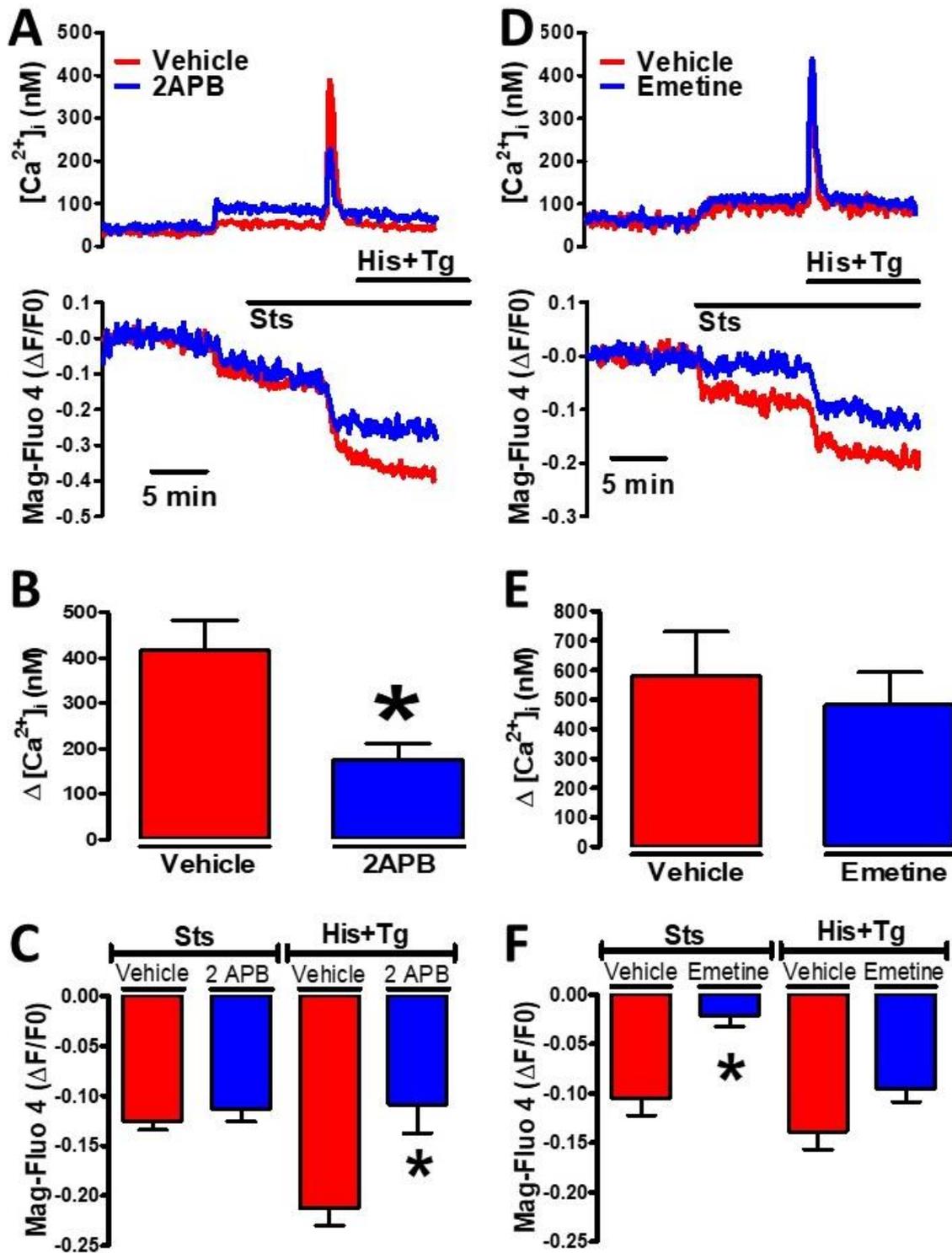


**Figura 9.5** Diferentes Inhibidores de PKC reducen el  $\text{Ca}^{2+}$  luminal del retículo endoplásmico. (A y B) trazos representativos de la respuesta de los inhibidores de PKC e His+Tg. (C y D) análisis estadístico de la amplitud en la reducción del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal inducido por los inhibidores de PKC e His+Tg. (E) análisis estadístico del transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  provocado por His+Tg. Se hizo una prueba t de Student pareada o ANOVA y la prueba de Dunnett para la comparación de múltiples grupos \*  $p < 0.05$ ,  $n = 5$

### 9.3.- Los inhibidores de PKC inducen la fuga de $\text{Ca}^{2+}$ a través del translocón

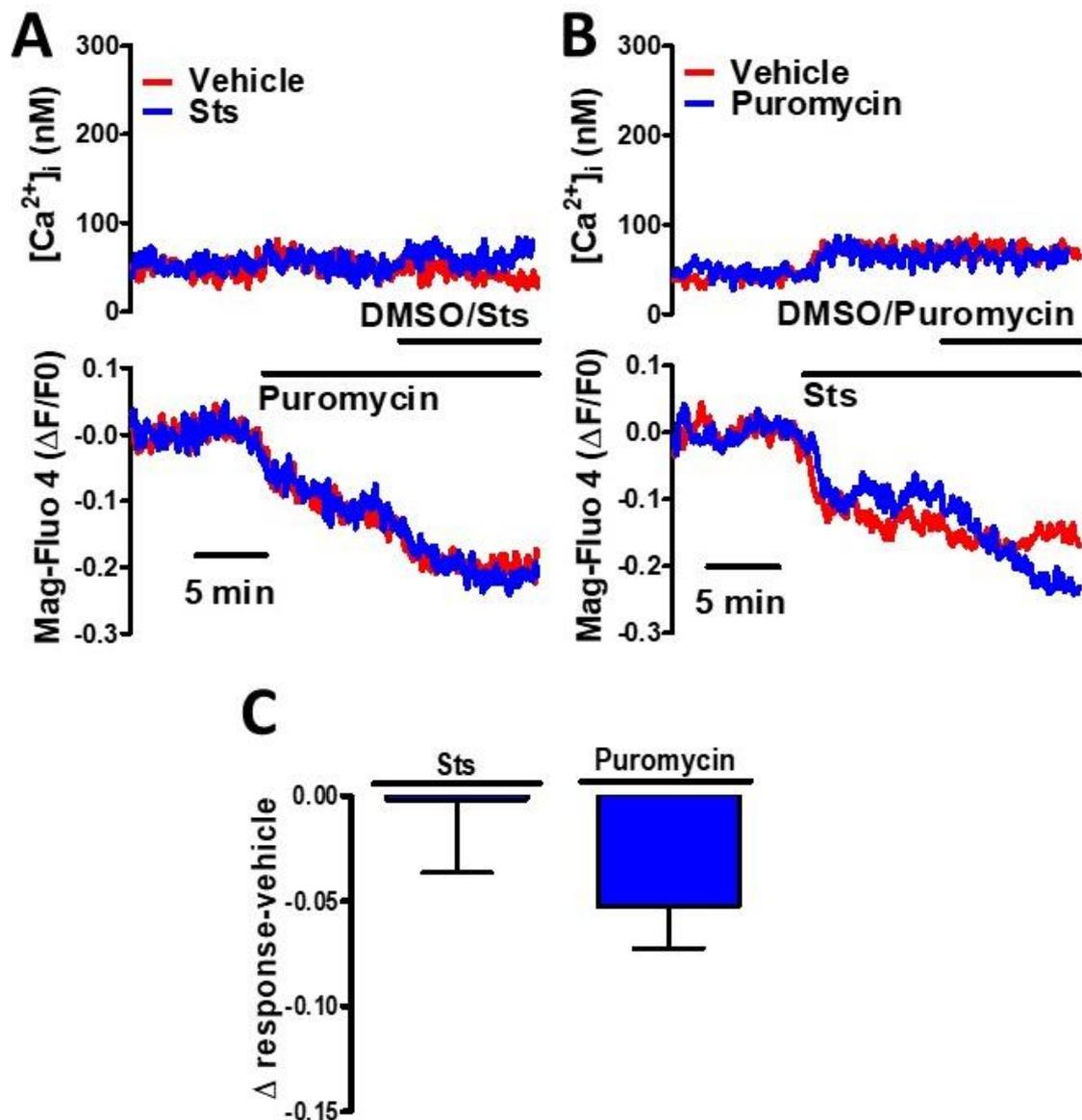
Los datos obtenidos hasta el momento indican que los inhibidores de PKC provocan una fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico, por lo que nuestro siguiente objetivo fue conocer el canal involucrado en la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por los inhibidores de PKC. Primeramente, decidimos evaluar la participación del receptor de  $\text{IP}_3$  utilizando 2-APB (Ascher-landsberg et al. 1999; Maruyama et al. 1997), que se ha sugerido como un inhibidor del receptor de  $\text{IP}_3$ . La fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por Sts ( $-0.125 \pm 0.008$ , Figura 9.6 A y C; trazo rojo) no fue modificada por la presencia de 50  $\mu\text{M}$  de 2-APB ( $-0.113 \pm 0.01$ , Figura 9.6 A y C; trazo azul), mientras que la respuesta de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ( $417 \pm 65$ , Figura 9.6 B) y la reducción del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal ( $-0.212 \pm 0.01$ , Figura 9.6 C) inducidos por His+Tg, sí fueron reducidas por la presencia del 2-APB,  $\sim 55\%$  del pico de la respuesta  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ( $176 \pm 35$  nM) y del vaciamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $-0.10 \pm 0.02$ ). La presencia de 2-APB disminuyó la respuesta de His+Tg sin afectar el efecto de la Sts. Estos datos sugieren que la Sts activa un canal diferente al utilizado por His+Tg, es decir, no está involucrado el receptor de  $\text{IP}_3$ .

Un posible candidato sería el translocón, un canal del retículo endoplásmico encargado de la translocación de proteínas al lumen del retículo (Rapoport 2007) y que se ha sugerido que participa en la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico. Para estudiar si la Sts activa al translocón, utilizamos inhibidores de la síntesis de proteínas, como son la emetina y la puromicina (Vazquez 1974). Se ha reportado que la emetina, un inhibidor de la elongación de la síntesis de proteínas, evita la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del translocón (Amer et al. 2009); la incubación con 50  $\mu\text{M}$  de emetina eliminó la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  provocada por Sts ( $-0.021 \pm 0.01$ , Figura 9.6 D y F; trazo azul) sin modificar la respuesta de His+Tg (Figura 9.6 E y F).



**Figura 9.6** La activación del translocón Sec61 por estaurosporina explica su efecto en el  $Ca^{2+}$  luminal del retículo endoplásmico. (A) trazos representativos con 2-APB. (B) análisis estadístico del transitorio de  $Ca^{2+}$  provocado por His+Tg con 2-APB. (C) análisis estadístico de la amplitud en la reducción del  $Ca^{2+}$  luminal inducido por Sts e His+Tg con 2-APB. (D) trazo representativo con emetina. (E) análisis estadístico del transitorio de  $Ca^{2+}$  provocado por His+Tg con emetina. (F) análisis estadístico de la amplitud en la reducción del  $Ca^{2+}$  luminal inducido por Sts e His+Tg con emetina. Se hizo una prueba T-student pareada  $\cdot p < 0.05$ ,  $n = 5$ . El 2-APB y la emetina se adicionaron al inicio de cada registro y se mantuvieron durante todo el experimento.

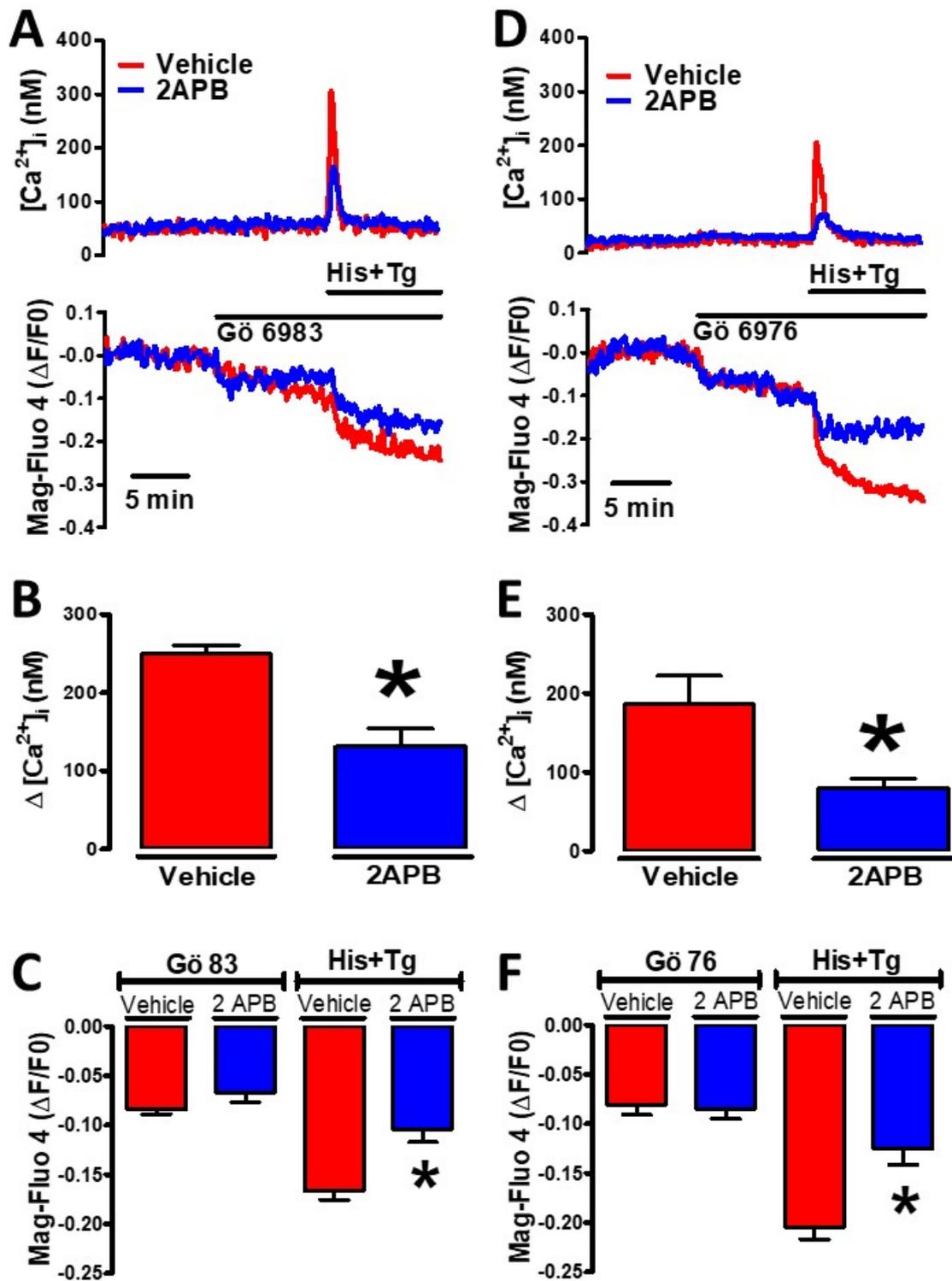
Para corroborar la participación del translocón también utilizamos la puromicina, un inhibidor de la síntesis de proteínas que libera prematuramente a la cadena naciente y promueve la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del translocón (Lomax et al. 2002). La presencia de 500  $\mu\text{M}$  de puromicina indujo una fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $-0.185 \pm 0.02$  al min 30, Figura 9.7 A, trazo rojo) que fue mayor a la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido que Sts ( $-0.133 \pm 0.008$  al min 30, Figura 9.7 B, trazo rojo). Por otra parte, al igual que la emetina, la presencia previa de la puromicina previno el efecto de Sts ( $-0.186 \pm 0.02$  al min 30, Figura 9.7 A; trazo azul), ya que la amplitud fue semejante a la obtenida con solo puromicina ( $-0.185 \pm 0.02$  al min 30, Figura 9.7



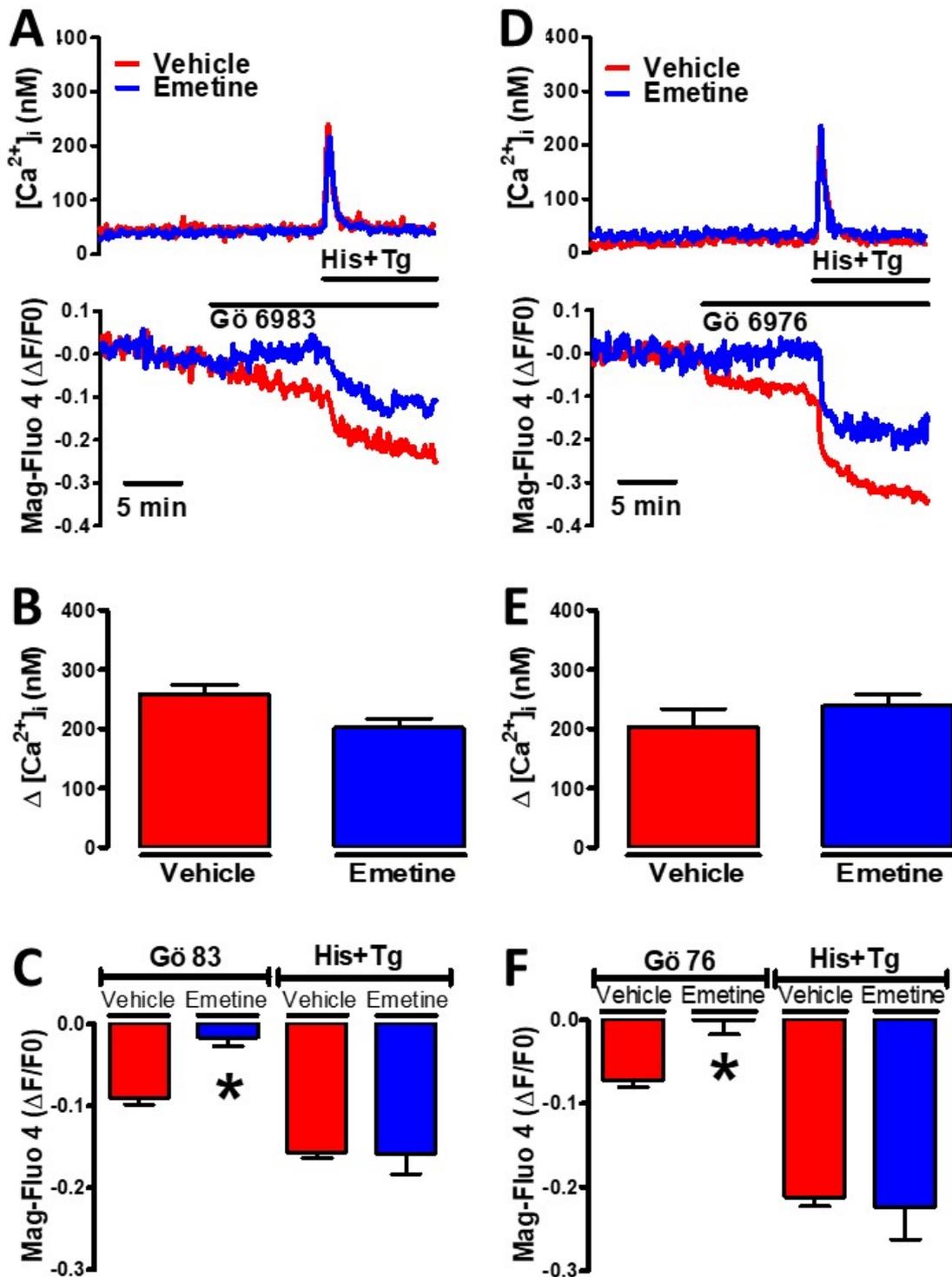
**Figura 9.7** El efecto de puromicina en el  $\text{Ca}^{2+}$  luminal es mayor que el de estaurosporina. (A) trazo representativo del efecto de puromicina. (B) trazo representativo del efecto de Sts. (C) análisis estadístico de la amplitud en la reducción del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal inducido por Sts y puromicina. Se hizo una prueba T-student pareada \*  $p < 0.05$ ,  $n = 5$

A; trazo rojo); es decir la presencia de puromicina eliminó por completo el efecto de Sts ( $-0.001 \pm 0.03$ , Figura 9.7 C); mientras que la presencia de Sts redujo parcialmente la respuesta de puromicina ( $-0.186 \pm 0.01$  al min 30, Figura 9.7 B; trazo azul), debido a que mostró una amplitud ligeramente mayor a la obtenida con solo Sts ( $-0.133 \pm 0.008$  al min 30, Figura 9.7; B trazo rojo), con una reducción del 70% del efecto de puromicina ( $-0.052 \pm 0.01$ , Figura 9.7 C). Con base en los resultados anteriores, se puede concluir que la Sts induce la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico a través del translocón Sec61.

Para conocer si el efecto en la reducción de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal inducido por los inhibidores específicos de PKC, Gö6983 y Gö6976, depende del receptor de  $\text{IP}_3$  o del translocón utilizamos 2-APB y emetina. Las reducciones del calcio luminal inducidas por los inhibidores de PKC, Gö6983 ( $-0.084 \pm 0.004$ , Figura 9.8 A y C trazo rojo) y Gö6976 ( $-0.08 \pm 0.009$ , Figura 9.8 D y F trazo rojo), no fueron modificadas por la presencia del inhibidor del receptor de  $\text{IP}_3$  puesto que se obtuvieron respuestas similares a la adición de los inhibidores específicos de PKC en ausencia de 2-APB, Gö6983 ( $-0.066 \pm 0.009$ , Figura 9.8 A y C; trazo azul) y Gö6976 ( $-0.085 \pm 0.009$ , Figura 9.8 D y F; trazo azul). En contraste, el incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ( $250 \pm 10$  nM, Figura 9.8; trazo rojo) y la reducción del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal ( $-0.166 \pm 0.008$ , Figura 9.8; trazo rojo) estimulados por la adición de His+Tg, sí fueron reducidos de forma significativa por la presencia de 2-APB, mostrando una reducción de ~50% en el transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $132 \pm 21$  nM, Figura 9.8 B y E; trazo azul) y en la reducción de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal ( $-0.10 \pm 0.01$ , Figura 9.8 C y F; trazo azul). Por el contrario, la presencia de emetina eliminó por completo la reducción de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal inducida por los inhibidores de PKC, Gö83 ( $-0.017 \pm 0.009$ , Figura 9.9 A y C; trazo azul) y Gö6976 ( $-0.0008 \pm 0.01$ , Figura 9.9 D y F; trazo azul), sin cambio estadísticamente significativo en la respuesta de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducida por His+Tg ( $202 \pm 15$  nM, Figura 9.9 B y E; trazo azul) y la reducción en el  $\text{Ca}^{2+}$  luminal ( $-0.158 \pm 0.02$ , Figura 9.9 C y F; trazo azul). Al igual que la Sts, el Gö83 y el Gö76 inducen la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico vía la activación del translocón Sec61 $\alpha$ .



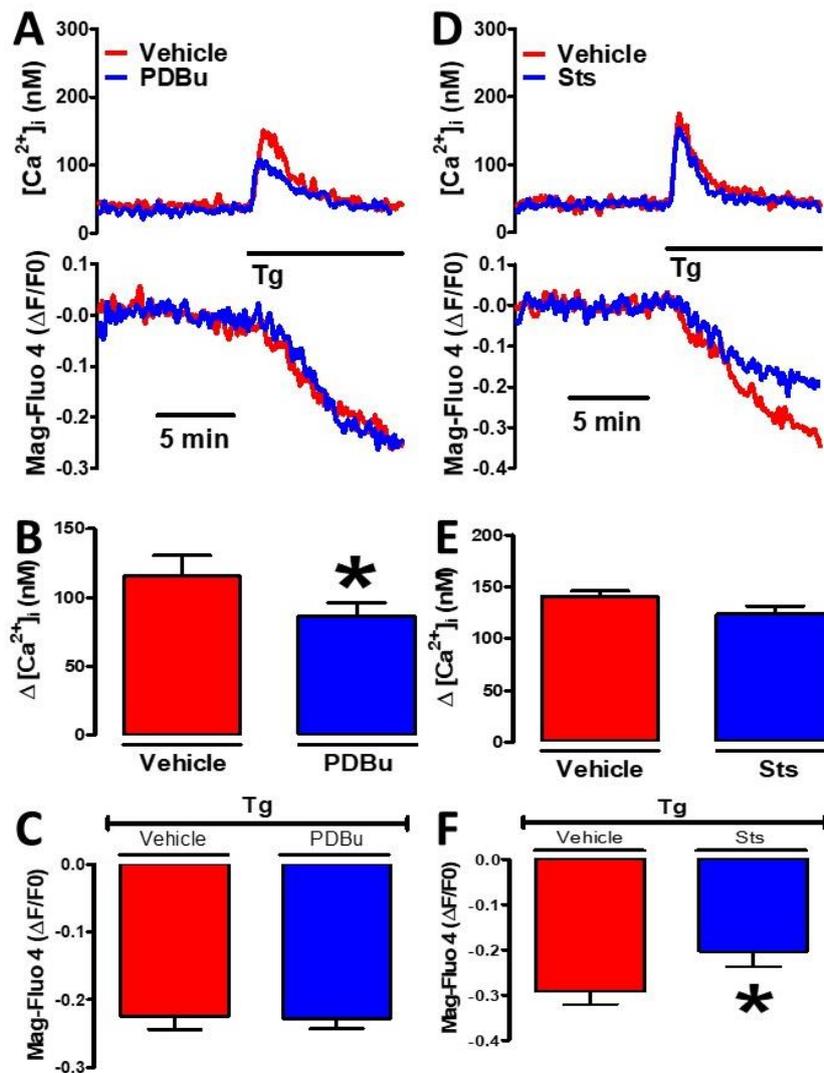
**Figura 9.8** Los inhibidores de PKC no activan al receptor de  $IP_3$  para explicar la reducción de  $Ca^{2+}$  luminal. (A) trazo representativo del efecto de Gö6983 en presencia de 2-APB. (B) análisis estadístico del transitorio de  $Ca^{2+}$  provocado por His+Tg con 2-APB. (C) análisis estadístico de la amplitud en la reducción del  $Ca^{2+}$  luminal inducido por Gö6983 e His+Tg con 2-APB. (D) trazo representativo de Gö6976 en presencia de 2-APB. (E) análisis estadístico del transitorio de  $Ca^{2+}$  provocado por His+Tg con 2-APB. (F) análisis estadístico de la amplitud en la reducción del  $Ca^{2+}$  luminal inducido por Gö6976 e His+Tg con 2-APB. Se hizo una prueba t de Student pareada  $\ast p < 0.05$ ,  $n=5$ . El 2-APB se adicionó al inicio del registro y mantuvo durante todo el experimento.



**Figura 9.9** La emetina bloquea por completo el efecto de los inhibidores de PKC en la reducción de  $Ca^{2+}$  luminal. (A) trazo representativo del efecto de Gö6983 en presencia de emetina. (B) análisis estadístico del transitorio de  $Ca^{2+}$  provocado por His+Tg con emetina. (C) análisis estadístico de la amplitud en la reducción del  $Ca^{2+}$  luminal inducido por Gö6983 e His+Tg con emetina. (D) trazo representativo de Gö6976 en presencia de emetina. (E) análisis estadístico del transitorio de  $Ca^{2+}$  provocado por His+Tg con emetina. (F) análisis estadístico de la amplitud en la reducción del  $Ca^{2+}$  luminal inducido por Gö6976 e His+Tg con emetina. Se hizo una prueba de t de Student pareada \*  $p < 0.05$ ,  $n = 5$ . La emetina se adicióno al inicio de cada experimento y se mantuvo durante todo el experimento.

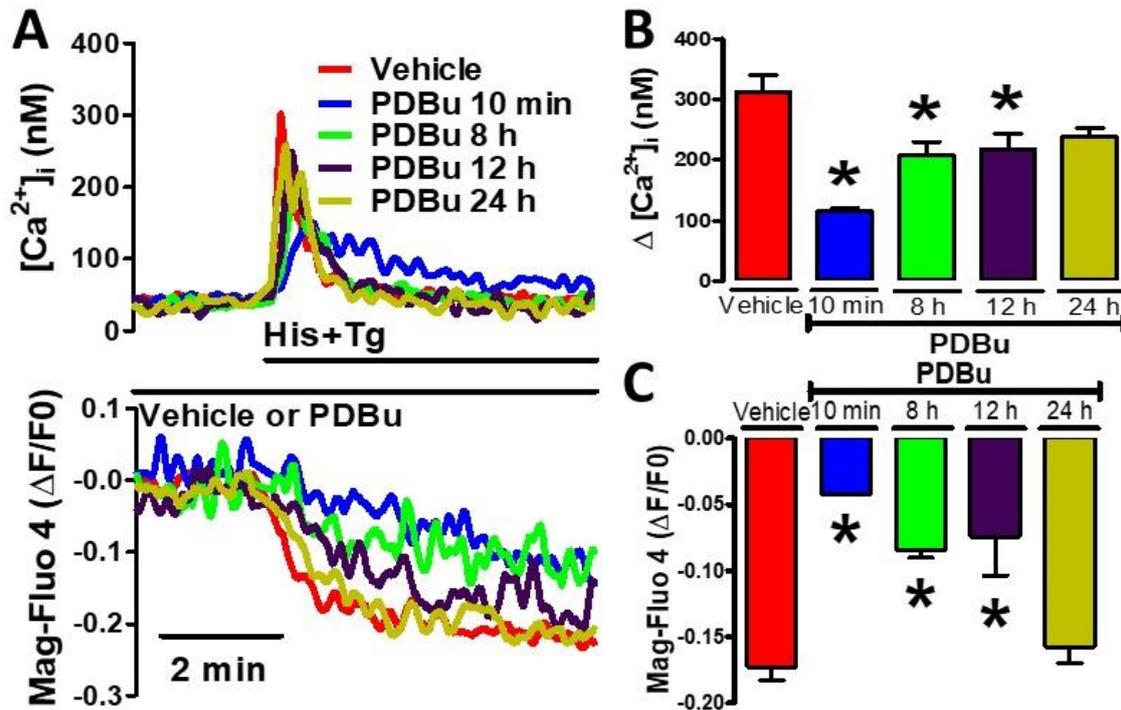
#### **9.4.- Participación de PKC en la salida de $\text{Ca}^{2+}$ del retículo endoplásmico.**

Con base en los resultados anteriores, donde se demuestra que los inhibidores de PKC inducen la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico a través del translocón, decidimos evaluar si la PKC pudiera estar modulando la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico revelada por la adición de Tg, el inhibidor selectivo de la bomba SERCA. Esto se justifica porque el translocón es uno de los canales involucrados en la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por la inhibición de la bomba SERCA. Para ello utilizamos Sts y PDBu, este último es un éster de forbol que induce la activación permanente de PKC. La inhibición de la bomba SERCA con 1  $\mu\text{M}$  de Tg ocasionó un incremento transitorio de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ( $116 \pm 15$  nM, Figura 9.10 A y B; trazo rojo) junto con la reducción en el  $\text{Ca}^{2+}$  luminal ( $-0.23 \pm 0.01$ , Figura 9.10 A y C; trazo rojo). La fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por Tg fue sensible a la actividad de PKC, ya que la incubación con 1  $\mu\text{M}$  de PDBu, un activador de PKC, disminuyó un 25% el transitorio de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ( $87 \pm 10$  nM, Figura 9.10 A y B; trazo azul) sin modificar la reducción de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  ( $-0.23 \pm 0.02$ , Figura 9.10 A y C; trazo azul); mientras que la presencia de Sts disminuyó la reducción del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal ( $-0.20 \pm 0.03$ , Figura 10 D y F; trazo azul) inducida por Tg, mostrando una reducción del 31% comparada con la respuesta de Tg con DMSO ( $-0.29 \pm 0.02$ , Figura D y F; trazo rojo), sin alterar el transitorio de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ( $120 \pm 9$  nM, Figura 9.10 D y E; trazo azul). Estos datos sugieren que la actividad de PKC tiene un efecto complejo en la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por Tg.



**Figura 9.10** La fuga de  $Ca^{2+}$  revelada por tapsigargina tiene una dependencia compleja con la PKC. (A) trazo representativo del efecto de Tg en presencia de PDBu. (B) análisis estadístico del transitorio de  $Ca^{2+}$  provocado por Tg con PDBu. (C) análisis estadístico de la amplitud en la reducción del  $Ca^{2+}$  luminal inducido por Tg con PDBu. (D) trazo representativo de Tg en presencia de Sts. (E) análisis estadístico del transitorio de  $Ca^{2+}$  provocado por Tg con Sts. (F) análisis estadístico de la amplitud en la reducción del  $Ca^{2+}$  luminal inducido por Tg con Sts. Se hizo una prueba t de student pareada \*  $p < 0.05$ ,  $n = 5$ . El PDBu y la Sts se adicionaron al inicio de cada registro y se mantuvieron durante todo el experimento.

Los resultados anteriores sugieren la participación de PKC en la fuga de  $Ca^{2+}$  del retículo endoplásmico, por lo que decidimos utilizar otra estrategia para investigar la importancia de la PKC en la fuga de  $Ca^{2+}$ . En este caso el protocolo que utilizamos fue inducir la degradación (*down-regulation*) de PKC, la cual se logra por exposición prolongada a los ésteres de forbol (Olah et al. 2002); para conocer el tiempo mínimo necesario para ocasionar la *down-regulation* de PKC evaluamos el efecto agudo de PDBu en la respuesta de His+Tg (Montero et al. 2003). Como en los resultados anteriores, la His+Tg provoca un transitorio de  $Ca^{2+}$  ( $312 \pm 27$  nM, Figura 9.11 A y B; trazo rojo) y la reducción de  $Ca^{2+}$  luminal ( $-0.172 \pm 0.02$ , Figura 9.11 A y C; trazo rojo); sin embargo, la presencia aguda

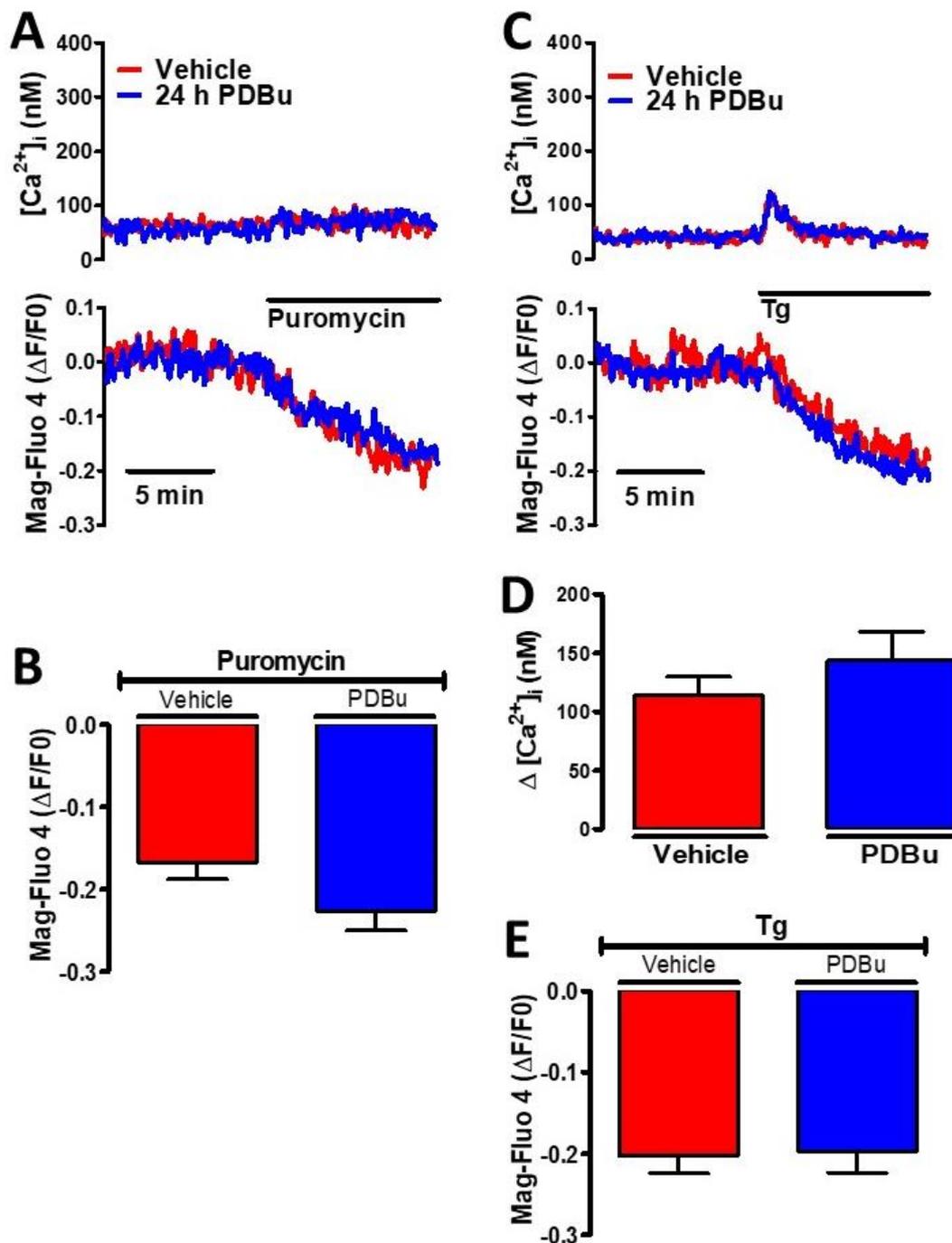


**Figura 9.11** La incubación prolongada con un activador de PKC produce la desaparición del efecto de la activación de PKC. (A) trazos representativos del efecto de His+Tg en presencia de PDBu. (B) análisis estadístico del transitorio de  $Ca^{2+}$  provocado por His+Tg con PDBu. (C) análisis estadístico de la amplitud en la reducción del  $Ca^{2+}$  luminal inducido por His+Tg con PDBu. Se hizo una prueba ANOVA y una prueba de Dunnett para la comparación de múltiples grupos. \*  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ . El PDBu se mantuvo durante todo el experimento.

de PDBu ocasionó una reducción en la respuesta de His+Tg, del 63% en el transitorio de la  $[Ca^{2+}]_i$  ( $115 \pm 5$  nM, trazo azul) y una inhibición del 75% en el vaciamiento de  $Ca^{2+}$  ( $-0.042 \pm 0.0001$ , trazo azul), y la exposición crónica de PDBu por 8 h ( $209 \pm 21$  nM y  $-0.084 \pm 0.005$ , trazo verde) y 12 h ( $218 \pm 25$  nM y  $-0.074 \pm 0.02$ , trazo morado) siguió mostrando un efecto inhibitorio de PDBu en la respuesta de His+Tg; sin embargo, la exposición prolongada a PDBu por 24 h sí eliminó el efecto agudo del activador de PKC en la respuesta de His+Tg ( $239 \pm 13$  nM y  $-0.157 \pm 0.01$ , trazo dorado), por lo cual el tiempo mínimo necesario para ocasionar *down-regulation* de PKC fue 24 h con  $1 \mu M$  PDBu.

Con base en lo anterior, utilizamos 24 h de incubación con PDBu para inducir la *down-regulation* de PKC y así evaluar la importancia de la presencia de PKC en la fuga de  $Ca^{2+}$ . Como primer paso evaluamos la fuga de  $Ca^{2+}$  través del translocón utilizando puromicina, la cual no provocó un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ ; pero sí una disminución en la  $[Ca^{2+}]_{ER}$  ( $-0.167 \pm 0.02$ , Figura 9.12 A y B; trazo

rojo), y la presencia prolongada de PDBu por 24 h no modificó significativamente el efecto de puromicina en la  $[Ca^{2+}]_{ER}$  ( $-0.226 \pm 0.02$ , Figura 9.12 A y B; trazo azul). Además, la fuga de  $Ca^{2+}$  revelada por la inhibición de la bomba SERCA con Tg no se vio modificada significativamente por la *down-regulation* de PKC, ni en el transitorio de  $Ca^{2+}$  ( $143 \pm 24$  nM, Figura 9.12 C y D; trazo azul) ni en la disminución de  $Ca^{2+}$  luminal ( $-0.197 \pm 0.02$ , Figura 9.12 C y F; trazo azul), comparado con el efecto de Tg en la  $[Ca^{2+}]_i$  ( $114 \pm 16$ , Figura 9.12 C y D trazo rojo) y en el  $Ca^{2+}$  luminal ( $-0.202 \pm 0.02$ , figura 9.12 C y F; trazo azul) en presencia de DMSO por 24 h. Los datos anteriores indican dos posibilidades, que PKC no tiene un papel primordial en la fuga de  $Ca^{2+}$  inducida por Tg y puromicina o que la ausencia de PKC es rápidamente compensada por otra cinasa para evitar la fuga de  $Ca^{2+}$ .



**Figura 9.12** La *down-regulation* de PKC no modificó la fuga de  $Ca^{2+}$  inducida por puromicina y Tg. (A) trazo representativo del efecto de puromicina en presencia de PDBu 24 h. (B) análisis estadístico de la amplitud en la reducción del  $Ca^{2+}$  luminal provocado por puromicina con PDBu por 24 h. (C) trazo representativo de Tg en presencia de PDBu por 24 h. (D) análisis estadístico del transitorio de  $Ca^{2+}$  provocado por Tg con PDBu por 24 h. (E) análisis estadístico de la amplitud en la reducción del  $Ca^{2+}$  luminal inducido por Tg con PDBu 24 h. Se hizo una prueba t de Student pareada \*  $p < 0.05$ ,  $n = 5$ . El PDBu se mantuvo durante todo el experimento.

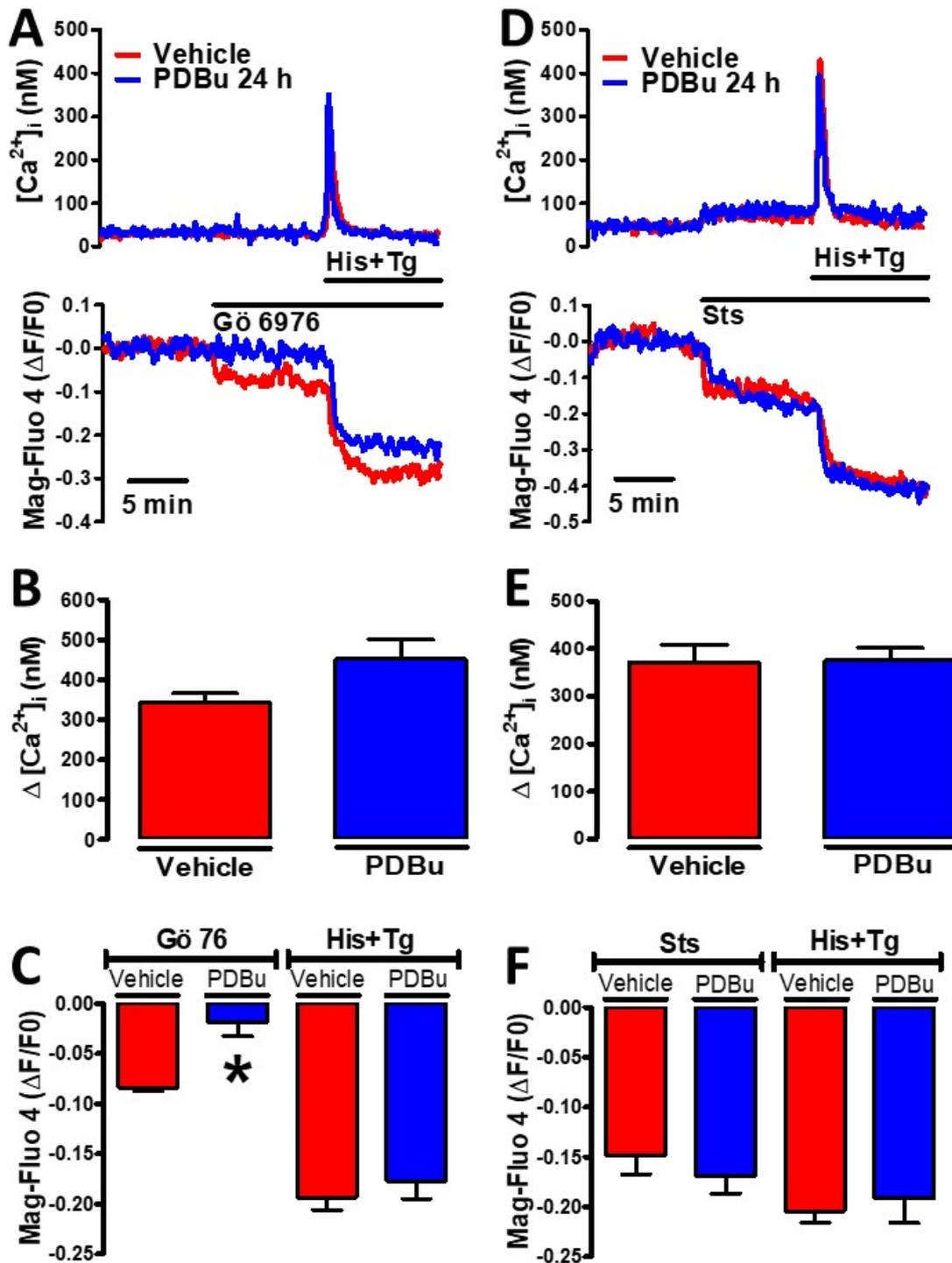
## 9.5.-PKC participa en la fuga de $Ca^{2+}$ estimulada por Sts

La fuga de  $Ca^{2+}$  muestra una compleja regulación por PKC, pero los resultados obtenidos con los inhibidores de PKC sugerían la participación de PKC en la fuga

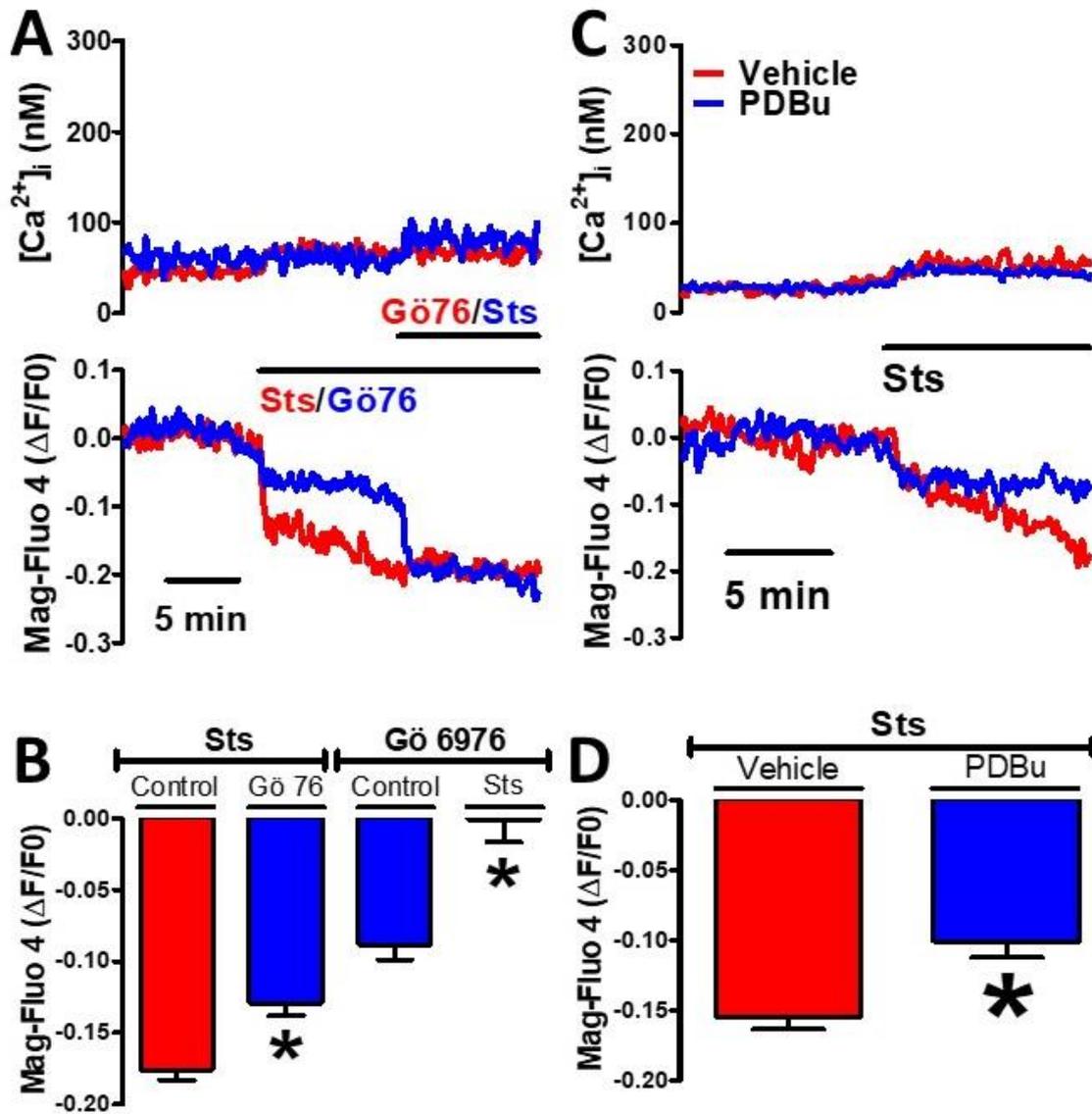
de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del translocón; por lo anterior, evaluamos el efecto de los inhibidores de PKC en células incubadas con PDBu por 24 h, para ocasionar una *down-regulation* de PKC. Como en la figura 9.5, los inhibidores de PKC ocasionan una reducción en la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ , (Gö6976  $-0.08 \pm 0.003$ , Figura 9.13 A y C: trazo rojo; Sts  $-0.14 \pm 0.01$ , Figura 9.13 D y F; trazo rojo), sin ningún cambio en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Lo novedoso fue que la *down-regulation* de la PKC con PDBu por 24 h, eliminó por completo el efecto de Gö6976 ( $-0.01 \pm 0.01$ , Figura 9.13 A y C; trazo azul) pero no modificó la respuesta a Sts ( $-0.16 \pm 0.01$ , Figura 9.13 D y F; trazo azul); además, al igual que los datos mostrados en la figura 9.11, el transitorio de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y el vaciamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por His+Tg (Figura 9.13) no se modificaron por la *down-regulation* de PKC.

Con base en los resultados anteriores, decidimos evaluar la participación de PKC en la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por Sts, cambiamos la estrategia utilizando Gö6976 y PDBu ahora de forma aguda para eliminar la participación de PKC en el efecto de Sts; el efecto de Gö6976 ( $0.08 \pm 0.01$ , Figura 9.14 A y B; trazo azul) y de Sts ( $-0.17 \pm 0.007$ , Figura 9.14 A y B; trazo rojo) fueron modificados por la presencia previa del otro inhibidor de PKC; es decir la presencia de Sts eliminó el efecto de Gö6976 ( $-0.0007 \pm 0.01$ , Figura 9.14 A y B; trazo rojo), mientras que la respuesta de Sts se redujo en un 29% ( $-0.12 \pm 0.008$ , Figura A y B; trazo azul) por la presencia previa de Gö6976. Por otro lado, la presencia de PDBu de forma aguda redujo el 40% la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal inducida por Sts ( $-0.101 \pm 0.01$ , Figura 9.14 C y D; trazo azul).

Con los datos anteriores se puede concluir que PKC es la cinasa involucrada en la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del translocón inducido por Gö6976; mientras que la reducción de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  inducida por Sts depende parcialmente de PKC, ya que al eliminar la participación de PKC, sea con Gö6976, PDBu o la *down-regulation* de PKC, no es suficiente para suprimir la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  por Sts, indicando la participación, de al menos, otra cinasa sensible a Sts que puede compensar la ausencia de PKC.



**Figura 9.13** La PKC está involucrada en la fuga de  $Ca^{2+}$  inducida por Gö6976. (A) trazo representativo del efecto de Gö6976 en presencia de PDBu por 24 h. (B) análisis estadístico del transitorio de  $Ca^{2+}$  provocado por His+Tg con PDBu por 24 h. (C) análisis estadístico de la amplitud en la reducción del  $Ca^{2+}$  luminal provocado por Gö6976 con PDBu por 24 h. (D) trazo representativo de Sts en presencia de PDBu por 24 h. (E) análisis estadístico del transitorio de  $Ca^{2+}$  provocado por His+Tg con PDBu por 24 h. (F) análisis estadístico de la amplitud en la reducción del  $Ca^{2+}$  luminal inducido por Sts con PDBu por 24 h. Se hizo una prueba t de student pareada  $\cdot p < 0.05$ ,  $n = 5$ . El PDBu se mantuvo durante todo el experimento.



**Figura 9.14** La PKC está involucrada en la fuga de  $Ca^{2+}$  inducida por Gö6976. (A) trazo representativo del efecto de Sts y Gö76. (B) análisis estadístico de la amplitud en la reducción del  $Ca^{2+}$  luminal provocado por Sts y Gö76. (C) trazo representativo de Sts en presencia aguda de PDBu. (D) análisis estadístico de la amplitud en la reducción del  $Ca^{2+}$  luminal inducido por Sts con PDBu de forma aguda. Se hizo una prueba t de student pareada \*  $p < 0.05$ ,  $n = 5$ . El PDBu se adicionó al inicio del registro y se mantuvo durante todo el experimento.

## 9.6.- La participación de otras cinasas en el efecto de Sts

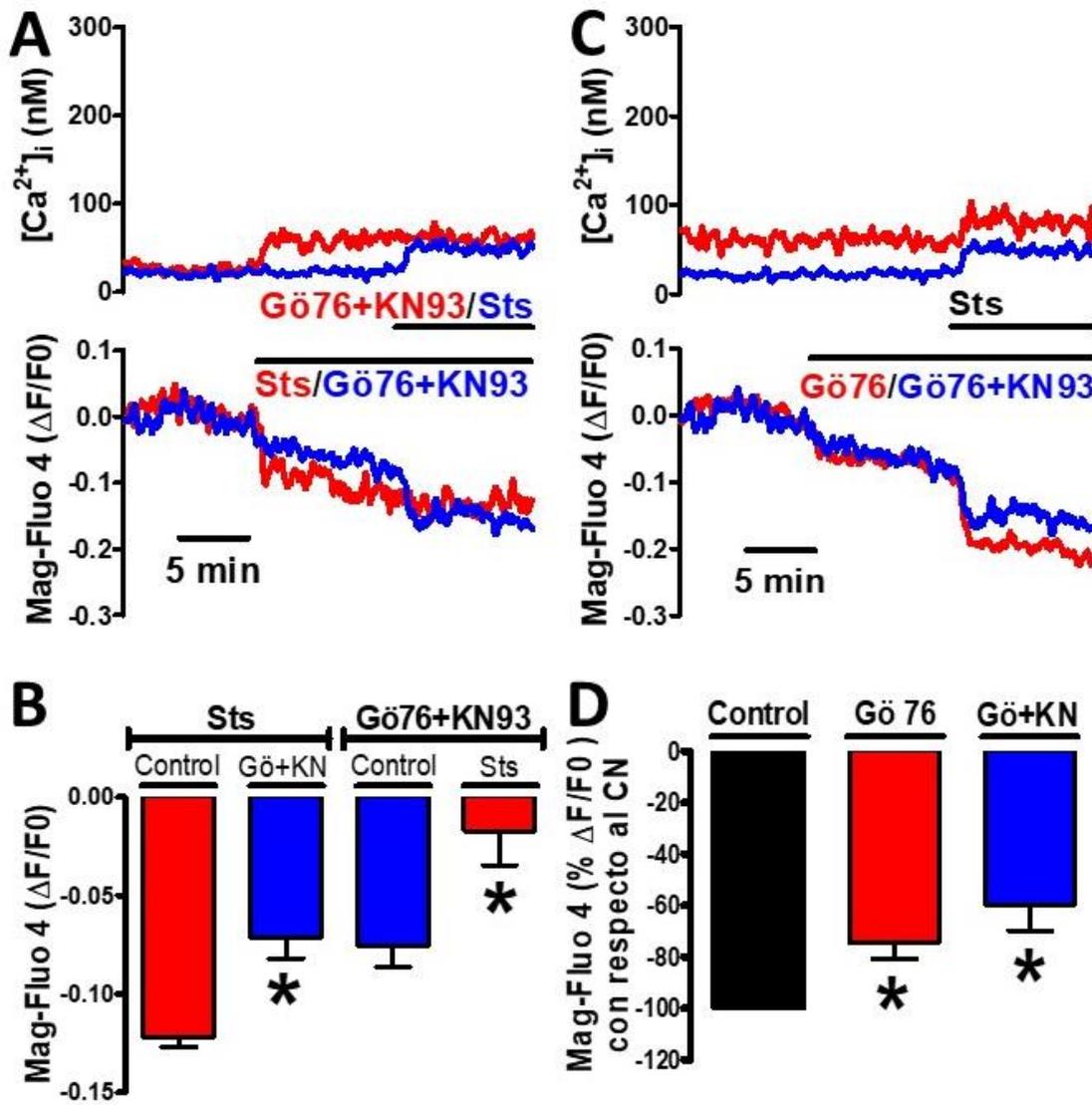
De acuerdo con los datos anteriores, la fuga de  $Ca^{2+}$  luminal inducida por Sts es parcialmente dependiente de PKC y de al menos otra cinasa sensible a Sts. Se ha reportado que la cinasa CaMKII es sensible a Sts, mostrando una  $IC_{50}$  de 20 nM (Yanagihara et al. 1991); para conocer la participación de CaMKII en la fuga de  $Ca^{2+}$  inducida por Sts utilizamos un inhibidor específico para CaMKII, KN93,

en combinación con Gö6976 para eliminar el efecto de la PKC. Al igual que Sts ( $-0.12 \pm 0.005$ , Figura 9.15 A y B; trazo rojo), la combinación de Gö6976 (200 nM) + KN93 (4  $\mu$ M) ocasionó una disminución del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal ( $-0.0754 \pm 0.01$ , Figura 9.15 A y B; trazo azul), con una amplitud parecida a la observada solo con Gö6976 ( $-0.085 \pm 0.009$ , Figura 9.15 C; trazo rojo); además la presencia previa de Sts eliminó el efecto de la combinación de Gö76 + KN93 ( $-0.017 \pm 0.017$ , Figura 9.15 A y B; trazo rojo), mientras que la presencia de Gö76 + KN93 solo redujo en 40% la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por Sts ( $-0.071 \pm 0.01$ , Figura 9.15 A y B; trazo azul). La inhibición observada en el efecto de Sts por Gö76 + KN-93 ( $-60 \pm 10 \%$ , Figura 9.15 D) no es diferente estadísticamente significativa a la observada con Gö6976 ( $-74 \pm 7 \%$ , Figura 9.15 D), por lo que se puede concluir que la inhibición de CaMKII no induce fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico y no participa en el efecto de Sts.

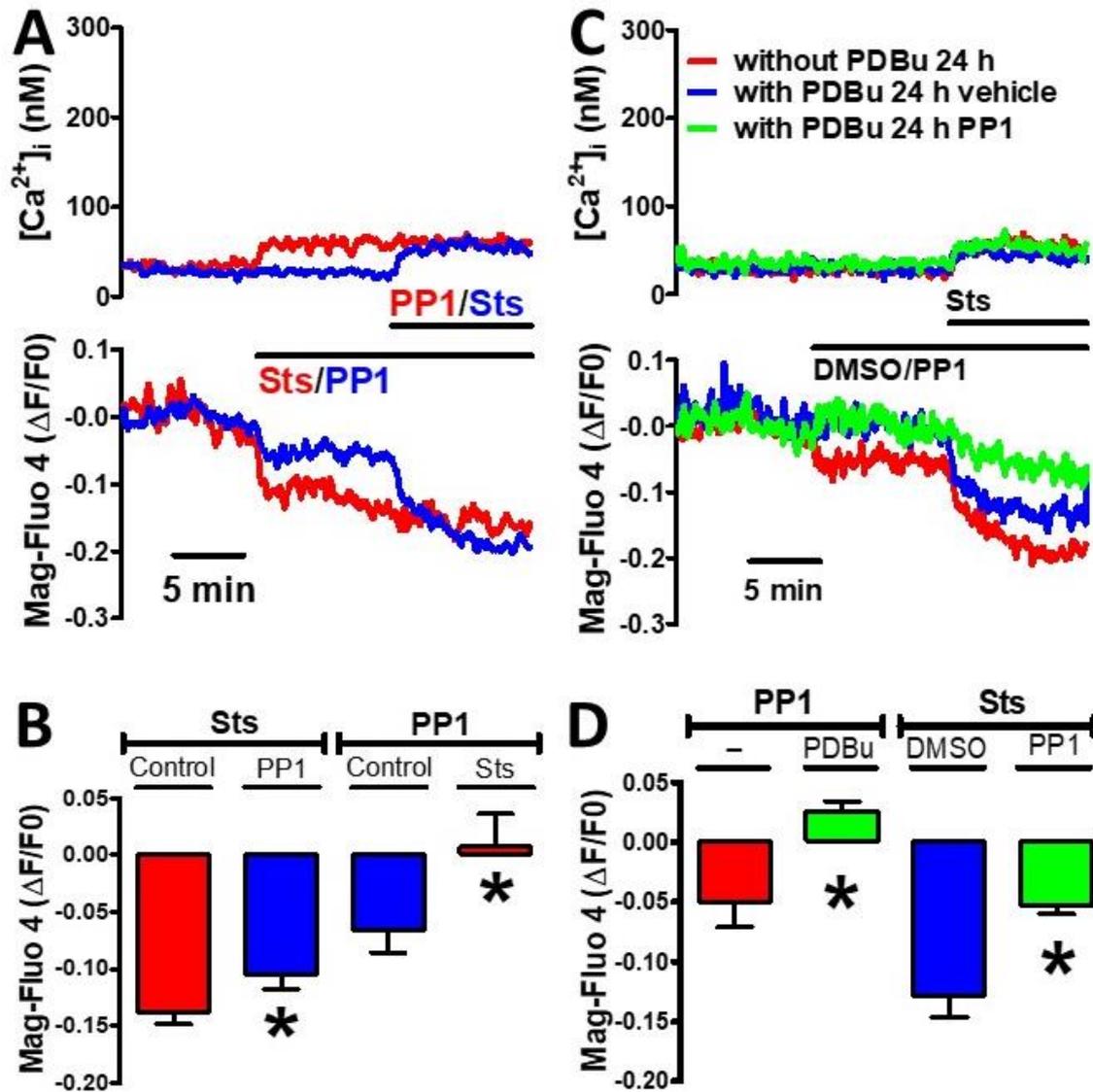
La Sts, al ser un inhibidor generalizado de cinasas, no solo inhibe cinasas de serina/treonina, sino también cinasas de tirosina. La proteína Src es una cinasa de tirosinas que es uno de los blancos de Sts, por lo que evaluamos si participa en el efecto de Sts e induce fuga de  $\text{Ca}^{2+}$ ; para ello utilizamos PP1, un inhibidor específico de Src. La aplicación de 10  $\mu$ M de PP1 ocasionó una reducción en la  $[\text{Ca}^{2+}]$  luminal ( $-0.065 \pm 0.01$ , Figura 9.16 A y B; trazo azul), mostrando una amplitud menor a la observada con Sts ( $-0.13 \pm 0.01$ , Figura 9.16 A y B; trazo rojo), y la presencia previa del inhibidor de Src disminuyó un 23% la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por Sts ( $-0.10 \pm 0.01$ , Figura 9.16 A y B; trazo azul), mientras que Sts previno totalmente el efecto de PP1 ( $0.007 \pm 0.02$ , Figura 9.16 A y B; trazo rojo).

Estos datos sugieren que la cinasa Src tiene una pequeña participación en el efecto de Sts, por lo que nos interesó conocer si la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por Sts pueda tener una mayor participación de la cinasa Src en condiciones de ausencia de PKC. De forma completamente inesperada, encontramos que la *down-regulation* de PKC eliminó el efecto de PP1 en la reducción de  $[\text{Ca}^{2+}]$  luminal ( $0.02 \pm 0.008$ , Figura 9.16 C y D; trazo verde) y además se observó una disminución de aproximadamente 60% en el efecto de Sts ( $-0.053 \pm 0.006$ , Figura 9.16 C y D; trazo verde). Con base en los anteriores resultados, la inhibición de

Src induce una fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  que depende de la presencia de PKC; además la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por Sts es parcialmente dependiente de PKC y Src.



**Figura 9.15** La inhibición de CaMKII no induce ninguna fuga de  $\text{Ca}^{2+}$ . (A) trazo representativo del efecto de Sts y Gö6976+KN-93. (B) análisis estadístico de la amplitud en la reducción del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal provocado por Sts y Gö6976+KN-93. (C) trazo representativo de Sts en presencia de Gö6976 y Gö6976+KN-93. (D) análisis estadístico de la inhibición por Gö6976 y Gö6976+KN-93 en la amplitud de la fuga del  $\text{Ca}^{2+}$  estimulada por Sts. Se hizo una prueba t de student pareada o una ANOVA y una prueba de Kruskal-Wallis para la comparación de múltiples grupos. \*  $p < 0.05$ ,  $n = 4$  y  $5$

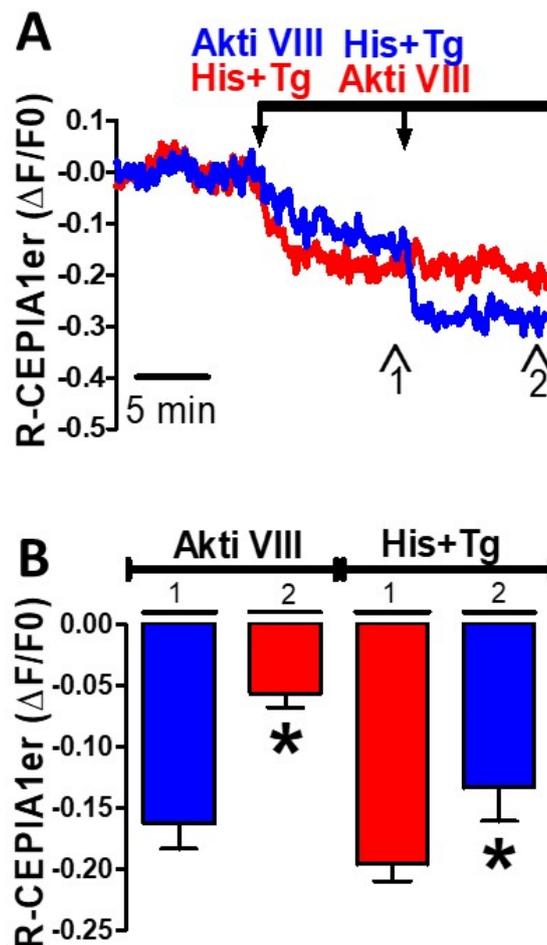


**Figura 9.16** PP1 reduce el efecto de Sts en la concentración de  $Ca^{2+}$  luminal. (A) trazo representativo del efecto de PP1 y Sts. (B) análisis estadístico de la amplitud en la reducción del  $Ca^{2+}$  luminal provocado por Sts y PP1. (C) trazo representativo de PP1 y Sts con PDBu por 24h. (D) análisis estadístico la amplitud en la reducción del  $Ca^{2+}$  luminal inducido por PP1 y Sts en condiciones de *down-regulation* de PKC. Se hizo una prueba t de student pareada. \*  $p < 0.05$ ,  $n = 4$

## 9.7.- El inhibidor de Akt VIII induce fuga de $Ca^{2+}$ del retículo endoplásmico

La Sts, aparte de ser un inhibidor generalizado de cinasas, también es un excelente inductor de muerte celular (Benítez-Rangel et al. 2015); por otro lado, Akt es una cinasa de serina/treonina que participa en varios procesos celulares, entre los que se encuentran la supervivencia y la proliferación celular (Lawlor

and Alessi 2001), además forma parte de la vía de señalización PI3K-Akt. La Sts es capaz de disminuir la actividad de Akt, aunque esto ocurre de forma indirecta, debido a que inhibe a PDK1 (Hill et al. 2001), que es la cinasa río arriba de la vía de PI3K-Akt involucrada en la activación de Akt por fosforilación en el residuo T308. Con base en lo anterior, Akt podría estar involucrado en la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por Sts, por lo que decidimos utilizar un inhibidor específico de Akt (Akti VIII) para evaluar su efecto en la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  (Bain et al. 2007). La principal limitante con este inhibidor es que fue fluorescente a las longitudes de onda utilizadas para Fura-2, Mag-Fluo 4 y erGAP3, por lo que decidimos utilizar R-CEPIA1er, indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  proteico dirigido al retículo endoplásmico, para registrar los cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]$  luminal del retículo endoplásmico. La presencia de  $10 \mu\text{M}$  de Akti VIII redujo los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal ( $-0.16 \pm 0.02$ , Figura 9.17 A y B; trazo azul); además, cuando se vació el retículo endoplásmico con la combinación de His+Tg ( $-0.20 \pm 0.02$ , Figura 9.17 A y B; trazo rojo) redujo el 68%



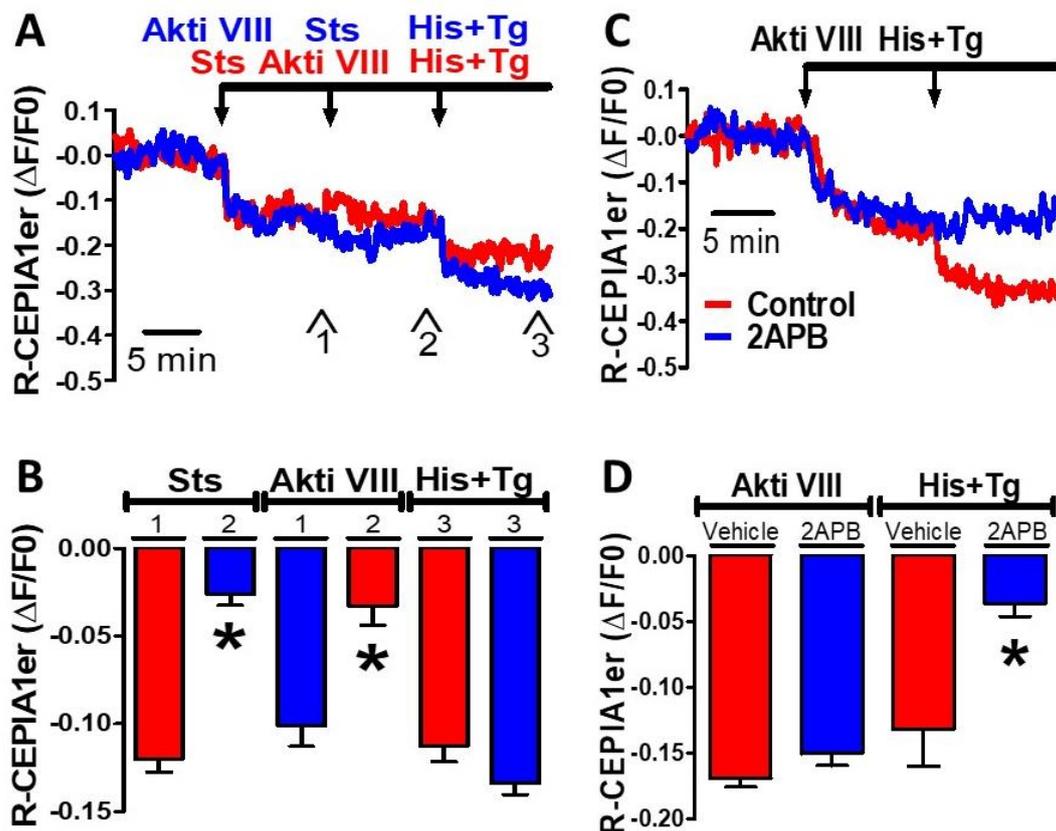
**Figura 9.17** El inhibidor específico de Akt (Akti VIII) induce una fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  similar a la producida por la Sts. (A) trazo representativo del efecto de Akti VIII e His+Tg. (B) análisis estadístico de la amplitud en la reducción del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal provocado por Akti VIII e His+Tg. Se hizo una prueba t de student pareada. \*  $p < 0.05$ ,  $n = 5$

el efecto de Akti VIII ( $-0.05 \pm 0.01$ , Figura 9.17 A y B; trazo rojo); mientras que la presencia del inhibidor de Akt disminuyó el 35% del vaciamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico inducido por His+Tg ( $-0.13 \pm 0.02$ , Figura 9.17 A y B; trazo azul). Estos datos indican que, al igual que Sts, Akti VIII provoca una disminución en la  $[\text{Ca}^{2+}]$  luminal del retículo endoplásmico y su efecto es reducido por la presencia de His+Tg.

### **9.8.- Akt es la otra cinasa involucrada en la fuga de $\text{Ca}^{2+}$ inducida por Sts**

Al igual que Sts, el Akti VIII induce fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal del retículo endoplásmico y se evita con el previo vaciamiento de este depósito, además la presencia de Akti VIII reduce el efecto de His+Tg; por lo anterior decidimos evaluar si el efecto de Akti VIII comparte el mismo mecanismo que la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por Sts. La fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por Akti VIII ( $-0.11 \pm 0.01$ , Figura 9.18 A y B; trazo azul) mostró la misma amplitud que la inducida por Sts ( $-0.12 \pm 0.007$ , Figura 9.18 A y B; trazo rojo); por otra parte, la presencia previa de alguno de los inhibidores eliminó el efecto del siguiente inhibidor, es decir, la presencia previa de Sts eliminó la respuesta de Akti VIII ( $-0.03 \pm 0.01$ , Figura 9.18 A y B; trazo rojo) y también sucedió a la inversa, la presencia de Akti VIII eliminó la respuesta de Sts ( $-0.02 \pm 0.01$ , Figura 9.18 A y B; trazo azul), además, la presencia de ambos inhibidores no eliminó el efecto de His+Tg ( $-0.12 \pm 0.01$ , Figura 9.18 A), estos datos nos sugieren que Akti VIII inducen fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal del retículo endoplásmico por el mismo mecanismo que Sts, ya que la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por ambos inhibidores de cinasas son mutuamente excluyente, indicando que Akt pudiera ser la otra cinasa involucrada en el efecto de Sts.

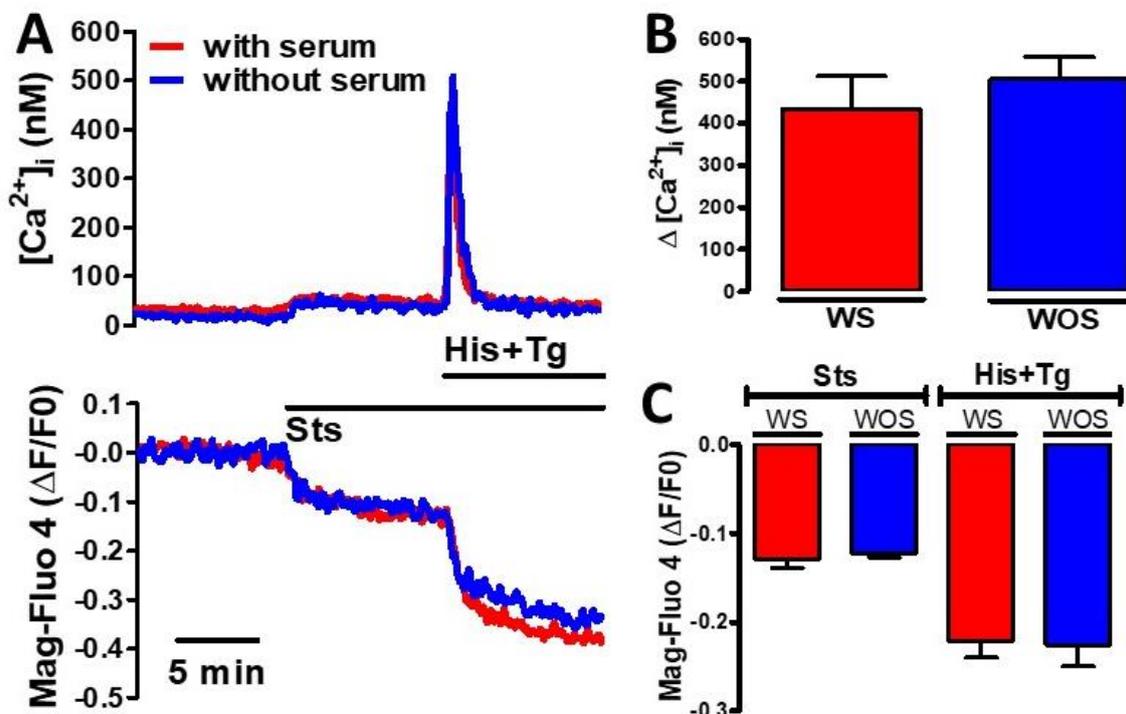
Para demostrar la nula participación del receptor de  $\text{IP}_3$  en la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por Akti VIII utilizamos 2APB; como se esperaba la respuesta de His+Tg ( $-0.13 \pm 0.02$ , Figura 9.18 C y D; trazo rojo) fue reducida un 76% con la incubación de 2-APB ( $-0.03 \pm 0.009$ , Figura 9.18 C y D; trazo azul); por el contrario la respuesta de Akti VIII ( $-0.16 \pm 0.006$ , Figura 9.18 C y D; trazo rojo) no sufrió ningún cambio en presencia del inhibidor del receptor de  $\text{IP}_3$  ( $-0.15 \pm 0.009$ , Figura C y D; trazo azul).



**Figura 9.18** El efecto de la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  debido al inhibidor de Akt es mutuamente excluyente con el efecto de Sts. (A) trazo representativo del efecto de Akti VIII, Sts e His+Tg. (B) análisis estadístico de la amplitud en la reducción del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal provocado por Akti VIII, Sts e His+Tg. (C) trazo representativo de Akti VIII e His+Tg sin/con 2APB. (D) análisis estadístico la amplitud en la reducción del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal inducido por Akti VIII e His+Tg en ausencia o presencia de 2-APB. Se hizo una prueba t de student pareada. \*  $p < 0.05$ ,  $n = 5$

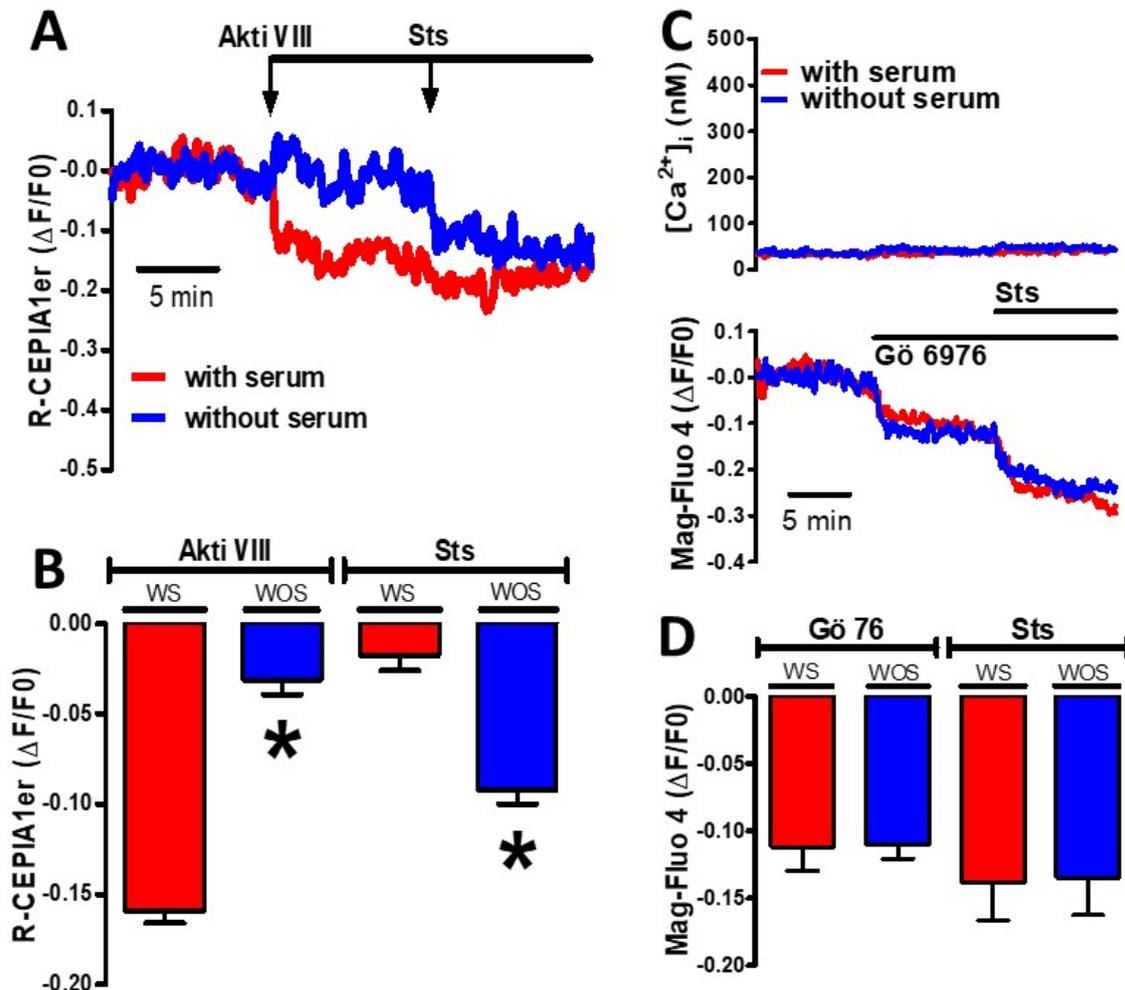
La fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por Sts a través del translocón depende de la actividad de PKC y los datos anteriores indican que Akt es la otra cinasa involucrada; para evaluar la participación de Akt en el efecto de Sts decidimos inhibir su actividad basal utilizando medio libre de suero por 24 h, para evitar que los factores de crecimiento presentes en el suero activen a Akt (deGraffenried et al. 2003; Eves et al. 1998). La fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por Sts ( $-0.12 \pm 0.01$ ), el transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $435 \pm 77$  nM) y vaciamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $-0.22 \pm 0.01$ ) inducidos por His+Tg (Figura 9.18 A-C; trazo rojo) no fueron modificados por la ausencia de suero, es decir tanto en el efecto de Sts ( $-0.12 \pm 0.004$  Figura 9.19 A y C; trazo azul) como en el transitorio  $\text{Ca}^{2+}$  ( $506 \pm 52$  nM Figura 9.19 B) y vaciamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $-0.22 \pm 0.02$  Figura 9.18 A-C; trazo azul) inducidos por His+Tg no se observó ningún cambio significativo en condiciones libres de suero. Estos datos sugieren que la ausencia de Akt activa, por la ausencia de suero por 24 h, es compensada por otra cinasa

en la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por Sts, debido a que el efecto de Sts no se altera en condiciones libres de suero, al igual que se observó previamente con la *down-regulation* de PKC.



**Figura 9.19** La ausencia de suero no tiene ningún efecto en la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por Sts. (A) trazo representativo del efecto de Sts e His+Tg con o sin suero. (B) análisis estadístico del transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  provocado por His+Tg con o sin suero. (C) análisis estadístico de la amplitud en la reducción del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal provocado por Sts e His+Tg con o sin suero. Se hizo una prueba t de student pareada. \*  $p < 0.05$ ,  $n = 5$ . WS=con suero, WOS=sin suero

Para corroborar la idea de que la falta de Akt activa es compensada por alguna otra cinasa en la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por Sts, evaluamos el efecto inhibitorio de Akti VIII en la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  por Sts en condición sin suero por 24 h. Como se observó anteriormente, en la figura 9.18, en presencia de suero la aplicación de Akti VIII redujo la  $[\text{Ca}^{2+}]_{RE}$  ( $-0.16 \pm 0.006$ , Figura 9.20, Figura A y B; trazo rojo) y eliminó el efecto de Sts ( $-0.01 \pm 0.008$ , Figura 9.20 A y B; trazo rojo); por el contrario, la ausencia de suero por 24 h eliminó la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por Akti VIII ( $-0.03 \pm 0.01$ , Figura 9.20 A y B; trazo azul) y se evitó el efecto inhibitorio de Akti VIII en la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por Sts ( $-0.09 \pm 0.007$ , Figura 9.20 A y B; trazo azul); indicando que Akt es una de las cinasas implicadas en el efecto de Sts, aunque en ausencia de Akt activa, en condiciones libres de suero, es compensada por otra cinasa. Nosotros pensamos que PKC podría compensar la



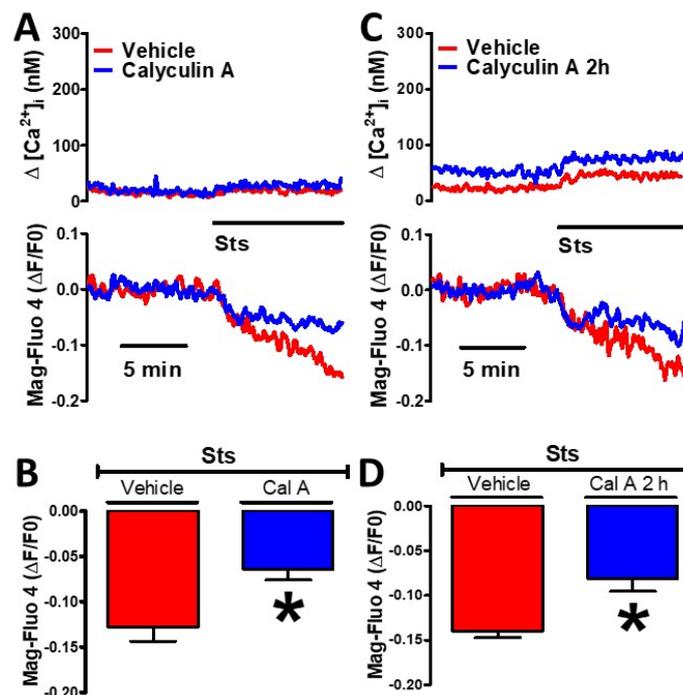
**Figura 9.20** La ausencia de suero elimina el efecto del inhibidor de Akt en la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  (A) trazo representativo del efecto de Akti VIII y Sts con o sin suero. (B) análisis estadístico de la amplitud en la reducción del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal provocado por Akti VIII y Sts con o sin suero. (C) trazo representativo del efecto de Gö6976 y Sts con o sin suero. (D) análisis estadístico de la amplitud en la reducción del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal provocado por Gö6976 y Sts con o sin suero. Se hizo una prueba T student pareada. \*  $p < 0.05$ ,  $n = 5$ . WS=con suero, WOS=sin suero.

inactividad de Akt, y no una tercera cinasa, por lo que evaluamos el efecto y la participación del inhibidor específico de PKC, Gö6976, en la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por Sts en ausencia de suero, como anteriormente se mencionó (Figura 9.14), Gö6976 produce una fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $-0.117 \pm 0.01$  C y D; trazo rojo) que reduce el efecto de Sts ( $-0.138 \pm 0.02$ , Figura 20 C y D trazo rojo), y la ausencia de suero no modificó ninguno de los efectos de Gö6976, ni la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $-0.11 \pm 0.01$ , Figura 9.20; trazo azul), ni el efecto de Sts ( $-0.134 \pm 0.2$ , Figura 9.20 C y D; trazo azul). Por lo anterior la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por Sts depende de inhibir a PKC y Akt, la ausencia de alguna de las dos cinasas, por la *down-regulation* de PKC o la ausencia de suero, es compensada, ya que muestra la participación

de al menos otra cinasa; todos los datos indican que es importante mantener fosforilada una o varias proteínas del complejo Sec61 por la actividad de varias cinasas para evitar la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del translocón.

### 9.9.- La participación de las fosfatasas en la fuga de $\text{Ca}^{2+}$

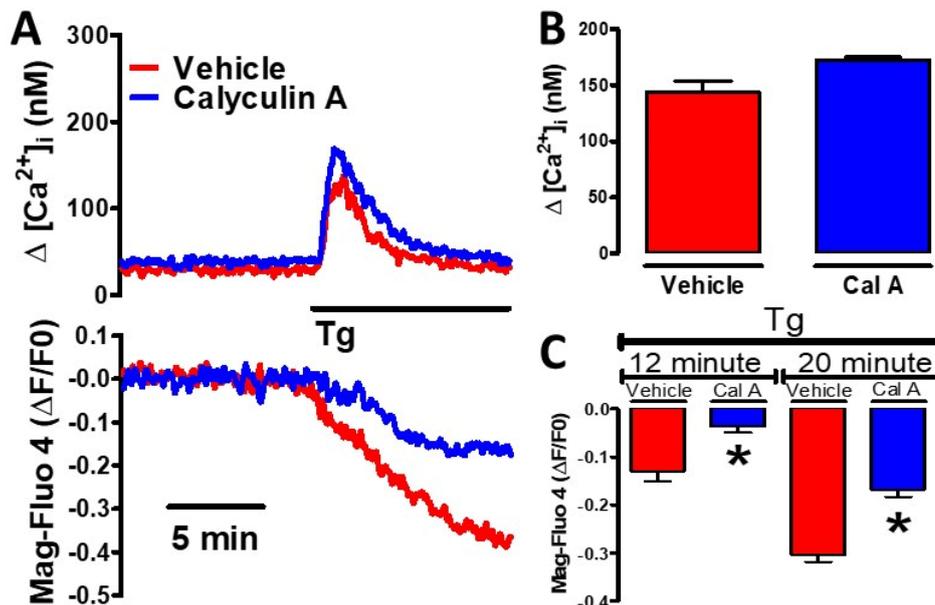
Con los datos anteriores se ha demostrado que la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del translocón está regulada por los niveles de fosforilación del complejo Sec61, y que el nivel de fosforilación dependería de la actividad de al menos dos cinasas, Akt y PKC, en nuestras condiciones de cultivo. Sin embargo, el nivel de fosforilación también depende de la actividad de fosfatasas de serina/treonina. Por lo mismo decidimos evaluar la participación de las fosfatasas PP1 y PP2A en la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por Sts utilizando un inhibidor específico de estas fosfatasas, la caliculina A (Ishihara et al. 1989). La fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por Sts ( $-0.13 \pm 0.01$ , Figura 9.21 A y C; trazo rojo) se redujo en presencia de 100 nM de este inhibidor, en 46% a los 10 min de aplicada la Sts ( $-0.07 \pm 0.1$ , Figura 9.21 A



**Figura 9.21** La inhibición de la fosfatasa con caliculina A reduce parcialmente el efecto de la Sts (A) trazo representativo del efecto de Sts sin o con caliculina A por 10 min. (B) análisis estadístico de la amplitud en la reducción del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal provocado Sts sin o con caliculina A por 10 min. (C) trazo representativo del efecto de Sts sin o con caliculina A por 2 h. (D) análisis estadístico de la amplitud en la reducción del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal provocado por Sts sin o con caliculina A por 2 h. Se hizo una prueba T student pareada. \*  $p < 0.05$ ,  $n = 5$ . Cal A = caliculina A. La caliculina A se adicionó al inicio del registro y se mantuvo durante todo el experimento

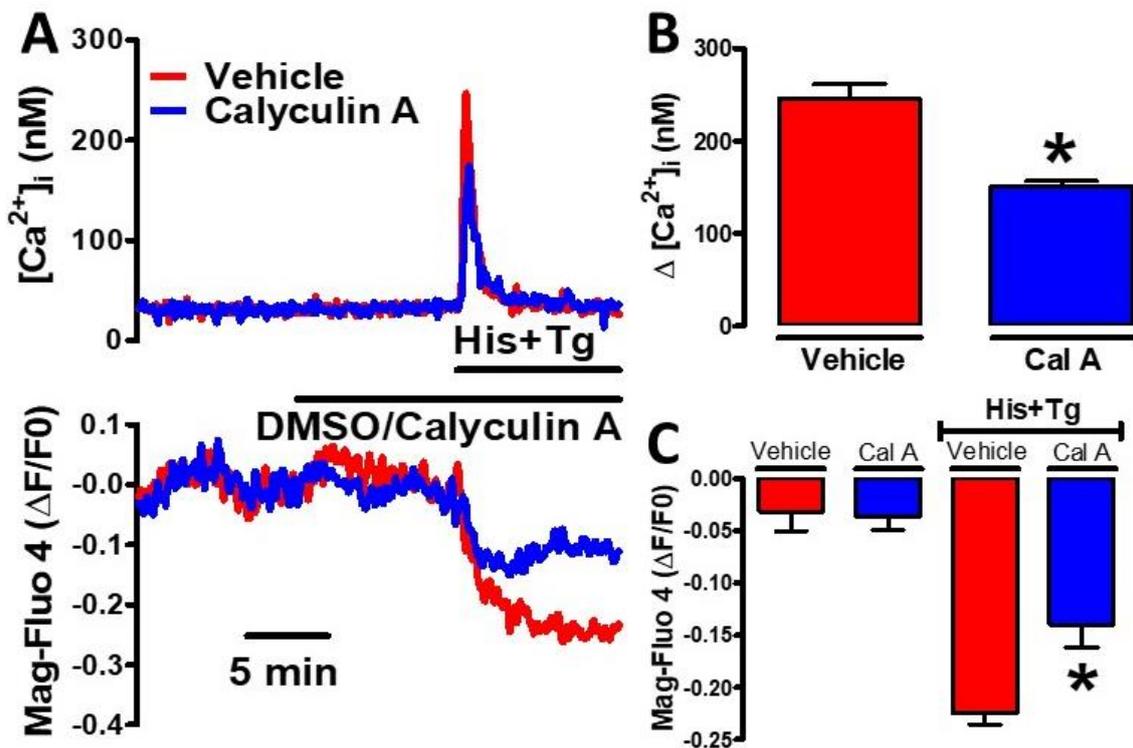
y B; trazo azul); este efecto no se incrementó cuando se prolongó la incubación con caliculina A a 2 h ( $-0.08 \pm 0.01$ , Figura 9.21 C y D; trazo azul).

Los resultados nos indican que la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del translocón está regulada por la actividad de las cinasas Akt y PKC, además de las actividades de las fosfatasa PP1 y PP2A. El translocón es uno de los canales implicados en la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por Tg, por lo que evaluamos la participación de las fosfatasa en el efecto de Tg; el transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por Tg ( $144 \pm 9$  nM, Figura 9.22 A y B; trazo rojo) no se modificó significativamente por la presencia de caliculina A ( $172 \pm 3$  nM, Figura 9.22 A y B; trazo azul). Por el contrario la presencia de caliculina A mostró un efecto similar al de la emetina, es decir, el vaciamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por Tg a los 2 min ( $-0.13 \pm 0.02$ ) y a los 10 min ( $-0.30 \pm 0.1$ , Figura 9.22 A y C; trazo rojo) se redujo ante la incubación de las células con caliculina A, un 77% a los 2 min ( $-0.03 \pm 0.02$ ) y un 47% a los 10 min ( $-0.16 \pm 0.01$ , Figura 9.22 A y C; trazo azul); demostrando una fuerte participación de las fosfatasa en la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por Sts o Tg, posiblemente el efecto observado de caliculina A se deba a la inhibición de la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del translocón.



**Figura 9.22** La inhibición de las fosfatasa con caliculina A reduce la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  reveladas por tapsigargina (A) trazo representativo del efecto de Tg sin o con caliculina A por 10 min. (B) análisis estadístico del transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  provocado por Tg con o sin caliculina A. (C) análisis estadístico de la amplitud en la reducción del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal provocado por Tg sin o con caliculina A a los 12 y 20 min. Se hizo una prueba T student pareada. \*  $p < 0.05$ ,  $n = 5$ . Cal A = caliculina A. La caliculina A se adicionó al inicio del registro y se mantuvo durante todo el experimento

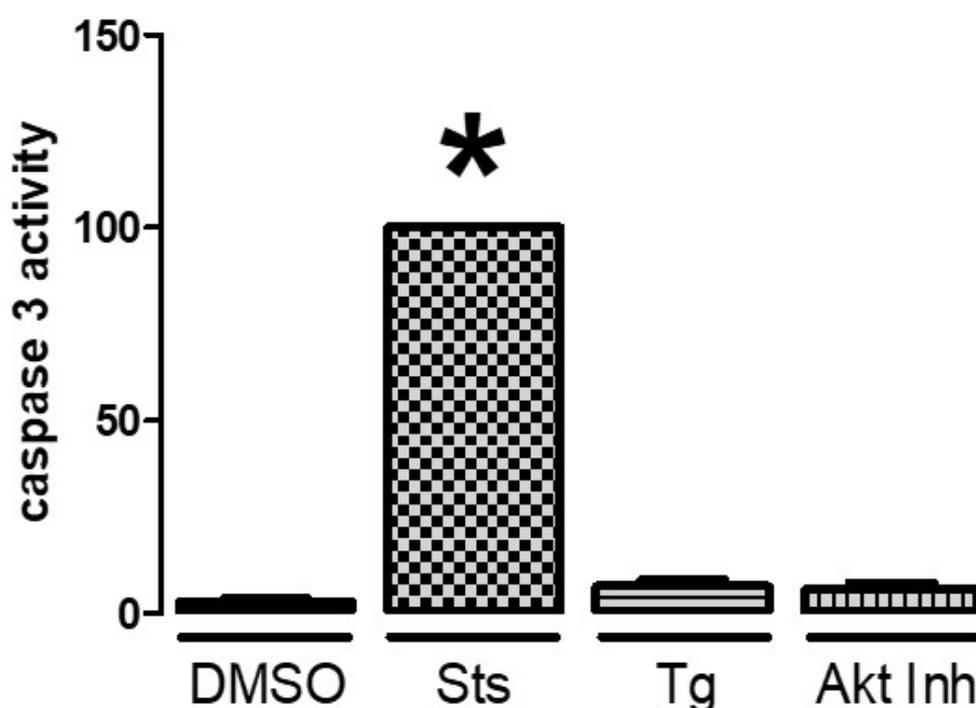
Para determinar si las fosfatasa de serina/treonina afectan la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del receptor  $\text{IP}_3$ , que también es uno de los canales implicados en la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  revelada por Tg, o solo participan en la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por el translocón, decidimos evaluar el efecto de caliculina A en la respuesta de His+Tg. La aplicación de His+Tg ocasionó un incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ( $246 \pm 15$  nM, Figura 9.23 A y B; trazo rojo) y una reducción en el  $\text{Ca}^{2+}$  luminal ( $-0.22 \pm 0.01$ , Figura 9.23 A y C; trazo rojo) y ante la incubación con caliculina A, este estímulo produjo una respuesta de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  disminuida de 39% ( $150 \pm 6$  nM, Figura 9.23 A y B; trazo azul) y de 36% en el vaciamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal ( $-0.14 \pm 0.02$ , Figura 9.23 A y C; trazo azul); por otro lado, la presencia por sí sola de 100 nM de caliculina A no alteró ni la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ni el  $\text{Ca}^{2+}$  luminal. Los resultados indican que la actividad de cinasas y fosfatasa están implicadas en la regulación en la fuga y liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Figura 9.23** La caliculina A inhibe la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por la combinación de histamina más tapsigargina(A) trazo representativo del efecto de His+Tg sin o con caliculina A por 10 min. (B) estadística del transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  provocado por His+Tg con o sin caliculina A. (C) estadística de la amplitud en la reducción del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal provocado por His+Tg sin o con caliculina A. Se hizo una prueba T-student pareada. \*  $p < 0.05$ ,  $n = 5$ . Cal A= caliculina A.

### 9.10.- La fuga de $\text{Ca}^{2+}$ del retículo endoplásmico no incrementa la actividad de la caspasa 3

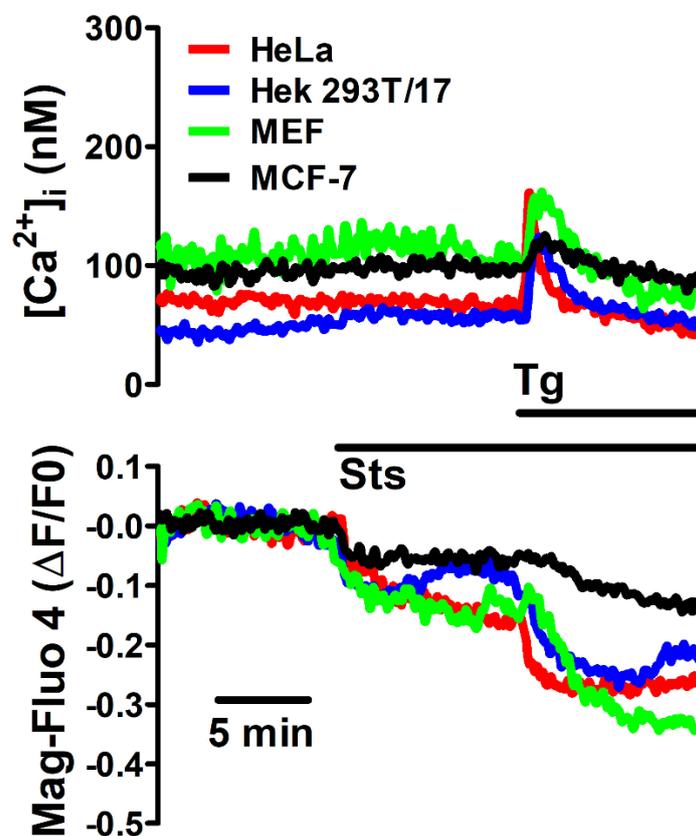
Resultados previos de nuestro laboratorio (Benítez-Rangel et al. 2015) han demostrado que la incubación con Sts por 4 h es suficiente tiempo para incrementar la actividad de la caspasa 3, proteasa asociada con la apoptosis. El efecto proapoptótico de Sts podría deberse a que promueve la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico a través del translocón. Por lo tanto, decidimos estudiar si la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del translocón puede ocasionar la activación de la caspasa 3, por lo que utilizamos diferentes fármacos que ocasionan la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por el translocón, como la Tg y la Akti VIII. Las células se incubaron 4 h ya sea con DMSO, 1  $\mu\text{M}$  de Sts, 100 nM de Tg o con 10  $\mu\text{M}$  de Akti VIII; el único compuesto que incrementó significativamente la actividad de la caspasa 3 fue la Sts, mientras que Tg ( $7 \pm 1.5\%$ ), Akti VIII ( $6 \pm 1.7\%$ ) y DMSO ( $3 \pm 0.6\%$ ) ocasionaron incrementos que no fueron significativos con respecto a DMSO. Estos datos sugieren que la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del translocón no es suficiente para inducir la activación de la caspasa 3, al menos con 4 h de incubación.



**Figura 9.24** La actividad de la caspasa 3 inducida por Sts no pareciera tener un componente que requiera la reducción del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal del retículo endoplásmico. Se realizó una prueba ANOVA y una prueba de Dunnett para la comparación de múltiples grupos  $\cdot p < 0.05$ ,  $n = 5$

### 9.11.- La fuga de $\text{Ca}^{2+}$ inducida por Sts se presenta en otros tipos celulares diferentes a las células HeLa

Por último, decidimos evaluar si la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por Sts a través del translocón es un fenómeno exclusivo de las células HeLa o es un fenómeno que se puede observar en otros tipos celulares, por lo que evaluamos el efecto de añadir 1  $\mu\text{M}$  de Sts en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y el  $\text{Ca}^{2+}$  luminal de diferentes líneas celulares. Las células HeLa fueron las que presentaron la mayor amplitud del efecto de Sts (-0.15, Figura 9.25; trazo rojo), seguida de las células MEF (-0.13, trazo verde), las células HEK-293T/17 (-0.083, trazo azul) y siendo las células MCF-7 (-0.055, trazo negro) las que tuvieron la menor respuesta a la Sts.



**Figura 9.25** La fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por Sts no es exclusiva de las células HeLa, sino que también se puede observar en otros tipos celulares.  $n=1$ .

Todas las líneas celulares estudiadas respondieron a la aplicación de Tg, que se utilizó como control positivo de la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico, aunque con este control, las células MCF-7 también tuvieron la menor respuesta. En conclusión, los datos anteriores sugieren que la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por Sts es

un fenómeno generalizado en los diferentes tipos celulares, aunque la amplitud puede variar.

En conjunto, los datos sugieren que el translocón puede fungir como un canal de fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal del retículo endoplásmico, pero que la fosforilación por al menos PKC y Akt reduce la participación de este canal como vía de fuga de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este mecanismo de inhibición de la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  por el translocón que involucra la actividad de cinasas, no es único, aunque sí el más novedoso. Así, se han descrito varios mecanismos para inhibir el movimiento de  $\text{Ca}^{2+}$  fuera del lumen del retículo, entre los que se encuentran la proteína naciente, el tapón proteico codificado por el mismo translocón, la chaperona BiP, el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina y la proteína Sec 62. El requerimiento de las cinasas PKC y Akt que son redundantes, implica que el complejo Sec61 está fosforilado en reposo, pero no sabemos si la fosforilación es un nuevo mecanismo o simplemente facilita la acción del tapón proteico codificado por la misma proteína o de alguno de los otros mecanismos de inhibición ya descritos.

## 10.- Discusión

La estaurosporina (Sts) es un compuesto derivado de las bacterias gram positivas estreptomices. Este compuesto se consideró inicialmente como un inhibidor potente de la cinasa C de proteínas, y también un excelente inductor de muerte celular (Tamaoki et al. 1986). Posteriormente se descubrió que la Sts en realidad es un inhibidor no selectivo de diferentes cinasas, y que su mecanismo de acción consiste en bloquear el sitio de unión del ATP (Prade et al. 1997).

Trabajos previos en el laboratorio han mostrado que la Sts induce un incremento transitorio de la  $[Ca^{2+}]_i$ ; y que este efecto involucra tanto un aumento en la entrada de calcio a nivel de la membrana plasmática como la liberación de calcio de los depósitos intracelulares (Benítez-Rangel et al. 2011; Benítez-Rangel et al. 2020). Esta tesis versa sobre el mecanismo molecular utilizado por la Sts para inducir la salida de  $Ca^{2+}$  de depósitos intracelulares. La aplicación de la Sts ( $1 \mu M$ ) induce una reducción inmediata de la  $[Ca^{2+}]_{ER}$  sin un incremento significativo de la  $[Ca^{2+}]_i$ , esto ocurre particularmente en la condición de ausencia de  $Ca^{2+}$  externo, una condición que vacía parcialmente los depósitos intracelulares de  $Ca^{2+}$  pero que facilita demostrar la participación de dichos depósitos en la señal de calcio.

El Mag-fluo 4 es un indicador de  $Ca^{2+}$  luminal ampliamente utilizado (Benítez-Rangel et al. 2020; Gallegos-Gómez et al. 2018; Leon-Aparicio et al. 2017b; Rossi and Taylor 2020) que se encuentra en el retículo endoplásmico (Rossi and Taylor 2020), así como en depósitos ácidos, como es el aparato de Golgi (Gallegos-Gómez et al. 2018), o los gránulos de secreción. Sin embargo, la Sts libera  $Ca^{2+}$  del retículo endoplásmico sensible a los agonistas, puesto que el vaciamiento funcional del retículo endoplásmico con la tapsgargina, un inhibidor específico y potente de la bomba de  $Ca^{2+}$  SERCA, resultó en la completa inhibición del efecto de la Sts. Además, el uso de indicadores de calcio codificados y enviados al retículo endoplásmico (er-GAP3 y R-CEPIA1er) mostraron exactamente la misma respuesta ante la adición de Sts que se observó con Mag-fluo 4. En conjunto estos datos nos permiten concluir que la fuente intracelular de  $Ca^{2+}$  que responde a la Sts es el retículo endoplásmico sensible a los agonistas y alimentado por la bomba de  $Ca^{2+}$  SERCA.

Hay una gran variedad de canales permeables al calcio que permiten la salida de este ion del retículo endoplásmico hacia el citoplasma, entre otros, están el RyR, RIP<sub>3</sub>, Orai2 y Orai3, TRPV1, TRPC6 y el translocón o Sec61 $\alpha$  (Lemos et al. 2021; Sammels et al. 2010). El RyR no se expresa en células HeLa, al menos no de forma funcional (Bennett et al. 1996). El uso del 2-APB, un inhibidor de la liberación de Ca<sup>2+</sup> vía el RIP<sub>3</sub> (Peppiatt et al. 2003) y un activador del canal Orai3 (Schindl et al. 2008) nos permitió descartar la participación de estos dos canales.

Por otro lado, el uso de emetina y puromicina, dos inhibidores de la síntesis de proteínas que tienen como blanco el complejo ribosoma-Sec61 $\alpha$  y que tienen efectos opuestos en el nivel de Ca<sup>2+</sup> del RE, puesto que emetina bloquea al translocón, al dejar la cadena nascente de proteína dentro del poro (Amer et al. 2009), mientras que la puromicina, es un liberador de Ca<sup>2+</sup> vía el translocón, puesto que corta la cadena nascente de proteína, pero sin que se desprege el ribosoma, lo cual mantiene el poro de Sec61 $\alpha$  abierto y permeable al Ca<sup>2+</sup>, lo cual induce una reducción de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>ER</sub>. De hecho, la puromicina produjo un vaciamiento mayor que la misma Sts, lo que sugiere que no todos los Sec61 $\alpha$  están fosforilados y por lo tanto son susceptibles a la acción de Sts en ellos. La evidencia farmacológica sugiere que el translocón es el responsable de la salida de Ca<sup>2+</sup> del RE en respuesta a la aplicación de Sts. Además, no pareciera haber otro canal involucrado. Estos datos nos llamaron la atención puesto que el RE presenta una gran variedad de canales permeables al Ca<sup>2+</sup> cuya actividad pudiera estar regulada también por fosforilación.

La cinasa C de proteínas es una familia de cinasas que involucra tres diferentes subfamilias y la Sts es un inhibidor muy potente de esta familia. Por lo tanto, era lógico proponer que la Sts estaba inhibiendo la actividad de la PKC. Con la finalidad de verificar la participación de la PKC, se llevó a cabo el protocolo de disminución funcional de la PKC, en inglés se conoce como *down-regulation*, un proceso que consiste en la activación crónica de la PKC utilizando PDBu, un análogo no metabolizable del DAG que se constituye en un activador sostenido de la PKC (Tovell and Newton 2021). Este proceso de activación crónica de la PKC resulta en la degradación de las PKCs que fueron activadas por PDBu. Las células con una expresión funcional menor de las PKCs mostraron una completa inhibición de la reducción de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>ER</sub> inducida por los inhibidores específicos

de PKC (Gö 6976); sin, embargo la reducción de la  $[Ca^{2+}]_{ER}$  inducida por la Sts fue idéntica en las células que no fueron sometidas a la *down-regulation* de la cinasa. Estos datos podrían sugerir que la PKC no participa en el efecto de Sts en la reducción de la  $[Ca^{2+}]_{ER}$ . Sin embargo, otra explicación sería que habría redundancia, es decir que además de la PKC habría otras cinasas involucradas que reemplazan a la PKC cuando esta cinasa está faltando, de tal forma que, si falla la PKC, habría cinasas que la reemplazan y así evitan que Sec61 $\alpha$  incremente su fuga de  $Ca^{2+}$  y por ende el riesgo de tener un depósito semivacío que pudiera disparar la respuesta de estrés del retículo y por último desencadenar la muerte celular.

Ya que los procesos bioquímicos muestran redundancia, se decidió buscar otras cinasas que pudieran estar involucradas, de las cinasas que se exploraron, hubo dos candidatos que fueron muy interesantes. Uno fue la cinasa Src y la otra fue la Akt. La cinasa Src se descartó cuando se observó que el efecto del inhibidor de Src en la reducción de la  $[Ca^{2+}]_{ER}$  se evita utilizando células donde la actividad de la PKC se redujo por la incubación con PDBu. Es importante recalcar que PP1 (10  $\mu$ M) tiene un efecto menor en la actividad de la PKC $\alpha$  (Bain et al. 2003), lo que sugiere que PP1 inhibiendo directamente a la PKC no es la explicación de esta observación. Estos datos sugieren que hay una interrelación entre PKC y Src que ya no se exploró con la debida profundidad, pero que se podrá explorar en el futuro cuando se tenga una mejor imagen del o de los residuos de aminoácidos fosforilados y responsables de mantener al translocón en baja actividad iónica. El caso de la Akt resultó ser mucho más relevante. El inhibidor específico de la Akt tuvo un efecto similar a la Sts y además fueron mutuamente excluyentes, sugiriendo que ambos inhibidores liberan el mismo  $Ca^{2+}$  del RE. Lo inesperado fue observar que la Sts redujo la  $[Ca^{2+}]_{ER}$ , igual que en la condición control, en aquellas células donde la expresión funcional de la PKC y de Akt se redujeron de forma simultánea por incubar con PDBu y por cultivar en ausencia de suero por 24 horas.

Estos datos sugieren que habría una tercera cinasa, que ya no fue identificada en el presente trabajo, que estaría reemplazando la desaparición funcional tanto de la PKC como de la Akt. Debido a que se descartó un efecto inespecífico de la Sts en las células HeLa, podemos decir que efectivamente la fosforilación del

translocón es un mecanismo redundante para evitar la actividad de fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  del translocón. De hecho, en la literatura están descritos diferentes mecanismos moleculares para evitar la actividad de fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  del translocón. Estos son el tapón intramolecular, la proteína Bip y la calmodulina (Lang et al. 2017). La idea es que estos tres mecanismos moleculares no son mutuamente excluyentes, ya que se asocian con diferentes regiones del translocón (Lang et al. 2017). La existencia de todos estos diferentes mecanismos que evitan la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  por el translocón, sugiere que la célula debe evitar a toda costa la actividad de fuga del translocón puesto que resultaría en un déficit energético continuo debido a que la bomba SERCA estaría trabajando en contra de una fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  exagerada.

Si la fosforilación de las proteínas involucradas en la formación del translocón fuera un mecanismo importante para evitar su actividad de fuga de  $\text{Ca}^{2+}$ , entonces debería haber reportes de que dichas proteínas están fosforiladas en condiciones de reposo. Efectivamente, el sitio en internet llamado phosphosite plus (<https://www.phosphosite.org/homeAction.action>) tiene documentados y curados diferentes trabajos de fosfoproteómica que demuestran que todas las proteínas involucradas en el translocón, es decir Sec61  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , Sec62 y Sec63 son fosfoproteínas que han sido identificadas como tales por diferentes laboratorios de proteómica del mundo. Así tenemos que Sec61 $\alpha$  tiene 11 diferentes aminoácidos fosforilados, Sec61 $\beta$  tiene 16 aminoácidos fosforilados, a pesar de que es una proteína mucho menor de tamaño, de sólo 96 aa, mientras que Sec61 $\alpha$  tiene 476 aminoácidos. Sec61 $\gamma$  tiene sólo un aminoácido que se ha reportado que está fosforilado. Sec 62 tiene 22 diferentes fosfoaminoácidos y la treonina 375 tiene 127 reportes, lo cual sugiere que es un aminoácido que está fosforilado en todas las condiciones experimentales que se han explorado. Sec63 tiene 23 fosfoaminoácidos.

Todos estos datos sugieren que efectivamente las proteínas que forman el translocón están fosforiladas de forma constitutiva. Además, el sitio que analiza la presencia de secuencias consenso de fosforilación (GPS, <http://gps.biocuckoo.cn/index.php>) arroja que la proteína Sec61 $\alpha$  tiene sitios consenso de alto umbral tanto para la PKC como la Akt. Estos datos en su conjunto sugieren que efectivamente estas proteínas están fosforiladas en

reposo y que muy probablemente por la PKC y también por la Akt. Sobre lo anterior, la treonina 407 y la serina 408, que se localizan en el asa citosólica 8/9 (L8/9) de la proteína Sec61 $\alpha$  tienen 8 y 15 reportes de fosfoproteómica, lo que sugiere que están fosforilados en reposo. Estos dos aminoácidos pueden ser fosforilados, según el programa GPS y utilizando un umbral alto, por diferentes tipos de cinasas como son la Akt1, la Akt3 y también la PKC $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$  además de otras cinasas como ROCK2, GRK1, GRK3, GRK7 y de GSK3. Estos datos sugieren que este par de aminoácidos son blancos de múltiples cinasas, lo cual pudiera explicar que la combinación de inhibidores de Akt y de PKC no haya sido suficiente para explicar el papel de la fosforilación del translocón en la fuga de Ca<sup>2+</sup> del retículo endoplásmico. Sin embargo, toda esta información está a nivel de exploración bioinformática y no se ha corroborado de forma bioquímica. Por lo que se requiere de un estudio de fosfoproteómica del translocón en presencia y ausencia de Sts para reducir los posibles candidatos y explorar la importancia de los residuos fosforilados en la actividad de fuga de Ca<sup>2+</sup> del translocón.

Ya se ha logrado, utilizando crio-microscopía electrónica, determinar la estructura tridimensional del translocón en asociación con el ribosoma tanto en forma no activa como en forma de síntesis de proteína (Gemmer and Förster 2020). Estos datos de la estructura tridimensional de asociación entre Sec61 $\alpha$  y el ribosoma también podrían utilizarse como una forma de disminuir el número de candidatos de fosfoaminoácidos al identificar aquellos fosfoaminoácidos de Sec61 $\alpha$  que están en contacto con el ribosoma. Estas imágenes han mostrado que el ribosoma interacciona con dos asas citoplásmicas del translocón, éstas serían las que se encuentran entre los pases transmembranales 6 y 7 (L6/7) y 8 y 9 (L8/9). Cada una de las asas presentan una arginina que son críticas para la interacción con el ribosoma, y particularmente la mutación R406E en L8/9 del translocón de la levadura produce una inhibición completa de la interacción entre el translocón y el ribosoma (Mandon et al. 2018). El papel de estas argininas está conservado en otras especies, incluida el translocón de humano. Lo que se ha mencionado aplica para la translocación funcionando cotraduccionalmente. Sin embargo, el translocón también puede mover proteínas ya sintetizadas y se conoce como translocación postraduccional, en este caso la proteína Sec63 es la que hace contacto con la L6/7 del translocón y se considera que esta

interacción evita la conformación de fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  del translocón (Itskanov et al. 2021). El asa citoplásmica L8/9 contiene los aminoácidos T407 y S408 que están frecuentemente fosforilados, según los datos de fosfoproteómica reportados en el sitio Phosphosite plus.

Se han descrito diferentes mecanismos moleculares para inhibir la actividad de fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  del translocón, estos son el tapón intraproteico, la proteína BiP, Sec62 y la calmodulina. Los datos reportados en esta tesis sugieren que la fosforilación de alguna de las proteínas del translocón también constituye un mecanismo para evitar la actividad de fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  del translocón. Si este mecanismo de inhibición funciona de forma independiente a los otros tres o si modula la función de alguno de los mecanismos ya descritos, se desconoce al momento, pero es un punto importante por explorar y así entender cómo es que la fosforilación resulta en una reducción de la actividad de fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  del translocón.

En resumen, este trabajo nos permitió descubrir que la fosforilación, por al menos dos cinasas, la PKC y Akt, tiene un papel importante en evitar la actividad de fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  del translocón que se expresa en el retículo endoplásmico.

## 11.- Conclusiones

- ❖ Inhibidores de cinasas como la Sts, el Gö6976, Gö6983, el PP1 y el Akti VIII estimulan la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico sin incrementar de forma global la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .
- ❖ Tres diferentes indicadores de calcio luminal (Mag-fluo 4, erGAP3 y R-CEPIA1er) mostraron la misma respuesta a la Sts a pesar de tener diferentes afinidades por el ion calcio.
- ❖ El canal del retículo endoplásmico activado por los inhibidores de cinasas es el translocón o Sec61 $\alpha$  ya que emetina elimina por completo la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por los inhibidores de cinasas.
- ❖ La activación en reposo de la PKC explica sólo parcialmente el efecto de Sts en la reducción del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal.
- ❖ La activación de la Akt por los factores de crecimiento presentes en el suero adicionado al medio de cultivo celular explica sólo parcialmente el efecto de Sts en la reducción de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal.
- ❖ A pesar de que el Akti VIII y Sts reducen al mismo nivel el  $\text{Ca}^{2+}$  luminal y aunque son mutuamente excluyentes, la suma de Akt y PKC no son suficientes para explicar el efecto de Sts, sugiriendo la participación de una tercera cinasa de naturaleza desconocida.
- ❖ El inhibidor PP1 de la cinasa de tirosina Src reduce el  $\text{Ca}^{2+}$  luminal tanto como los inhibidores específicos de PKC y de forma inesperada, este efecto depende de la presencia de PKC lo que sugiere que hay una vía PKC-Src. En ausencia de PKC, el PP1 inhibe fuertemente el efecto de Sts, no así cuando la PKC está presente, esto sugiere una interrelación compleja entre PKC y Src en la regulación de la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico
- ❖ La inhibición de las fosfatasas PP1 y PP2A con caliculina A tuvo un efecto mayor en la fuga de calcio inducida por Tg que en la inducida por Sts.
- ❖ La fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por Sts no juega un papel importante en la activación de la caspasa-3 por este inhibidor generalizado de cinasas que es un inductor muy eficaz de apoptosis.

- ❖ La Sts fue capaz de reducir el  $\text{Ca}^{2+}$  luminal en otros tipos celulares diferentes a las células HeLa como son las HEK, las MEF y las MCF-7, lo que sugiere que este fenómeno de regulación por fosforilación de la fuga de calcio a través del translocón es generalizado.
- ❖ El translocón puede fungir como un canal de fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal del retículo endoplásmico pero la fosforilación, por al menos PKC y Akt, reduce la participación de este canal como vía de fuga de  $\text{Ca}^{2+}$ .

## 12.- Perspectivas

- ❖ Conocer la proteína blanco de Sts que está involucradas en la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del translocón.
- ❖ Determinar si se requiere una tercera cinasa para explicar el efecto de Sts.
- ❖ Determinar cuál es la tercera cinasa involucrada en el efecto de Sts.
- ❖ Determinar que fosfatasas están involucradas en el efecto de Sts
- ❖ Investigar la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  por activar al translocón Sec61 en líneas celulares con alta demanda de síntesis de proteínas.
- ❖ Investigar qué papel juega la fuga de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del translocón en UPR.

### 13.- Apéndice.

En este trabajo se utilizaron tres diferentes indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal, estos fueron el Mag-fluo-4, el erGAP3 y el R-Cepia1er. El primero es un indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  de baja selectividad (tricarboxílico en vez de tetracarboxílico, como es el caso del Fura-2) que al ser sintético no tiene un mecanismo de retención en el RE y por lo mismo llega al aparato de Golgi y el resto del aparato secretor de la célula (Gallegos-Gómez et al. 2018; Rossi and Taylor 2020). El erGAP3 es un indicador de  $\text{Ca}^{2+}$  de baja afinidad constituido por apo-aecuatorina, como la sección responsable de unir  $\text{Ca}^{2+}$  y por una proteína verde fluorescente, responsable de la señal de fluorescencia, lo novedoso de este indicador se debe a que el  $\text{Ca}^{2+}$  produce un corrimiento del espectro de excitación a longitudes de onda mayor, por lo cual es un indicador de cociente. Esto hace que sea más fácil de calibrar junto con el hecho de que tiene un coeficiente de Hill igual a 1. Además, es más confiable por qué no tiene artefactos por pH, ni magnesio. Al ser una proteína se le añadió un péptido señal de la calreticulina para dirigir su ingreso al RE y también un péptido en el carboxilo terminal, KDEL, de retención en el RE y evitar su ingreso al aparato de Golgi (Navas-Navarro et al. 2016; Rodriguez-Garcia et al. 2014). El R-Cepia1er se utilizó debido a que Akti VIII es fluorescente en la región de erGAP3 y de Mag-fluo-4. Este indicador se deriva de GCAMP y consiste en una calmodulina modificada junto con el péptido M13 de la cinasa MLCK, que funcionan para unir  $\text{Ca}^{2+}$  y una proteína roja fluorescente permutada circularmente de tal forma que es un indicador que response con un incremento de fluorescencia a la unión con  $\text{Ca}^{2+}$ , también tiene péptido señal y péptido de retención en el RE. Es de baja afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  con un coeficiente de Hill mayor a 1 (1.7), lo que reduce su ventana de sensibilidad (Suzuki et al. 2014).

La afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  de estos tres indicadores es diferente, el Mag-fluo 4 tiene una  $K_d$  de 22  $\mu\text{M}$  y un coeficiente de Hill de 1 (Rossi and Taylor 2020), el erGAP3 tiene una  $K_d$  de 489  $\mu\text{M}$  y un coeficiente de Hill de 0.9 (Navas-Navarro et al. 2016) y el R-Cepia1er tiene una  $K_d$  de 565  $\mu\text{M}$  y un coeficiente de Hill de 1.7 (Suzuki et al. 2014). Estos datos son importantes porqué las respuestas a una misma reducción de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal deberían de ser diferentes debido a sus

diferentes afinidades por  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, los tres indicadores tuvieron exactamente la misma respuesta a la aplicación de Sts seguida de histamina con Tg en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo. Esto se puede observar en la figura 13.1 que muestra el mismo nivel de reducción del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal para los tres diferentes indicadores cuando se empalman los tres registros de los diferentes indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal.

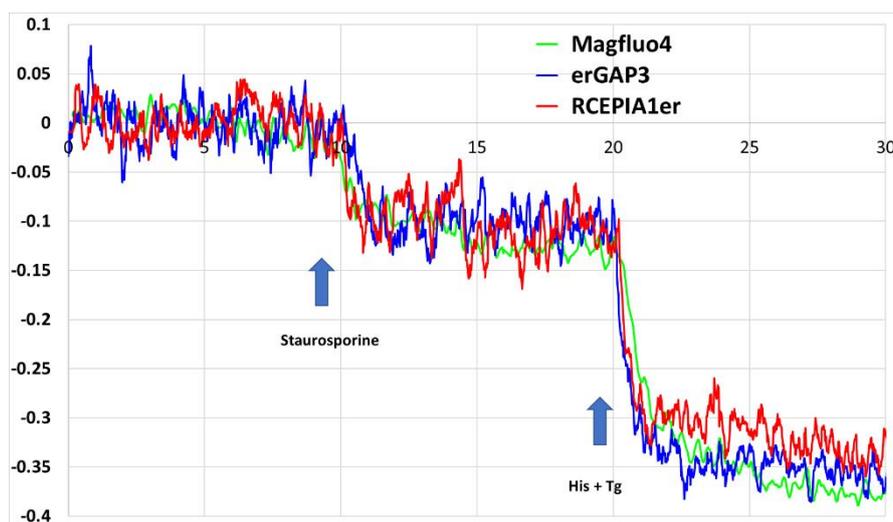


Figura 13.1. Curso temporal de la reducción del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal inducido por Sts e His y Tg en células HeLa con tres diferentes indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal. Las células HeLa se cargaron con Mag-fluo-4 (trazo verde), con erGAP3 (trazo azul) y con R-CEPIA1er (trazo rojo) y a los 10 minutos se añadió 1 mM de Sts y a los 20 min se añadió la combinación de His y Tg. El eje de la ordenada muestra el  $\text{DF}/\text{Fo}$  ó  $\text{DR}/\text{Ro}$  para el caso específico de erGAP3. El eje de las abscisas muestra el tiempo de registro en minutos.

Los datos crudos sugieren que los tres indicadores tienen una  $K_d$  similar dentro del RE, esta situación es poco factible puesto que los indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$  son de naturalezas muy diferentes: un ácido tricarbóxico, la apo-acuorina y la calmodulina. Si la  $K_d$  no es la misma entonces sugiere que los cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$  varía según el tipo de indicador utilizado. Lo cual tampoco es creíble. Los datos de  $\Delta F/\text{Fo}$  se pueden transformar a  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$  sabiendo la  $K_d$  y la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$  inicial o basal. Esta última se puede tomar del trabajo de Suzuki, que reportó una  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$  basal de alrededor de  $800 \mu\text{M}$  (aunque la distribución no es del tipo normal) en células HeLa (Suzuki et al. 2014). Y utilizando la siguiente fórmula:

$$[Ca] = \sqrt[n]{\frac{(\Delta \times Kd^n \times Ca_o^n)}{(Ca_o^n + Kd^n - \Delta \times Ca_o^n)}}$$

Donde  $\Delta$  es la fracción F/Fo (para Mag-fluo 4 y para R-Cepia1er) o R/Ro (para erGAP3). El valor de  $[Ca^{2+}]$  basal sería 800  $\mu$ M y los valores de Kd y el coeficiente de Hill (n) están indicados en la figura 13.2. Se tiene que considerar que F/Fo en realidad es (F-Fmin)/(Fo-Fmin) esto debido a que ningún indicador de calcio pierde totalmente su fluorescencia en ausencia de  $Ca^{2+}$ , de tal forma que es necesario restar dicho fondo mediante determinar el valor de Fmin cuando el colorante está en el interior del retículo endoplásmico. El valor de Fmin en principio es muy sencillo, ya que representa la fluorescencia de indicador de calcio en ausencia de  $Ca^{2+}$  unido al mismo. En la practica es bastante difícil definirlo, puesto que se puede hacer con una combinación de agonista activador del  $RIP_3$ , Tg para inhibir a la bomba SERCA y la ausencia de calcio externo. La otra estrategia sería utilizar un ionóforo de calcio como la ionomicina en ausencia de  $Ca^{2+}$  externo para producir un completo vaciamiento del retículo endoplásmico. Estas dos estrategias deberían resultar en el mismo valor, sin embargo, parece que no todo el retículo endoplásmico se puede vaciar por activar al  $RIP_3$  y además hay regiones del retículo resistentes al inhibidor de la bomba SERCA. Todo lo anterior hace difícil definir la Fmin. Sin embargo, sin este valor se estaría obteniendo una subestimación de los cambios en la  $[Ca^{2+}]_{ER}$

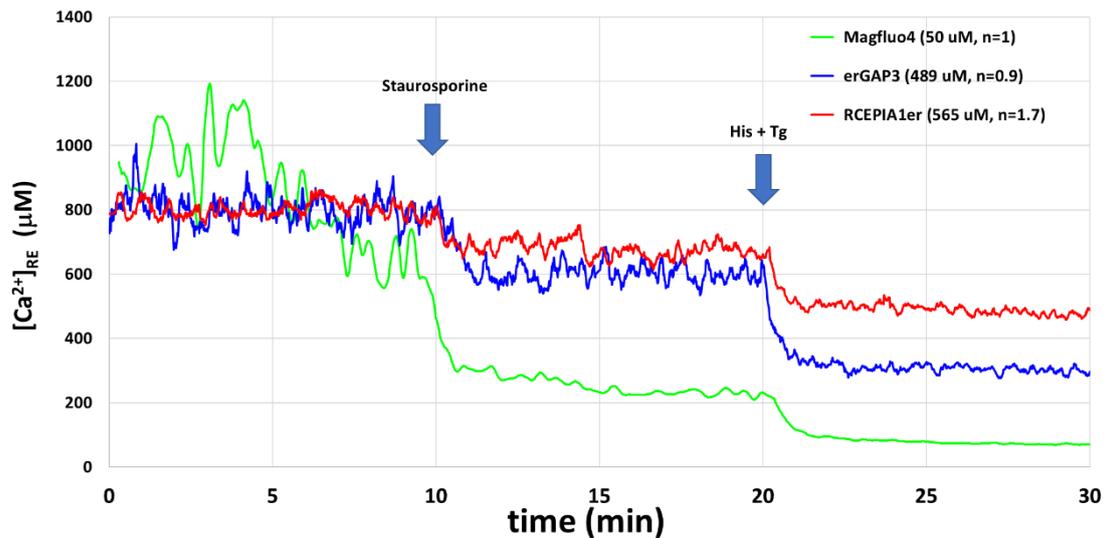


Figura 13.2. La transformación de  $\Delta F/F_0$  a  $[Ca^{2+}]_{RE}$  utilizando las Kds y coeficientes de Hill reportados generan una imagen muy diferente dependiendo de cada uno de los indicadores. En el caso del Mag-fluo-4 la Kd de 22  $\mu M$  no se pudo utilizar porque en reposo el indicador está prácticamente saturado y por lo tanto se obtiene una alta variabilidad en la  $a[Ca^{2+}]_{RE}$ . Además, Mag-fluo-4 sugiere un completo vaciamiento con Sts, mientras casi nada de vaciamiento usando R-CEPIA1er.

La transformación de los datos de  $\Delta F/F_0$  a  $[Ca^{2+}]_{RE}$  nos produce escenarios muy diferentes para cada indicador. Sugiere que el Mag-fluo-4 está saturado en reposo, por eso la Kd que usamos fue 50  $\mu M$  en vez de 22  $\mu M$  que es la reportada en la literatura, y que la Sts reduce la  $[Ca^{2+}]_{RE}$  casi completamente, de 800  $\mu M$  a 200  $\mu M$  y por lo tanto el efecto de His más Tg es mínimo, de tan solo 100  $\mu M$ ; mientras que con R-CEPIA1er el escenario es muy diferente, puesto que la Sts reduce la  $[Ca^{2+}]_{RE}$  de 800 a 700  $\mu M$  y la His y Tg lo reduce de 700 a 500  $\mu M$ , pero muy lejos del completo vaciamiento que se espera con la combinación de His y Tg. Llama la atención que la combinación de His y Tg no produzcan el completo vaciamiento del RE y esto nos sugiere que es mejor utilizar estos indicadores de  $Ca^{2+}$  luminal de forma cualitativa y no de forma cuantitativa, puesto que no hay coincidencia en los valores obtenidos.

## 14. Bibliografía

- Amer, M. S et al. 2009. "Translocon Closure to Ca<sup>2+</sup> Leak in Proliferating Vascular Smooth Muscle Cells." *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 296(4): H910–16.  
<http://ajpheart.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpheart.00984.2008>.
- Amer, Mohamed S et al. 2009. " Translocon Closure to Ca 2+ Leak in Proliferating Vascular Smooth Muscle Cells ." *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 296(4): H910–16.
- Ampofo, Emmanuel et al. 2013. "Biochimica et Biophysica Acta CK2 Phosphorylation of Human Sec63 Regulates Its Interaction with Sec62." *BBA - General Subjects* 1830(4): 2938–45.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.12.020>.
- Angosto, María Cascales, Académica De Número, De Real, and Academia Nacional. 2003. "Bases Moleculares de La Apoptosis." *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* 69.
- Antal, Corina E. et al. 2015. "Cancer-Associated Protein Kinase C Mutations Reveal Kinase's Role as Tumor Suppressor." *Cell* 160(3): 489–502.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.001>.
- Ascher-landsberg, Jessica, Trevania Saunders, Michal Elovitz, and Mark Phillippe. 1999. "The Effects of 2-Aminoethoxydiphenyl Borate , a Novel Inositol 1 , 4 , 5-Trisphosphate Receptor Modulator on Myometrial Contractions." 982: 979–82.
- Baffi, Timothy R et al. 2021. "MTORC2 Controls the Activity of PKC and Akt by Phosphorylating a Conserved TOR Interaction Motif." *Science signaling* 14: 1–20.
- Bain, Jenny et al. 2007. "The Selectivity of Protein Kinase Inhibitors: A Further Update." *Biochemical Journal* 408(3): 297–315.  
<http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20070797>.
- Bain, Jenny, Hilary McLauchlan, Matthew Elliott, and Philip Cohen. 2003. "The Specificities of Protein Kinase Inhibitors: An Update." *Biochemical Journal*

371(1): 199–204.

Bandara, Samuel, Seth Malmersjö, and Tobias Meyer. 2013. “Regulators of Calcium Homeostasis Identified by Inference of Kinetic Model Parameters from Live Single Cells Perturbed by SiRNA.” *Science Signaling* 6(283): ra56–64.

Bascones, A, MA González-Moles, and V Garcia. 2005. “Bases Moleculares Del Cáncer Oral . Revisión Bibliográfica.” *avances en odontostomatología* 21(16): 287–95.

Benítez-Rangel, E. et al. 2011. “Ion Channel Inhibitors Block Caspase Activation by Mechanisms Other than Restoring Intracellular Potassium Concentration.” *Cell Death and Disease* 2(1): e113–21.

Benítez-Rangel, E., Mc López-Méndez, L. García, and A. Guerrero-Hernández. 2015. “DIDS (4,4'-Diisothiocyanatostilbene-2,2'-Disulfonate) Directly Inhibits Caspase Activity in HeLa Cell Lysates.” *Cell Death Discovery* 1(1): 1–9.

Benítez-Rangel, Edaena et al. 2020. “Caspase-3 Activation Correlates With the Initial Mitochondrial Membrane Depolarization in Neonatal Cerebellar Granule Neurons.” *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8: 544.

Bennett, Deborah L et al. 1996. “Expression and Function of Ryanodine Receptors in Nonexcitable Cells.” 271(11): 6356–62.

Berridge, Michael J, Martin D Bootman, and H Llewelyn Roderick. 2003. “Calcium Signalling: Dynamics, Homeostasis and Remodelling.” *Nature reviews. Molecular cell biology* 4(7): 517–29.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12838335> (July 16, 2014).

Bidaux, G. et al. 2005. “Evidence for Specific TRPM8 Expression in Human Prostate Secretory Epithelial Cells: Functional Androgen Receptor Requirement.” *Endocrine-Related Cancer* 12(2): 367–82.

Bidaux, Gabriel et al. 2007. “Prostate Cell Differentiation Status Determines Transient Receptor Potential Melastatin Member 8 Channel Subcellular Localization and Function.” *Journal of Clinical Investigation* 117(6): 1647–

57.

- Brunkan, A. L., and A. M. Goate. 2005. "Presenilin Function and  $\gamma$ -Secretase Activity." *Journal of Neurochemistry* 93(4): 769–92.
- Building, Howard. 1997. "The Pharmacology of Ryanodine and Related." *pharmacological reviews* 49(1).
- Cai, Chuanxi et al. 2006. "The Presenilin-2 Loop Peptide Perturbs Intracellular  $Ca^{2+}$  homeostasis and Accelerates Apoptosis." *Journal of Biological Chemistry* 281(24): 16649–55.
- Carafoli, Ernesto, and Marisa Brini. 2000. "Calcium Pumps : Structural Basis for and Mechanism of Calcium Transmembrane Transport." *chemical biology* 4: 152–61.
- Carman, George M., and Gil-Soo Han. 2009. "Phosphatidic Acid Phosphatase, a Key Enzyme in the Regulation of Lipid Synthesis." *Journal of Biological Chemistry* 284(5): 2593–97.  
<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.R800059200>.
- Cheung, King-ho et al. 2010. "Gain-of-Function Enhancement of IP 3 Receptor Modal Gating by Familial Alzheimer ' s Disease – Linked Presenilin Mutants in Human Cells and Mouse Neurons." 3(114): 1–11.
- Cheung, King Ho et al. 2008. "Mechanism of  $Ca^{2+}$  Disruption in Alzheimer's Disease by Presenilin Regulation of InsP3Receptor Channel Gating." *Neuron* 58(6): 871–83.
- Chevet, Eric et al. 2001. "The Endoplasmic Reticulum: Integration of Protein Folding, Quality Control, Signaling and Degradation." *Current Opinion in Structural Biology* 11(1): 120–24.
- Clapham, David E. 1995. "Calcium Signaling Review." *cell* 80: 259–68.
- . 2007. "Calcium Signaling." *Cell* 131(6): 1047–58.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18083096> (July 11, 2014).
- Comella, J X et al. 2015. "Bases Moleculares de La Apoptosis Celular y Su Relación Con La Patología Renal." *Nefrologia* XIX: 21–28.

- Van Coppenolle, F. 2004. "Ribosome-Translocon Complex Mediates Calcium Leakage from Endoplasmic Reticulum Stores." *Journal of Cell Science* 117(18): 4135–42. <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.01274>.
- Coronado-Parra M. et al. 2013. "Señalización Celular: PKC y Cáncer." *Eubacteria* 32: 1–7.  
[http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4527647&orden=428944&info=link%5Cnhttps://digitum.um.es/xmlui/bitstream/10201/37396/1/pkc\\_cancer.pdf](http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4527647&orden=428944&info=link%5Cnhttps://digitum.um.es/xmlui/bitstream/10201/37396/1/pkc_cancer.pdf).
- Crib, Alastair E., Mathieu Peyrou, Shanmugam Muruganandan, and Laetitia Schneider. 2005. "The Endoplasmic Reticulum in Xenobiotic Toxicity." *Drug Metabolism Reviews* 37(3): 405–42.
- deGraffenried, L. A. et al. 2003. "Eicosapentaenoic Acid Restores Tamoxifen Sensitivity in Breast Cancer Cells with High Akt Activity." *Annals of Oncology* 14(7): 1051–56.
- Denks, Kärt et al. 2014. "The Sec Translocon Mediated Protein Transport in Prokaryotes and Eukaryotes." *Molecular membrane biology* 31(2–3): 58–84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24762201> (October 30, 2015).
- Dickson, E. J. et al. 2012. "Orai-STIM-Mediated Ca<sup>2+</sup> Release from Secretory Granules Revealed by a Targeted Ca<sup>2+</sup> and PH Probe." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(51): E3539–48.  
<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1218247109>.
- Eun, Su Yong et al. 2001. "Effects of Capsaicin on Ca<sup>2+</sup> release from the Intracellular Ca<sup>2+</sup> stores in the Dorsal Root Ganglion Cells of Adult Rats." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 285(5): 1114–20.
- Eves, EM M et al. 1998. "Akt, a Target of Phosphatidylinositol 3-Kinase, Inhibits Apoptosis in a Differentiating Neuronal Cell Line." *... and Cellular Biology* 18(4): 2143. <http://mcb.asm.org/content/18/4/2143.short>.
- Fill, Michael, and Julio A Copello. 2002. "Ryanodine Receptor Calcium Release Channels." *Physiological Reviews* 82: 893–922.
- Flourakis, Matthieu et al. 2006. "Passive Calcium Leak via Translocon Is a First

Step for IPLA 2 -Pathway Regulated Store Operated Channels Activation .”  
*The FASEB Journal* 20(8): 1215–17.

Frank Erdmann, Nico Schauble, Sven Lang, Martin Jung, Alf Honigmann, Mazen Ahmad, Johanna Dudek, Julia Benedix, Anke Harsman, Annika Kopp, Volkhard Helms, Adolfo Cavalie, Richard Wagner and Richard Zimmermann. 2011. “Interaction of Calmodulin with Sec61a Limits Ca<sup>2+</sup> Leakage from the Endoplasmic Reticulum.” *The EMBO journal* 30(1): 17–31.

Gallego-Sandín, Sonia, Arancha Rodríguez-García, María Teresa Alonso, and Javier García-Sancho. 2009. “The Endoplasmic Reticulum of Dorsal Root Ganglion Neurons Contains Functional TRPV1 Channels.” *Journal of Biological Chemistry* 284(47): 32591–601.

Gallegos-Gómez, Martín-Leonardo et al. 2018. “The Trans Golgi Region Is a Labile Intracellular Ca<sup>2+</sup> Store Sensitive to Emetine.” *Scientific Reports* (May): 1–13.

Gavva, N. R. et al. 2007. “The Vanilloid Receptor TRPV1 Is Tonically Activated In Vivo and Involved in Body Temperature Regulation.” *Journal of Neuroscience* 27(13): 3366–74.  
<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.4833-06.2007>.

Gemmer, Max, and Friedrich Förster. 2020. “A Clearer Picture of the ER Translocon Complex.” *Journal of Cell Science* 133(3).

Gia K. Voeltz, Melissa M. Rolls & Tom A. Rapoport. 2002. “Structural Organization of the Endoplasmic Reticulum.” *EMBO Reports* 3(10): 994–950. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1958334>.

Giunti, Roberta et al. 2007. “Both Translocon and a Cation Channel Are Involved in the Passive Ca<sup>2+</sup> leak from the Endoplasmic Reticulum: A Mechanistic Study on Rat Liver Microsomes.” *Archives of Biochemistry and Biophysics* 462(1): 115–21.

Greiner, Markus et al. 2011. “Sec62 Protein Level Is Crucial for the ER Stress Tolerance of Prostate Cancer.” *1083*(November 2010): 1074–83.

- Gruss, Oliver J., Peter Feick, Rainer Frank, and Bernhard Dobberstein. 1999. "Phosphorylation of Components of the ER Translocation Site." *European Journal of Biochemistry* 260(3): 785–93.
- Guerrero-Hernandez, Agustin, Adan Dagnino-Acosta, Alexei Verkhratsky, and Et Al. 2010. "An Intelligent Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Store: Release and Leak Channels Have Differential Access to a Concealed Ca<sup>2+</sup> Pool." *Cell calcium* 48(2–3): 143–49. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20817294> (October 30, 2015).
- Gwack, Yousang et al. 2007. "Biochemical and Functional Characterization of Orai Proteins." *Journal of Biological Chemistry* 282(22): 16232–43.
- H. Ishihara, B. L. Martin, D. L. Brauting, H. Karaki, H. Ozaki, Y. Kato, N. Fusetani, S. Watabe, K. Hashimoto, D. Uemura and D. J. Hartshorne. 1989. "Calyculin A and Okadaic Acid: Inhibitors of Protein Phosphatase Activity." *Biochemical and biophysical Research communications* 159(3): 871–77.
- Hammadi, Mehdi et al. 2013. "Modulation of ER Stress and Apoptosis by Endoplasmic Reticulum Calcium Leak via Translocon during Unfolded Protein Response: Involvement of GRP78." *FASEB Journal* 27(4): 1600–1609.
- Hampton, Randolph Y, and Thomas Sommer. 2012. "Finding the Will and the Way of ERAD Substrate Retrotranslocation." *Current Opinion in Cell Biology* 24(4): 460–66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2012.05.010>.
- Hanada, Masahito, Jianhua Feng, and Brian A Hemmings. 2004. "Structure, Regulation and Function of PKB / AKT — a Major Therapeutic Target." *1697*: 3–16.
- Haßdenteufel, Sarah, Marie-christine Klein, Armin Melnyk, and Richard Zimmermann. 2014. "Protein Transport into the Human ER and Related Diseases .," *biochemistry and cell biology* 509(April): 499–509.
- Hayrapetyan, Volodya, Volodymyr Rybalchenko, Nataliya Rybalchenko, and Peter Koulen. 2008. "The N-Terminus of Presenilin-2 Increases Single Channel Activity of Brain Ryanodine Receptors through Direct Protein-

- Protein Interaction." *Cell Calcium* 44(5): 507–18.
- Heritage, Dorothy, and William F. Wonderlin. 2001. "Translocon Pores in the Endoplasmic Reticulum Are Permeable to a Neutral, Polar Molecule." *Journal of Biological Chemistry* 276(25): 22655–62.
- Hill, Michelle M. et al. 2001. "Insulin-Stimulated Protein Kinase B Phosphorylation on Ser-473 Is Independent of Its Activity and Occurs through a Staurosporine-Insensitive Kinase." *Journal of Biological Chemistry* 276(28): 25643–46.
- Himpens, B., H. De Smedt, and R. Casteels. 1993. "Staurosporine Induced Ca<sup>2+</sup> Increase in DDT1MF-2 Smooth Muscle Cells." *American journal of physiology. Cell physiology* 33(3): C544–51.
- Honarnejad, Kamran, and Jochen Herms. 2012. "Presenilins: Role in Calcium Homeostasis." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 44(11): 1983–86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2012.07.019>.
- Huang, Honggang et al. 2016. "Simultaneous Enrichment of Cysteine-Containing Peptides and Phosphopeptides Using a Cysteine-Specific Phosphonate Adaptable Tag (CysPAT) in Combination with Titanium Dioxide (TiO<sub>2</sub>) Chromatography." *Molecular & Cellular Proteomics* 15(10): 3282–96. <http://www.mcponline.org/lookup/doi/10.1074/mcp.M115.054551>.
- Ikeya, Miho et al. 2014. "Orai-2 Is Localized on Secretory Granules and Regulates Antigen-Evoked Ca<sup>2+</sup> Mobilization and Exocytosis in Mast Cells." *Biochemical and biophysical research communications* 451(1): 62–67. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25044118> (October 30, 2015).
- Itskanov, Samuel, Katie M. Kuo, James C. Gumbart, and Eunyong Park. 2021. "Stepwise Gating of the Sec61 Protein-Conducting Channel by Sec63 and Sec62." *Nature Structural and Molecular Biology* 28: 162–72.
- Itskanov, Samuel, and Eunyong Park. 2019. "Structure of the Posttranslational Sec Protein-Translocation Channel Complex from Yeast." *Science* 363: 84–87.
- Jairaman, Amit, and Murali Prakriya. 2013. "Molecular Pharmacology of Store-

- Operated CRAC Channels.” *Landes Bioscience* (October): 402–14.
- Johnson, Arthur E, and Michael A Van Waes. 1999. “THE TRANSLOCON: A Dynamic Gateway at the ER Membrane.” *Annual Review of Cell and Developmental Biology*: 799–842.
- Joseph, Suresh K. 1996. “The Inositol Triphosphate Receptor Family.” *cellular signalling* 8(1): 1–7.
- Kárai, László J., James T. Russell, Michael J. Iadarola, and Zoltan Oláh. 2004. “Vanilloid Receptor 1 Regulates Multiple Calcium Compartments and Contributes to Ca<sup>2+</sup>-Induced Ca<sup>2+</sup> Release in Sensory Neurons.” *Journal of Biological Chemistry* 279(16): 16377–87.
- Kim, Y.J. et al. 2002. “Staurosporine Mobilizes Ca<sup>2+</sup> from Secretory Granules by Inhibiting Protein Kinase C in Rat Submandibular Acinar Cells.” *Journal of Dental Research* 81(11): 788–93.  
<http://jdr.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/154405910208101113>.
- Lang, Sven, Frank Erdmann, et al. 2011. “Sec61 Complexes Form Ubiquitous ER Ca<sup>2+</sup> Leak Channels.” *Channels* 5(3): 228–35.  
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/chan.5.3.15314> (October 30, 2015).
- Lang, Sven et al. 2017. “An Update on Sec 61 Channel Functions, Mechanisms, and Related Diseases.” *Frontiers in Physiology*.
- Lang, Sven, Nico Schäuble, Adolfo Cavalié, and Richard Zimmermann. 2011. “Live Cell Calcium Imaging Combined with SiRNA Mediated Gene Silencing Identifies Ca Leak Channels in the ER Membrane and Their Regulatory Mechanisms.” (July): 1–7.
- Lawlor, Margaret A, and Dario R Alessi. 2001. “PKB / Akt : A Key Mediator of Cell Proliferation , Survival and Insulin Responses ?”
- Lemos, Fernanda O., Geert Bultynck, and Jan B. Parys. 2021. “A Comprehensive Overview of the Complex World of the Endo- and Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-Leak Channels.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1868(7): 119020.

- Leon-Aparicio, Daniel et al. 2017. "Orai3 Channel Is the 2-APB-Induced Endoplasmic Reticulum Calcium Leak." *Cell Calcium* 65: 91–101. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2017.01.012>.
- Leon-Aparicio, Daniel, Jesus Chavez-Reyes, and Agustin Guerrero-Hernandez. 2017a. "Activation of Endoplasmic Reticulum Calcium Leak by 2-APB Depends on the Luminal Calcium Concentration." *Cell Calcium* 65: 80–90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2017.01.013>.
- . 2017b. "Activation of Endoplasmic Reticulum Calcium Leak by 2-APB Depends on the Luminal Calcium Concentration." *Cell Calcium* 65: 80–90.
- Li, Weikai et al. 2007. "The Plug Domain of the SecY Protein Stabilizes the Closed State of the Translocation Channel and Maintains a Membrane Seal." *Molecular Cell* 26(4): 511–21.
- Liao, Maofu, Erhu Cao, David Julius, and Yifan Cheng. 2013. "Structure of the TRPV1 Ion Channel Determined by Electron Cryo-Microscopy." *Nature* 504(7478): 107–12. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12822>.
- Linxweiler, Maximilian et al. 2013. "Targeting Cell Migration and the Endoplasmic Reticulum Stress Response with Calmodulin Antagonists: A Clinically Tested Small Molecule Phenocopy of SEC62 Gene Silencing in Human Tumor Cells." *BMC Cancer* 13(1): 574–88.
- Liu, Min et al. 2003. "Versatile Regulation of Cytosolic Ca<sup>2+</sup> by Vanilloid Receptor I in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons." *Journal of Biological Chemistry* 278(7): 5462–72. <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M209111200>.
- Lizák, Beáta et al. 2006. "Translocon Pores in the Endoplasmic Reticulum Are Permeable to Small Anions." *American journal of physiology. Cell physiology* 291(3): C511-7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16611737>.
- Lizák, Beáta, Miklós Csala, Angelo Benedetti, and Gábor Bánhegyi. 2008. "The Translocon and the Non-Specific Transport of Small Molecules in the Endoplasmic Reticulum (Review)." *Molecular membrane biology* 25(2): 95–101. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18307097> (October 30, 2015).

- Lomax, Richard B. et al. 2002. "Basal and Physiological Ca<sup>2+</sup> Leak from the Endoplasmic Reticulum of Pancreatic Acinar Cells. Second Messenger-Activated Channels and Translocons." *Journal of Biological Chemistry* 277(29): 26479–85.
- Lotteau, Sabine et al. 2013. "Characterization of Functional TRPV1 Channels in the Sarcoplasmic Reticulum of Mouse Skeletal Muscle." *PLoS ONE* 8(3).
- Mandon, Elisabet C., Cameron Butova, Amber Lachapelle, and Reid Gilmore. 2018. "Conserved Motifs on the Cytoplasmic Face of the Protein Translocation Channel Are Critical for the Transition between Resting and Active Conformations." *Journal of Biological Chemistry* 293(35): 13662–72.
- Marshall, Ian C B et al. 2003. "Activation of Vanilloid Receptor 1 by Resiniferatoxin Mobilizes Calcium from Inositol 1,4,5-Trisphosphate-Sensitive Stores." *British Journal of Pharmacology* 138(1): 172–76.
- Martiny-Baron, G. et al. 1993. "Selective Inhibition of Protein Kinase C Isozymes by the Indolocarbazole Go 6976." *Journal of Biological Chemistry* 268(13): 9194–97.
- Maruyama, Takayuki, Toshiya Kanaji, Shinji Nakade, and Tomio Kanno. 1997. "Modulator of Ins ( 1 , 4 , 5 ) P 3 -Induced Ca 2 + Release." 505: 498–505.
- McKemy, David D. 2005. "How Cold Is It? TRPM8 and TRPA1 in the Molecular Logic of Cold Sensation." *Molecular Pain* 1: 1–7.
- Meggio, Flavio et al. 1995. "Different Susceptibility of Protein Kinases to Staurosporine Inhibition." *European Journal of Biochemistry* 234(1): 317–22. [http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.317\\_c.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.317_c.x).
- Mertins, Philipp et al. 2013. "Integrated Proteomic Analysis of Post-Translational Modifications by Serial Enrichment." *Nature Methods* 10(7): 634–37.
- Meusser, Birgit, Christian Hirsch, Ernst Jarosch, and Thomas Sommer. 2005. "ERAD : The Long Road to Destruction." 7(8).
- Montero, Mayte et al. 2003. "Modulation of Histamine-Induced Ca<sup>2+</sup> Release by Protein Kinase C: Effects on Cytosolic and Mitochondrial [Ca<sup>2+</sup>] PEAKS." *Journal of Biological Chemistry* 278(50): 49972–79.

- Muik, Martin, Rainer Schindl, Marc Fahrner, and Christoph Romanin. 2012. "Ca(2+) Release-Activated Ca(2+) (CRAC) Current, Structure, and Function." *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69(24): 4163–76. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3505497&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (October 30, 2015).
- Navas-Navarro, Paloma et al. 2016. "GFP-Aequorin Protein Sensor for Ex Vivo and in Vivo Imaging of Ca<sup>2+</sup>Dynamics in High-Ca<sup>2+</sup>Organelles." *Cell Chemical Biology* 23(6): 738–45.
- Nelson, Omar et al. 2007. "Familial Alzheimer Disease-Linked Mutations Specifically Disrupt Ca<sup>2+</sup> Leak Function of Presenilin 1." *Journal of Clinical Investigation* 117(5): 1230–39.
- Nelson, Omar, Charlene Supnet, Huarui Liu, and Ilya Bezprozvanny. 2010. "Familial Alzheimer's Disease Mutations in Presenilins: Effects on Endoplasmic Reticulum Calcium Homeostasis and Correlation with Clinical Phenotypes." *Journal of Alzheimer's Disease* 21(3): 781–93.
- Newton, Alexandra C. 2018. "Protein Kinase C as a Tumor Suppressor." *Seminars in Cancer Biology* 48(May 2017): 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.04.017>.
- Nicolier, Magali et al. 2009. "Spatiotemporal Activation of Caspase-Dependent and -Independent Pathways in Staurosporine-Induced Apoptosis of P53wt and P53mt Human Cervical Carcinoma Cells." *Biology of the Cell* 101(8): 455–67. <http://doi.wiley.com/10.1042/BC20080164>.
- Olah, Zoltan et al. 2001. "Ligand-Induced Dynamic Membrane Changes and Cell Deletion Conferred by Vanilloid Receptor 1." *Journal of Biological Chemistry* 276(14): 11021–30.
- Olah, Zoltan, Laszlo Karai, and Michael J. Iadarola. 2002. "Protein Kinase C $\alpha$  Is Required for Vanilloid Receptor 1 Activation: Evidence for Multiple Signaling Pathways." *Journal of Biological Chemistry* 277(38): 35752–59.
- Omura, Satoshi, Yasuharu Sasaki, Yuzuru Iwai, and Hideo Takeshima. 1995. "Staurosporine , a Potentially Important Gift from a Microorganism." *The Journal of Antibiotics* 48(7): 535–48.

- Ong, Hwei L. et al. 2007. "Intracellular Ca<sup>2+</sup> release via the ER Translocon Activates Store-Operated Calcium Entry." *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 453(6): 797–808.
- Ozawa, Terutaka. 2010. "Modulation of Ryanodine Receptor Ca<sup>2+</sup> Channels (Review)." *Molecular Medicine Reports*: 199–204.
- Parys, Jan B. 2014. "The IP<sub>3</sub> Receptor as a Hub for Bcl-2 Family Proteins in Cell Death Control and Beyond." *Science signaling* 7(312): pe4.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24518292> (October 30, 2015).
- Peppiatt, Claire M. et al. 2003. "2-Aminoethoxydiphenyl Borate (2-APB) Antagonises Inositol 1,4,5-Trisphosphate-Induced Calcium Release, Inhibits Calcium Pumps and Has a Use-Dependent and Slowly Reversible Action on Store-Operated Calcium Entry Channels." *Cell Calcium* 34(1): 97–108.
- Periasamy, M, and S Huke. 2001. "SERCA Pump Level Is a Critical Determinant of Ca<sup>2+</sup> Homeostasis and Cardiac Contractility." *Journal of molecular and cellular cardiology* 33(6): 1053–63.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11444913> (October 30, 2015).
- Periasamy, Muthu, and Anuradha Kalyanasundaram. 2007. "SERCA Pump Isoforms: Their Role in Calcium Transport and Disease." *Muscle & nerve* 35(4): 430–42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17286271> (August 30, 2015).
- Pfeffer, Stefan et al. 2015. "Structure of the Native Sec61 Protein-Conducting Channel." *Nature Communications* 6: 8403–10.
- Pfeffer, Stefan, Johanna Dudek, Richard Zimmermann, and Friedrich Förster. 2016. "Organization of the Native Ribosome–Translocon Complex at the Mammalian Endoplasmic Reticulum Membrane." *Biochimica et Biophysica Acta* 1860(10): 2122–29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.06.024>.
- Poenie, M. 1990. "Alteration of Intracellular Fura- Viscosity : A Simple Correction." *Cell calcium*: 85–91.
- Prade, Lars et al. 1997. "Staurosporine-Induced Conformational Changes of

CAMP-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit Explain Inhibitory Potential." *Structure* 5(12): 1627–37.

Rahate, Kiran. 2019. "SERCA Stimulation : A Potential Approach in Therapeutics." (August): 1–11.

Rapoport, Tom A. 2007. "Protein Translocation across the Eukaryotic Endoplasmic Reticulum and Bacterial Plasma Membranes." *Nature* 450(7170): 663–69.

Rapoport, Tom a. 2007. "Protein Translocation across the Eukaryotic Endoplasmic Reticulum and Bacterial Plasma Membranes." *Nature* 450(7170): 663–69. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18046402> (October 28, 2015).

Rizzuto, Rosario et al. 2003. "Calcium and Apoptosis : Facts and Hypotheses." : 8619–27.

Rodriguez-Garcia, A. et al. 2014. "GAP, an Aequorin-Based Fluorescent Indicator for Imaging Ca<sup>2+</sup> in Organelles." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(7): 2584–89.

Römisch, Karin. 2016. "Opinion A Case for Sec61 Channel Involvement in ERAD." *Trends in Biochemical Sciences* xx: 1–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2016.10.005>.

Rossi, Ana M., and Colin W. Taylor. 2020. "Reliable Measurement of Free Ca<sup>2+</sup> Concentrations in the ER Lumen Using Mag-Fluo-4." *Cell Calcium* 87: 102188.

Rowling, Pamela J E, and Robert B Freedman. 1993. "Modification of Proteins within the Lumen of the Endoplasmic Reticulum." *Endoplasmic Reticulum* Chapper 3.

Roy, Anirban, and William F. Wonderlin. 2003. "The Permeability of the Endoplasmic Reticulum Is Dynamically Coupled to Protein Synthesis." *Journal of Biological Chemistry* 278(7): 4397–4403.

Rybalchenko, Volodymyr, Sung Yong Hwang, Nataliya Rybalchenko, and Peter Koulen. 2008. "The Cytosolic N-Terminus of Presenilin-1 Potentiates

- Mouse Ryanodine Receptor Single Channel Activity." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 40(1): 84–97.
- Sammels, Eva et al. 2010. "Intracellular Ca<sup>2+</sup> Storage in Health and Disease: A Dynamic Equilibrium." *Cell calcium* 47(4): 297–314.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20189643> (October 30, 2015).
- Schäuble, Nico et al. 2012. "BiP-Mediated Closing of the Sec61 Channel Limits Ca<sup>2+</sup> Leakage from the ER." *EMBO Journal* 31(15): 3282–96.
- Schindl, Rainer et al. 2008. "2-Aminoethoxydiphenyl Borate Alters Selectivity of Orai3 Channels by Increasing Their Pore Size." *Journal of Biological Chemistry* 283(29): 20261–67.
- Schorr, Stefan et al. 2015. "Co-Chaperone Specificity in Gating of the Polypeptide Conducting Channel in the Membrane of the Human Endoplasmic Reticulum." *Journal of Biological Chemistry* 290(30): 18621–35.
- Schwarz, Dianne S, and Michael D Blower. 2016. "The Endoplasmic Reticulum : Structure , Function and Response to Cellular Signaling." *Cellular and Molecular Life Sciences* 73(1): 79–94.
- Selkoe, Dennis J, and Michael S Wolfe. 2007. "Presenilin: Running with Scissors in the Membrane." *Cell* 131(2): 215–21.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17956719> (August 31, 2015).
- Supnet, Charlene, and Ilya Bezprozvanny. 2011. "Presenilins as Endoplasmic Reticulum Calcium Leak Channels and Alzheimer's Disease Pathogenesis." *Science China. Life sciences* 54(8): 744–51.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21786197> (September 14, 2015).
- Suzuki, Junji et al. 2014. "Imaging Intraorganellar Ca<sup>2+</sup> at Subcellular Resolution Using CEPIA." *Nature Communications* 5: 4153–66.  
<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms5153>.
- Szlufcik, Karolina et al. 2006. "Uncoupled IP3 Receptor Can Function as a Ca<sup>2+</sup>-Leak Channel: Cell Biological and Pathological Consequences." *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology*

- Organization* 98(1): 1–14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16354157> (October 30, 2015).
- Tafani, Marco, Dmitri A Minchenko, Ada Serroni, and John L Farber. 2001. “Induction of the Mitochondrial Permeability Transition Mediates the Killing Of.” *Cancer Research* 61: 2459–66.
- Tamaoki, Tatsuya et al. 1986. “Staurosporine, a Potent Inhibitor of Phospholipid Ca<sup>++</sup>-dependent Protein Kinase.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 135(2): 397–402.
- Tang, Damu, Jill M. Lahti, and Vincent J. Kidd. 2000. “Caspase-8 Activation and Bid Cleavage Contribute to MCF7 Cellular Execution in a Caspase-3-Dependent Manner during Staurosporine-Mediated Apoptosis.” *Journal of Biological Chemistry* 275(13): 9303–7.
- Thebault, Stéphanie et al. 2005. “Novel Role of Cold/Menthol-Sensitive Transient Receptor Potential Melastatine Family Member 8 (TRPM8) in the Activation of Store-Operated Channels in LNCaP Human Prostate Cancer Epithelial Cells.” *Journal of Biological Chemistry* 280(47): 39423–35.
- Tominaga, Makoto, and Tomoko Tominaga. 2005. “Structure and Function of TRPV1.” *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 451(1): 143–50.
- Tovell, Hannah, and Alexandra C Newton. 2021. “PHLPPing the Balance : Restoration of Protein Kinase C in Cancer.” (October 2020): 341–56.
- Toyoshima, Chikashi, and Hiromi Nomura. 2002. “Structural Changes in the Calcium Pump Accompanying the Dissociation of Calcium.” *Nature* 418(8): 605–11.
- Tsai, Billy, Yihong Ye, and Tom A Rapoport. 2002. “RETRO-TRANSLOCATION OF PROTEINS FROM THE ENDOPLASMIC RETICULUM INTO THE CYTOSOL.” 3(April): 246–55.
- Tsai, Chia Feng et al. 2015. “Large-Scale Determination of Absolute Phosphorylation Stoichiometries in Human Cells by Motif-Targeting Quantitative Proteomics.” *Nature Communications* 6: 6622–30. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms7622>.

- Tu, Huiping et al. 2006. "Presenilins Form ER Ca<sup>2+</sup> Leak Channels, a Function Disrupted by Familial Alzheimer's Disease-Linked Mutations." *Cell* 126(5): 981–93.  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3241869&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (October 30, 2015).
- Varadarajan, Shankar et al. 2013. "Endoplasmic Reticulum Membrane Reorganization Is Regulated by Ionic Homeostasis." *PLoS ONE* 8(2).
- Vazquez, D. 1974. "Inhibitors of Protein Synthesis." *FEBS Letters* 40(SUPPL. 1): s63–84.
- Voorhees, Rebecca M., Israel S. Fernández, Sjors H W Scheres, and Ramanujan S. Hegde. 2014. "Structure of the Mammalian Ribosome-Sec61 Complex to 3.4 Å Resolution." *Cell* 157(7): 1632–43.
- Voorhees, Rebecca M., and Ramanujan S. Hegde. 2016a. "Toward a Structural Understanding of Co-Translational Protein Translocation." *Current Opinion in Cell Biology* 41: 91–99. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2016.04.009>.
- Voorhees, Rebecca M, and Ramanujan S Hegde. 2016b. "Structure of the Sec61 Channel Opened by a Signal Sequence." *Science* 351(6268): 88–91.
- Waltern, Peter, and Vishwanath Lingappa. 1986. "Mechanism of Protein Translocation across the Endoplasmic Reticulum Membrane." *Annual Review of Cell and Developmental Biology*: 499–516.
- Wang, Shaoping et al. 2008. "Voltage-Dependent Potassium Channels Are Involved in Staurosporine-Induced Apoptosis of Rat Mesenchymal Stem Cells." *Cell Biology International* 32(2): 312–19.
- Willegems, Katrien, and Rouslan G Efremov. 2017. "Structural Details of the Ryanodine Receptor Calcium Release Channel and Its Gating Mechanism." *Membrane Dynamics and Calcium Signaling, Advances in Experimental Medicine and Biology*: 179–204.
- Wisnoskey, Brian J, William G Sinkins, and William P Schilling. 2003. "Activation of Vanilloid Receptor Type I in the Endoplasmic Reticulum Fails

- to Activate Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry." *The Biochemical journal* 372(Pt 2): 517–28.
- Wong, Kenneth, and Lillian Kwan-yeeung. 1992. "Staurosporine Clamps Cytosolic Free Ca<sup>2+</sup> Concentrations of Human Neutrophils." 283: 499–505.
- Yamamoto, A. et al. 2016. "Two Different Avian Cold-Sensitive Sensory Neurons: Transient Receptor Potential Melastatin 8 (TRPM8)-Dependent and -Independent Activation Mechanisms." *Neuropharmacology* 111: 130–41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.08.039>.
- Yanagihara, Nobuyuki, Eiichi Tachikawa, and Futoshi Izumi. 1991. "Staurosporine: An Effective Inhibitor for Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase I1." : 294–98.
- Yudin, Yevgen, and Tibor Rohacs. 2012. "Regulation of TRPM8 Channel Activity." *Molecular and Cellular Endocrinology* 353(1–2): 68–74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2011.10.023>.
- Yudushkin, Ivan. 2020. "Control of Akt Activity and Substrate Phosphorylation in Cells." (December 2019): 1115–25.
- Zalk, Ran, Stephan E Lehnart, and Andrew R Marks. 2007. "Modulation of the Ryanodine Receptor and Intracellular Calcium." *Annual review of biochemistry* 76: 367–85. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17506640> (October 13, 2015).
- Zhang, Lei et al. 2004. "Thermosensitive Transient Receptor Potential Channels in Vagal Afferent Neurons of the Mouse." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 286(6): G983–91. <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpgi.00441.2003>.
- Zhou, Houjiang et al. 2013. "Toward a Comprehensive Characterization of a Human Cancer Cell Phosphoproteome." *Journal of Proteome Research* 12(1): 260–71.