

## Resumen

Investigaciones en nuestro y otros laboratorios han demostrado que la hormona  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina  $D_3$  ( $1\alpha,25(OH)_2D_3$ ) modula los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular en células de músculo esquelético y tejido óseo por un mecanismo genómico, característico de hormonas esteroideas en el cual la hormona interacciona con un receptor intracelular específico (VDR: "vitamin D receptor"). Esta molécula exhibe una localización citoplásmica/nuclear, siendo el complejo hormona-receptor el responsable de la regulación de la expresión de genes portadores de elementos de respuesta a VDR. Sin embargo,  $1\alpha,25(OH)_2D_3$  modula también los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular a través de un mecanismo rápido, no genómico, independiente de la transcripción génica y de la síntesis proteica que implica acciones directas del esteroide sobre la membrana celular. Las acciones rápidas, no nucleares de  $1\alpha,25(OH)_2D_3$  requieren la activación de varios sistemas de señalización (adenilil ciclasa/AMPc/PKA; PLC/DAG/IP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup>/PKC), integrados en un mecanismo complejo que involucra proteínas G, interacción positiva entre las vías PKA y PKC e incremento en la fosforilación de proteínas de membrana. En conjunto, estos eventos conducen a una rápida y transitoria liberación de  $Ca^{2+}$  de los depósitos internos y activación de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje (VDCC) tipo L, con el consecuente influjo sostenido de  $Ca^{2+}$  desde el medio extracelular.

En el presente trabajo empleando el indicador fluorescente de  $Ca^{2+}$  Fura-2, se caracterizaron los efectos de la hormona  $1\alpha,25(OH)_2D_3$  sobre los niveles de  $Ca^{2+}$  citosólico en cultivos de osteoblastos de rata. Estos estudios pusieron de manifiesto que la fase de influjo de  $Ca^{2+}$  inducido por  $1,25(OH)_2D_3$  es mediada por los canales VDCC ya caracterizados, indicando además que existe una

contribución parcial a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por canales no dependientes de voltaje operados por el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos internos. Se introduce así el novedoso concepto sobre la participación de canales SOC (Store Operated Channels; CCE: Capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  Entry ) en la respuesta rápida de  $\text{Ca}^{2+}$  a la hormona. A partir de este hallazgo, estudiamos y caracterizamos esta entrada capacitativa de cationes en líneas celulares derivadas de epitelio mamario y de cáncer mamario, ambas de origen humano. Estos canales, activados por depleción y/o movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  de depósitos internos, independientes de voltaje y regulados por múltiples eventos de señalización intracelular, estarían constituidos por proteínas de la familia de genes TRP, originalmente descritos en células fotorreceptoras de *Drosophila* (mutantes *trp*: "Transient Receptor Potential"). Sus genes han sido clonados, secuenciados y su funcionalidad como canales responsables del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo SOC, ha sido demostrada mediante expresión de proteínas TRP en sistemas heterólogos. Además, en el sistema fototransductor de *Drosophila*, TRP forma parte de un complejo de señalización multiproteico junto con RH1 (rodopsina), NORPA (PLC específica de células fotorreceptoras), INAC (PKC específica de células fotorreceptoras) y una proteína adaptadora (scaffold protein) denominada INAD (Inactivation No After potential D) responsable de asociar todos los componentes en un complejo. INAD posee dominios PDZ, responsables de su función adaptadora mediante interacciones proteína-proteína. Recientes estudios bioquímicos, moleculares y electrofisiológicos, sugieren que INAD representa una subunidad constitutiva del canal TRP con función adaptadora en la formación del complejo supramolecular de señalización. Esta organización multiproteica de los componentes de

señalización proporciona las bases estructurales para una eficiente y rápida activación y regulación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales TRP. Se describieron recientemente homólogos de INAD en distintos tipos de células de vertebrados, donde se observó que cumplen función adaptadora en la formación de complejos de señalización integrados por receptores hormonales, canales iónicos y quinasas. En este trabajo mostramos evidencias de una proteína homóloga a INAD en osteoblastos de rata y su participación en el influjo capacitativo.

En síntesis, en la presente Tesis Doctoral se muestran evidencias de influjo capacitativo de calcio en distintos tipos celulares, habiendo caracterizado este influjo y estudiado exhaustivamente la modulación de cationes en el interior celular. Particularmente en osteoblastos, un sistema íntimamente relacionado con el metabolismo del calcio, demostramos la única evidencia existente sobre modulación de canales SOC por un esteroide y más precisamente, la participación de proteínas TRP e INAD asociadas a este mecanismo fisiológico vinculado a la homeostasis de cationes intracelulares.

## Summary

Evidences from our laboratory and others have demonstrated that the hormone  $1\alpha,25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$  ( $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) modulates intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels in skeletal muscle cells and bone tissue through a genomic mechanism, typical for steroidal hormones via specific an intracellular receptor (VDR: "Vitamin D Receptor"). Such molecule exhibits a cytoplasmatic-nuclear localization and the hormone-receptor complex is responsible for gene expression regulation of VDR responsive elements. Nevertheless,  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  also modulates intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels through a non genomic, rapid mechanism, independent of gene transcription and protein synthesis, implying direct steroid actions on the cellular membrane. Rapid or non genomic actions of  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  requires the activation of diverse signal systems (adenylyl cyclase/cAMP/PKA; PLC/DAG/IP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup>/PKC), forming a complex mechanism that involves G proteins, positive interaction between PKA and PKC and increased protein phosphorylation. Altogether, these events lead to a rapid and transient  $\text{Ca}^{2+}$  release from internal stores and activation of Voltage Dependent Ca<sup>2+</sup> Channels (VDCC) type L, followed by a sustained  $\text{Ca}^{2+}$  influx from the extracellular medium.

In the present work by using the fluorescent Fura-2 Ca<sup>2+</sup> dye, the effect of  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  hormone on cytosolic Ca<sup>2+</sup> levels in rat osteoblast cells were characterized. We have demonstrated that the  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -induced Ca<sup>2+</sup> influx phase is mediated by the well known VDCC channels and also that a Ca<sup>2+</sup> partial entry contribution may occur by a non voltage dependent channels and operated by the status of internal Ca<sup>2+</sup> stores. In this way we introduce a novel concept of SOC channels (Store Operated Channels; Capacitative Ca<sup>2+</sup>

Entry) in rapid response of  $\text{Ca}^{2+}$  for the hormone. Accordingly, we have studied and characterized the capacitative cation entry in other cellular system derived from breast epithelium and breast cancer, both from human origin. These channels, activated by depletion and/or  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization from internal stores, voltage independent and regulated by multiple intracellular signal events, involve proteins encoded by the *trp* family genes, first described in photoreceptor cells from *Drosophila* (mutants in *trp*: Transient Receptor Potential). *Trp* genes have been cloned and sequenced, their functionality as channels responsible from  $\text{Ca}^{2+}$  influx type SOC has been demonstrated through heterologous expression of TRP proteins. In addition, in *Drosophila* photoreceptor system, TPR is part of a multiproteic signal complex together with RH1 (rhodopsin), NORPA (PLC specific of photoreceptor cells), INAC (PKC specific of photoreceptor cells) and a scaffold protein named INAD (Inactivation No After potential D) responsible for the association of all components into a complex. INAD exhibits PDZ domains, responsible of its adaptor function through protein-protein interaction. Recently several biochemical, molecular and electrophysiological studies, suggests that INAD represents a constitutive subunit of TRP channels with an adaptor function in the supramolecular signaling complex assemble. This multiproteic organization of the signaling components provides the structural basis for an efficient and rapid activation and regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  entry through TRP channels. INAD homologous sequences have been recently described in different vertebrate cells types, whereas it has been observed that plays scaffolding functions allowing the assembly of a complex composed by hormone receptors, ion channels and

kinases. We demonstrated the presence of an INAD homologous protein in rat osteoblasts and its relationship to the capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  influx.

In summary, the present Doctoral Thesis describes the capacitative calcium entry in different cell types. We have characterized this influx and exhaustively studied the intracellular cation modulation. In particular, we have focused our efforts on osteoblast cells, a system closely dependant on calcium metabolism, and present the first evidence of SOC channels modulation by a steroid hormone and more precisely, the involvement of TRP and INAD proteins associated to this physiological mechanism in the control of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis.