



TESIS DOCTORAL

**Reorganización del citoesqueleto regulada por
STIM1 y ORAI1**

Aida María López Guerrero

Programa de Doctorado en Biomarcadores de
Salud y Estados Patológicos

2017



TESIS DOCTORAL

**Reorganización del citoesqueleto regulada por
STIM1 y ORAI1**

Aida María López Guerrero

Programa de Doctorado en Biomarcadores de Salud y Estados Patológicos

Conformidad de los directores:

Fdo.: Dr. Francisco Javier Martín Romero

Fdo.: Dra. Eulalia Pozo Guisado

2017



**Departamento de Bioquímica
Biología Molecular y Genética**

Área de Bioquímica
Facultad de Ciencias
06006 BADAJOZ

El **Dr. Francisco Javier Martín Romero**, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética, la **Dra. Eulalia Pozo Guisado**, Profesora Sustituta del Departamento de Anatomía, Biología Celular y Zoología,

CERTIFICAN que:

La presente Tesis Doctoral, titulada: “**Reorganización del citoesqueleto regulada por STIM1 y ORAI1**” presentada por **Doña Aida M. López Guerrero**, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética de la Universidad de Extremadura.

Y para que así conste, expedimos y firmamos la presente certificación en Badajoz, a de 2017.

Fdo. Dr. Fco. Javier Martín Romero

Fdo. Dra. Eulalia Pozo Guisado

Parte de los resultados presentados en esta Tesis Doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones:

- **Lopez-Guerrero AM**, Tomas-Martin P, Pascual-Caro C, Macartney T, Rojas-Fernandez A, Ball G, Alessi DR, Pozo-Guisado E, Martin-Romero FJ. Regulation of membrane ruffling by polarized STIM1 and ORAI1 in cortactin-rich domains. *Sci Reports*. 24;7(1):383 (2017).
- Martin-Romero FJ, **Lopez-Guerrero AM**, Pascual-Caro C, Pozo-Guisado E. The Interplay between Cytoskeleton and Calcium Dynamics, in *Cytoskeleton: Structure, Dynamics, Function and Disease*. Edited by J.C. Jimenez Lopez. Intech Eds. ISBN: 978-953-51-4898-2.
- **Lopez-Guerrero AM**, Martin-Romero FJ, Pozo-Guisado E. SOCE is dispensable for ERK1/2 activation in response to EGF. Submitted to *Cell Signaling*.

Congresos científicos:

- **Lopez-Guerrero AM**, Pascual-Caro C, Rojas-Fernandez A, Macartney T, Alessi DR, Pozo-Guisado E, Martin-Romero FJ. Cortactin recruits the Ca(2+) channel ORAI1 in membrane ruffles. European Cytoskeletal Forum. Cambridge (United Kingdom). Junio, 2016.
- Tomás-Martin P, **Lopez-Guerrero AM**, Martin-Romero FJ, Pozo-Guisado E. Phospho-STIM1 localizes in cortactin-rich domains and controls membrane ruffling dynamics. European Cytoskeletal Forum. Cambridge (United Kingdom). Junio, 2016
- Pascual-Caro C., **Lopez-Guerrero AM**, Macartney T., Alessi DR, Pozo-Guisado E. and Martin-Romero FJ. CRISPR/Cas9 genome editing of STIM1 and ORAI1 in cancer cell lines. Congress: XIV International Meeting of the European Calcium Society. Valladolid (Spain). 2016
- **Lopez-Guerrero AM**, Pascual-Caro C, Macartney T, Alessi DR, Pozo-Guisado E, Martin-Romero FJ. ORAI1 and STIM1 promote membrane ruffling at the leading edge of migrating cells. Congress: International Workshop of the Spanish Ion Channel Initiative (SICI). Segovia (Spain). 2016

Este trabajo ha sido financiado con Proyectos del Ministerio de Economía y Competitividad (**BFU2011-22798** y **BFU-51402-P**) y de la Junta de Extremadura-Fondo Social Europeo (**GR15077**). D^a Aida M. López Guerrero ha sido beneficiaria de una beca predoctoral de Formación del Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España (**BES-2012-052061**), una beca de estancia en el extranjero de la Federación Europea de Sociedades de Bioquímica (**FEBS Summer Fellowship**) y de una ayuda puente para becarios predoctorales (**Acción III**) dentro del Plan de Iniciación a la Investigación de la Universidad de Extremadura.



Unión Europea
Fondo Europeo de
Desarrollo Regional

“Una manera de hacer Europa”



JUNTA DE EXTREMADURA

Hoy, mirando atrás el camino recorrido me parece más corto, y es que la Tesis Doctoral en un primer momento se presenta como si de un viaje al más lejano mundo se tratara. Al principio todo son incertidumbres e hipótesis, técnicas, metodologías y protocolos nuevos, que se suman a los nervios por el reto que has decidido afrontar. Ahora me doy cuenta que desde el primer día, la Tesis es un recorrido de aprendizaje que merece la pena sufrir y también disfrutar. Por todo ello quiero aprovechar esta oportunidad para dar las gracias a todos aquellos que han estado a mi lado haciendo este momento posible.

En primer lugar gracias a mis directores: al Dr. Fco. Javier Martín Romero por su intensa dedicación a la investigación, por su labor de profesor dándole tanta importancia a los detalles, por darme todas las facilidades posibles, y por conseguir que trabajar en este grupo no le tenga nada que envidiar a trabajar en un centro con más recursos, no poniéndonos más limitaciones que las que nos ponemos nosotros mismos. Gracias a la Dra. Eulalia Pozo Guisado por su positividad y energía contagiosa, por ser todo un ejemplo de las habilidades y actitudes científicas necesarias para un investigador, y gracias por tener siempre “un minuto” para mí.

También quiero dar las gracias a mis compañeros predoctorales, Vanessa Casas y Patricia Tomás porque trabajando juntas, las horas largas se hacían más cortas, y en especial gracias a Carlos Pascual porque en estos últimos años no he parado de abusar de su generosidad, no creo que encuentre un compañero mejor.

Gracias a mis compañeros del Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética, por las pequeñas celebraciones de tartas y pasteles.

Gracias al Servicio de Apoyo a la Investigación de la UEX, a Yolanda Gutiérrez y Alberto Álvarez porque aunque mis visitas se hayan ido reduciendo, en mis primeros años aprendí mucho en esas numerosas horas de confocal.

Gracias a Elisa, Alejandro y Ana por su amabilidad, por compartir sus conocimientos conmigo y por hacer que mi estancia en Dundee fuese una experiencia tan valiosa.

Gracias a mis amigos de Biología que siempre han mostrado interés y me han creído capaz.

Gracias a mis amigas, por escucharme en mis numerosos momentos de agobios y animarme siempre.

Por supuesto mi más sentido agradecimiento hoy es para toda mi familia, gracias a mis abuelos, gracias a mi hermana que siempre ha sido mi modelo de “esfuerzo es igual a éxito”. Gracias a mis padres por todo, a mi padre por ayudarme a superar mi particular periplo de la experimentación con ratones y alentarme en la avidez de conocimientos, y a mi madre resumiendo muchísimo por darme tranquilidad y fuerza, por ser tan comprensiva y por cuidarme en los días difíciles, sin duda su ayuda me ha hecho más eficiente, ella ha sido mi co-directora en la sombra.

Ya ti Peter, que después de todas las visitas al laboratorio con la excusa de “va a ser solo un momento” te debo y mereces folios completos de gracias, espero que no te parezca injusto que hoy sea breve: gracias por tu atención, por tu paciencia, por querer que exprimiera esta etapa de formación al máximo aunque eso supusiera un “no” a muchas cosas, gracias en definitiva por ser mi mejor apoyo.

*Pero sí esperamos lo que todavía no tenemos, en la espera
mostramos nuestra constancia.
Romanos 8:25*

Abreviaturas, acrónimos y siglas

Δ: Delección (*Deletion*)

[Ca²⁺]_i: Concentración de calcio libre intracelular (*intracellular calcium concentration*)

aa: Aminoácido (*Amino acid*)

Actina-F: Actina filamentosa (*filamentous actin*)

Actina-G: Actina globular (*globular actin*)

Arp2/3: *Actin related protein 2/3*

ATP: Adenosina 5'-trifosfato (*Adenosine 5'-triphosphate*)

BSA: Albúmina de suero bovino (*Bovine serum albumin*)

CAD: Dominio activador de CRAC (*CRAC activating domain*)

CDI: Inactivación dependiente de calcio (*Calcium-dependent inactivation*)

CDK: Quinasa dependiente de ciclina (*Cyclin-dependent kinase*)

cDNA: DNA complementario (*complementary DNA*)

CAMKII: proteína quinasa dependiente de Ca²⁺-calmodulina II (*Ca²⁺-calmodulin-dependent kinase II*)

C-terminal: Carboxi-terminal (*Carboxy-terminal*)

CTTN: cortactina (*cortactin*)

DNA: Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO: Dimetil-sulfóxido (*Dimethyl Sulfoxide*)

DTT: Ditioneitol (*Dithiothreitol*)

EB1: *End Binding protein-1*

ECM: Matriz extracelular (*Extracellular matrix*)

EGF: Factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal growth factor*)

EGTA: Ácido etilen glicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético (*Ethylene Glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid*)

FA: Adhesiones focales (*Focal Adhesions*)

FAK: Quinasa de adhesión focal (*Focal adhesions kinase*)

FBS: Suero fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*)

FRET: Transferencia de energía de resonancia de Förster (*Förster Resonance Energy Transfer*)

Fura 2-AM: Fura 2-acetoximetiléster (*Fura 2-acetoxymethyl ester*)

GFP: Proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)

GTPasa: Guanosina trifosfatasa (*GTPase: Guanosine TriPhosphatase*)

HeLa: *Henrietta Lacks*

HBSS: *Hank's Balanced Salt Solution*

HRP: Peroxidasa de rábano (*horseradish peroxidase*)

IGF-1: Factor de crecimiento insulínico-1 (*Insulin growth factor-1*)

IP3: Inositol 1,4,5-trisfosfato (*Inositol 1,4,5-Trisphosphate*)

kDa: Kilodalton

LB: Medio Luria Bertani para *E.coli*

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógeno (*Mitogen-activated protein kinase*)

ORAI1: *Calcium Release-Activated Calcium Channel protein 1* (CRAC1)

mRNA: RNA mensajero (*Messenger RNA*)

MP: Membrana plasmática (*PM: Plasma Membrane*)

MTs: Microtúbulos (*Microtubules*)

N-terminal: Amino terminal (*Amino-terminal*)

NPF: Factor promotor de la nucleación (*Nucleation promoting factor*)

NTA: Dominio ácido terminal (*Amino-terminal acidic region*)

pb: Pares de bases (*bp: base pair*)

PBS: Tampón fosfato salino (*Phosphate Buffered-Saline*)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PEG: Polietilén glicol (*Polyethylene glycol*)

PFA: Paraformaldehído (*Paraformaldehyde*)

PKC: Proteína quinasa C (*Protein kinase C*)

PMSF: Fluoruro de fenil metil sulfonilo (*phenylmethylsulfonyl fluoride*)

PP1: Proteína fosfatasa tipo 1 (*Protein Phosphatase type 1*)

PP2: Proteína fosfatasa tipo 2A (*Protein Phosphatase type 2A*)

Rac1: *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*

RE: Retículo endoplasmático (*ER: Endoplasmic Reticulum*)

RNA: Ácido ribonucleico (*Ribonucleic Acid*)

RNAasa: Ribonucleasa (*RNAase: Ribonuclease*)

RT: Temperatura ambiente (*Room temperature*)

rpm: Revoluciones por minuto (*Revolutions per minute*)

RyR: Receptor de rianodina (*Ryanodine receptor*)

SD: Desviación estándar (*Standard deviation*)

SDS: Dodecil sulfato sódico (*Sodium dodecyl sulfate*)

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida (*Polyacrilamide gel electrophoresis*)

SH3: Dominio de homología Src 3 (*Src Homology domain 3*).

SERCA: Ca²⁺ ATPasa de retículo sarco(endo)plasmático (*Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase*)

STIM1: *Stromal Interaction Molecule 1*.

SOCE: Entrada de calcio regulada por depósitos intracelulares (*Store Operated Calcium Entry*)

TEMED: N,N,N',N'-tetrametil etilendiamina (*Tetramethylethylenediamine*)

Tg: Tapsigargina (*Thapsigargin*)

Tris: Tris (hidroximetil)aminometano (*tris hidroximethyl aminomethane*)



Índice

Índice

Resumen.....	23
Introducción.....	27
1. Ion calcio como señalizador intracelular	29
2. Transportadores de Ca ²⁺ y la señalización mediada por el influjo de Ca ²⁺	30
3. Entrada de Ca ²⁺ operada por depósitos intracelulares.....	33
3.1. Estructura molecular y dominios en las proteínas STIM.....	35
3.2. Estructura molecular y dominios en las proteínas ORAI.	36
3.3. Activación de los canales SOCs.	38
4. Modificaciones postraduccionales de STIM1 y ORAI1.....	41
5. STIM1 y la ruta de señalización de las quinasas MAPK.	42
6. Componentes del citoesqueleto que regulan SOCE.	44
7. Localización y polarización de SOCE en células migratorias.....	48
8. Cortactina y reorganización del citoesqueleto.....	50
8.1. Estructura molecular y dominios de CTTN.....	50
8.2. Modificaciones postraduccionales de CTTN.	51
8.3. CTTN, migración celular y cáncer.....	53
8.4. CTTN y la señalización mediada por Ca ²⁺	53
9. Regulación de la dinámica del citoesqueleto y migración celular mediada por Ca ²⁺	54
Objetivos.....	57
Resultados	61
1. ESTUDIO DE LA INTERRELACIÓN ENTRE SOCE Y ERK1/2	63
1.1. Activación de las quinasas MAPK en ausencia de Ca ²⁺ extracelular.....	63
1.2. EGF activa la fosforilación de STIM1, sustrato de ERK1/2.	66
1.4. Caracterización inicial de la línea celular PC3 STIM1-KO.....	73
1.5. La activación de ERK1/2 no requiere del influjo de Ca ²⁺ dependiente de STIM1.	76
1.6. La quinasa Src se activa en respuesta a EGF de manera independiente al influjo de Ca ²⁺	78
2. STIM1 Y ORAI1 PROMUEVEN LA REORGANIZACIÓN DEL CITOESQUELETO EN EL FRENTE DE MIGRACIÓN.	81
2.1. Localización polarizada de fosfo-STIM1 en la zona de avance de migración..	81
2.2. Colocalización de fosfo-STIM1 y cortactina.	83
2.3. Interacción de STIM1 y cortactina.....	84
2.4. Generación de la línea celular U2OS STIM1-KO empleando el sistema CRISPR/Cas9.....	86
2.5. Caracterización de la línea U2OS STIM1-KO.	88
2.6. STIM1 regula la dinámica de los ruffles de membrana.....	90
2.7. STIM1 promueve la migración celular en células U2OS.	92

2.8. La sobre-expresión ectópica de STIM1-mCherry permite la recuperación del fenotipo silvestre.	93
2.9. Localización de ORAI1 en el frente de migración.	96
2.10. Generación de la línea ORAI1-KO mediante el sistema CRISPR/Cas9.	98
2.11. Caracterización de la línea U2OS ORAI1-KO.	99
2.12. ORAI1 regula la dinámica de los ruffles de membrana en U2OS.	102
2.13. ORAI1 es un regulador positivo de la migración celular.	103
2.14. La sobre-expresión ectópica de ORAI1-mCherry permite la recuperación del fenotipo silvestre.	104
2.15. Interacción de ORAI1 y cortactina en células U2OS.	107
3. EL RECLUTAMIENTO DE ORAI1 EN RUFFLES DE MEMBRANA ESTÁ MEDIADO POR CTTN.	111
3.1. Regulación de la interacción ORAI1-CTTN por EGF.	111
3.2. Generación de la línea U2OS CTTN-KO empleando el sistema CRISPR/Cas9.	113
3.3. Caracterización de la línea U2OS CTTN-KO.	114
3.3.1. Análisis del ciclo celular.	114
3.3.2. Análisis de la entrada de Ca ²⁺ extracelular inducida por Tg.	115
3.3.3. Análisis de la migración celular.	117
3.4. Localización de ORAI1-GFP en células U2OS CTTN-KO fijadas.	118
3.5. Monitorización de ORAI1-mCherry en células CTTN-KO.	119
Discusión	123
Conclusiones/	135
Conclusions	135
.....	141
Materiales y Métodos	141
1. Cultivos celulares	143
2. Generación de líneas celulares modificadas genéticamente mediante el sistema CRISPR/Cas9.	143
3. Tratamientos de las líneas celulares	149
3.1. Tratamientos de las líneas celulares HeLa y U2OS.	149
3.2. Tratamientos de la línea PC3.	150
4. Preparación de extractos celulares e inmunoblot.	150
4.1. Preparación de extractos celulares.	150
4.2. Medida de la concentración de proteína.	151
4.3. Inmunoprecipitación y co-inmunoprecipitación de proteínas.	151
4.4. Electroforesis en condiciones desnaturizantes y transferencia a membranas de nitrocelulosa.	151
4.5. Inmunodetección.	152
5. Inmunolocalización.	154
5.1. Análisis por epifluorescencia en célula fijada.	154

5.2. Análisis por epifluorescencia en célula viva.	155
5.3. Análisis de imágenes.	155
6. Ensayos de migración celular.	155
7. Análisis del ciclo celular.	156
8. Clonaje molecular y transfección.	156
8.1. Cuantificación del DNA.	156
8.2. Transformación bacteriana.	156
8.3. Obtención de DNA plasmídico.	157
8.4. Construcciones de DNA y transfección.	157
9. Medida de la concentración de calcio libre intracelular.	158
9.1. Carga con fura 2-AM en células U2OS y PC3.	159
9.2. Medida de los valores de fluorescencia.	159
9.3. Calibración de la medida.	159
9.4. Activación de la entrada de Ca ²⁺ mediante canales SOC.	160
Global summary	161
1. Introduction.....	163
2. Objectives	165
3. Results and Discussion	165
3.1. SOCE is dispensable for the activation of ERK1/2 pathway in response to EGF.	165
3.2. Regulation of membrane ruffling by polarized STIM1 and ORAI1 in cortactin- rich domains.	168
Bibliografía	173



Resumen

La migración es un proceso celular que requiere la reorganización del citoesqueleto cortical de actina en el frente de migración, siendo esencial la entrada de Ca^{2+} extracelular para esta reorganización. Sin embargo, la naturaleza molecular de los reguladores que participan en esta ruta de señalización permanece aún sin esclarecer. Por ello decidimos estudiar el papel de STIM1 y ORAI1 en la formación de las ondas o protrusiones de membrana plasmática, conocidas como ruffles, y la remodelación del citoesqueleto necesaria para la migración celular. Previamente al estudio del citoesqueleto y puesto que nuestro grupo de investigación había propuesto un modelo que relaciona la actividad de la quinasa ERK1/2 con la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos (SOCE), en este trabajo de Tesis Doctoral se ha estudiado la interdependencia de ERK1/2 y SOCE con objeto de determinar si existe alguna contribución real de SOCE sobre la actividad ERK1/2. Para ello se generó una línea celular deficiente en STIM1, y por tanto en SOCE, utilizando el sistema de edición genómica CRISPR/Cas9. La monitorización de los niveles de fosfo-ERK1/2 en presencia o ausencia de Ca^{2+} en células PC3 STIM1-KO y wild-type nos permitió confirmar que la activación de la quinasa ERK1/2 en respuesta a EGF es independiente del influjo de Ca^{2+} extracelular y dependiente de la actividad de la familia de quinasas Src.

Con relación al estudio de la regulación del citoesqueleto mediada por SOCE, nuestros resultados muestran que el pool de STIM1 fosforilado se concentra en el frente de células en migración, y también que ORAI1 co-localiza con cortactina (CTTN), un regulador del citoesqueleto en regiones de ruffling de membrana. Mediante la utilización del sistema de edición genómica CRISPR/Cas9 en células U2OS se generaron las líneas celulares STIM1-KO y ORAI1-KO. En ambas líneas se observó una notable reducción de SOCE, efecto que pudo revertirse con la sobre-expresión ectópica de STIM1-mCherry o ORAI1-mCherry, respectivamente. Además, en estas líneas KO se midió la dinámica de los ruffles de membrana mediante la monitorización de la intensidad de fluorescencia de GFP-CTTN en dichas áreas de la célula. Como resultado observamos que estas líneas presentan un menor número de ruffles de membrana y una dinámica del citoesqueleto débil y más lenta con respecto a las células U2OS wild-type. Todo ello permite concluir que STIM1 y ORAI1 son los principales mediadores del influjo de Ca^{2+} extracelular que permite el ruffling de membrana necesario para la migración celular. Además, nuestros datos revelaron que ORAI1 co-precipita con CTTN, y que esta interacción es dinámica y sensible al estado de llenado de depósitos intracelulares.

Resumen

En resumen, nuestros resultados apoyan un mecanismo de regulación de la migración celular basada en la localización polarizada de STIM1 y ORAI1, de modo que ambas proteínas permiten el influjo de Ca^{2+} extracelular localizado en el frente de migración. En situación de reposo STIM1 permanece unido a EB1, mientras que ORAI1 permanece unido a CTTN. Bajo un estímulo que permita una depleción parcial de depósitos intracelulares de Ca^{2+} , STIM1 se disocia de EB1 (mediante la fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2), y ORAI1 se disocia de CTTN, por un mecanismo que aún desconocemos, para permitir la unión STIM1-ORAI1 y la activación de SOCE que regula la formación de filopodios y lamelipodios.



Introducción

1. Ion calcio como señalizador intracelular.

El ion Ca^{2+} es un mensajero intracelular esencial en la señalización celular por su capacidad de unión a proteínas sensibles a Ca^{2+} que median actividades clave en diferentes rutas de señalización. A partir de la estimulación celular a través de un amplio conjunto de receptores, así como de otro tipo de estimulaciones fisiológicas como la despolarización de la membrana plasmática, cambios en la osmolaridad, la distorsión física de la superficie celular, temperatura, etc., un variado grupo de “segundos mensajeros” transmiten este estímulo inicial para desencadenar la respuesta adecuada a cada estímulo. En algunos casos el estímulo da lugar a una alteración en el transporte de iones a través de la membrana plasmática o de membranas de orgánulos intracelulares, o bien conduce a modificaciones postraduccionales en proteínas, cambios en la expresión génica o a la remodelación del citoesqueleto.

Para actuar adecuadamente como segundo mensajero la concentración libre de Ca^{2+} citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) es sustancialmente diferente a ambos lados de la membrana plasmática. Mientras que la concentración en el medio extracelular es 1-2 mM, el nivel de Ca^{2+} libre en el medio citosólico se encuentra dentro de un intervalo muy estrecho de 80-120 nM (Berridge et al., 2003; Berridge et al., 2000). Considerando este gradiente químico de Ca^{2+} libre, las células pueden generar con facilidad y rapidez un incremento transitorio en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ incrementado el influjo de Ca^{2+} desde el exterior celular. Este incremento transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ estimula la acción de un amplio número de mediadores dependientes de Ca^{2+} que modifican diversas rutas de señalización. Debido a la participación de Ca^{2+} en numerosas rutas de señalización son necesarios diferentes tipos de incrementos en la concentración de Ca^{2+} para responder a diversos estímulos iniciales. Esto es posible por el control espacio-temporal del incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, es decir, el control de la localización del incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, la duración del mismo, la cinética de incremento o la cinética de recuperación del nivel basal de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Berridge, 2014).

El transporte de Ca^{2+} se encuentra fuertemente regulado por canales específicos, como son los canales sensibles a hormonas, citoquinas, pequeñas moléculas y otros estímulos extracelulares. Las propiedades de estos transportadores modulan las características de la corriente de Ca^{2+} (inlujo de Ca^{2+}), dando lugar a una cinética de entrada de Ca^{2+} específica. Debido a que es necesaria una distribución también específica de los canales de Ca^{2+} y transportadores, se ha propuesto la participación activa del citoesqueleto en la regulación espacial de la entrada de Ca^{2+} . Además, la

señalización celular mediada por Ca^{2+} tiene una gran influencia sobre la dinámica del citoesqueleto, una interacción que es en la actualidad motivo de estudio y sobre la que se centra parte de esta Tesis Doctoral.

2. Transportadores de Ca^{2+} y la señalización mediada por el influjo de Ca^{2+} .

En la membrana plasmática (MP) de células eucariotas encontramos diferentes transportadores de Ca^{2+} para controlar tanto el influjo como la extrusión de Ca^{2+} . Debido a que el control temporal de la señalización de Ca^{2+} se encuentra estrictamente regulado, los transportadores se coordinan para permitir que los picos/ondas de Ca^{2+} presenten una duración precisa, variando en un rango desde microsegundos, como en la exocitosis, hasta un intervalo de horas, como se observa en la fecundación de oocitos de mamíferos (figura 1).

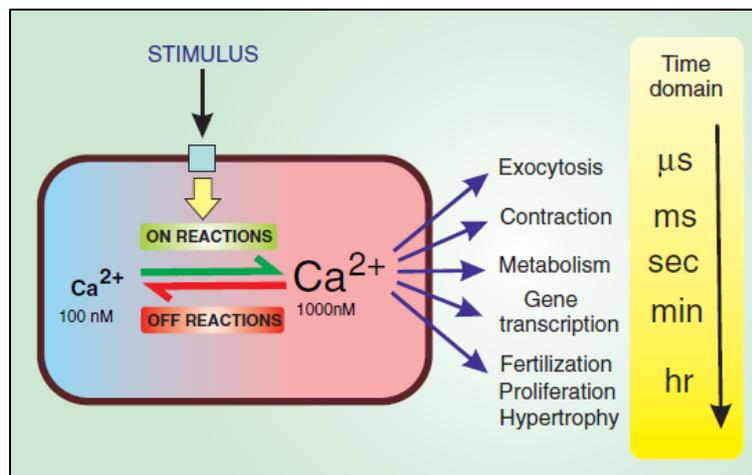


Figura 1. Mecanismo básico de la señalización dependiente de Ca^{2+} . La concentración de Ca^{2+} libre citosólico en células en reposo es aproximadamente de 100 nM, pero puede aumentar en respuesta a estímulos que activen la movilización de Ca^{2+} (ON reactions). Cuando la estimulación finaliza (OFF reactions), la concentración de Ca^{2+} se recupera hasta alcanzar el nivel basal de las células en reposo. La señalización dependiente de Ca^{2+} participa en un gran número de procesos celulares gracias a un control espacio-temporal del incremento de la concentración de Ca^{2+} (Berridge, 2014).

Para comprender mejor este control se describen a continuación algunos de los transportadores de Ca^{2+} más importantes en células eucariotas. Podemos dividir los canales de entrada de Ca^{2+} en los siguientes grupos:

i) Canales operados por voltaje (VOCs, voltage-operated channels), que están regulados por la carga eléctrica que recorre la membrana plasmática, de manera que la despolarización de la membrana plasmática causa la apertura de estos canales. Esta

familia de canales está formada por tres grupos, Ca_v1 (canales de tipo-L), Ca_v2 (N-,P/Q y de tipo R) y Ca_v3 (canales de tipo T) (Catterall and Zheng, 2015).

ii) Canales operados por receptores (ROCs, receptor-operated channels) que se abren en respuesta a la unión de un agonista como ATP, glutamato o acetilcolina (Frings, 1997). En este grupo destaca la familia de canales TRP (transient receptor potencial), una amplia familia de canales que participa en la percepción sensorial, en los ciclos de contracción y relajación de músculo liso o en la proliferación celular (Taberner et al., 2015). Miembros de la familia TRPC (transient receptor potential canonical) también participan en la organización de canales de Ca^{2+} que responden al vaciado de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} (Ambudkar and Ong, 2007). Este es el caso de TRPC1 que ha sido descrito como componente de complejos junto con los miembros de la familia de canales ORAI (Ambudkar, 2007). Otros miembros importantes de esta familia son los receptores P2X, que son canales de Ca^{2+} cuya apertura está mediada por ATP extracelular (Vial et al., 2004), o los receptores de glutamato (Madden, 2002).

iii) Los canales operados por segundos mensajeros (SMOCs, second-messenger-operated channels) son miembros de una importante familia de canales cuya apertura está mediada por la actividad de un segundo mensajero intracelular, como el canal selectivo de Ca^{2+} regulado por ácido araquidónico (ARC, arachidonic acid-regulated Ca^{2+}) o el canal TRPC6, miembro de la familia TRPC sensible a diacilglicerol (DAG) (Gudermann et al., 2004).

iv) Los canales operados por depósitos (SOCs, store operated channels) están regulados por el estado de llenado de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} , principalmente del retículo endoplasmático (RE). La actividad de estos canales es el resultado de una liberación inicial de Ca^{2+} desde el RE, principalmente por la activación de la ruta de señalización de los fosfoinosítidos. Una amplia variedad de estímulos provoca la ruptura de fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) en 1,2-diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3), lo cual activa los receptores de IP_3 (IP_3R) en el RE, permitiendo la liberación transitoria de Ca^{2+} . La mayor parte de este Ca^{2+} es reconducido al RE por la ATPasa del retículo sarco(end)plasmático (SERCA), la bomba de Ca^{2+} de la membrana del RE. Sin embargo, una parte significativa de este Ca^{2+} es extruido al exterior por la ATPasa de la membrana plasmática (PMCA), permitiendo la depleción parcial del RE cuando la estimulación es repetitiva. Por lo tanto, este sistema necesita de un rellenado de los depósitos de Ca^{2+} , acción que está facilitada por los canales SOC que activan el influjo de Ca^{2+} . Esta señalización es conocida como entrada de

Ca^{2+} operada por depósitos intracelulares (SOCE, store-operated Ca^{2+} entry), y fue descrita por primera vez por James Putney hace más de 30 años (Putney, 1986).

Como se ha mencionado anteriormente, existen transportadores para disminuir la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hasta niveles basales (hasta aproximadamente 100 nM) y así interrumpir la señalización mediada por Ca^{2+} . Estos transportadores son principalmente bombas de Ca^{2+} , que tienen la capacidad de transportar iones Ca^{2+} en contra de su gradiente químico mediante el consumo de ATP (MacLennan and Green, 2000). Las bombas PMCAs y SERCAs extruyen Ca^{2+} desde el citosol al medio extracelular y al interior del RE respectivamente. Además de estos sistemas, en la membrana plasmática encontramos el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que contribuye a la extrusión de Ca^{2+} mediado por un gradiente dependiente de Na^+ , siendo particularmente importante para las células cardíacas y el tejido neuronal (DiPolo and Beauge, 2006). Finalmente, el transportador de Ca^{2+} mitocondrial (MCU, mitochondrial Ca^{2+} uniporter) y la Ca^{2+} -ATPasa de las vías secretoras (SPCA, secretory-pathway Ca^{2+} -ATPase) son sistemas adicionales para la restauración de los niveles basales de Ca^{2+} (Babcock et al., 1997) (figura 2).

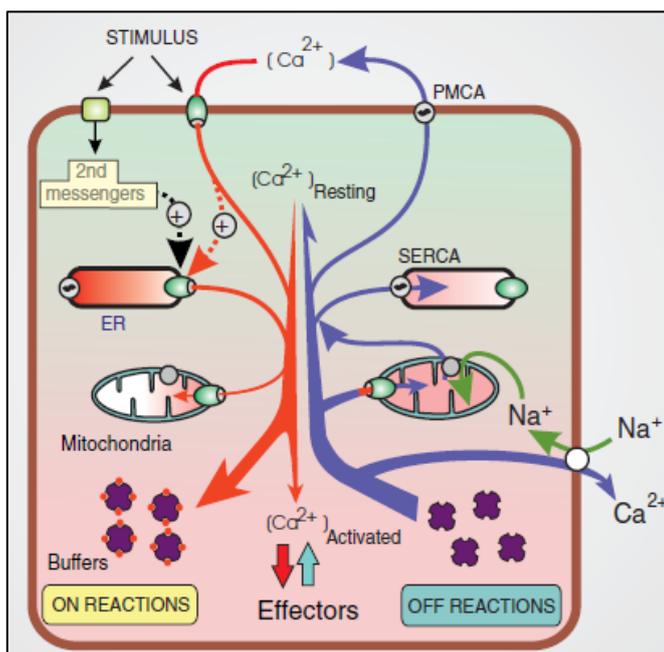


Figura 2. Dinámica de señalización de Ca^{2+} . La dinámica de la señalización dependiente de Ca^{2+} está regulada por la interacción de los estímulos “ON” y “OFF” que controlan el influjo y salida de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática y de la membrana de los orgánulos subcelulares, como la del RE y la mitocondria. Los estímulos externos (ON reactions) activan la entrada de Ca^{2+} al citosol a través tanto de canales en la MP, como de canales que permiten el vaciado del RE o las mitocondrias. Mediante la combinación de bombas y transportadores de Ca^{2+} (OFF reactions), la señalización dependiente de Ca^{2+} se interrumpe hasta recuperar la concentración basal de las células en estado de reposo. La activación secuencial de los mecanismos “ON” y “OFF” permite el aumento transitorio del nivel de Ca^{2+} , lo cual es una característica de los sistemas de señalización de Ca^{2+} . (Berridge, 2014)

Por lo tanto, la contribución de la actividad de los canales y las bombas, tanto de la membrana plasmática como de la membrana de orgánulos subcelulares, y la expresión particular de estos transportadores en las diferentes células y tejidos hacen posible para una célula específica la respuesta a una amplia variedad de estímulos.

3. Entrada de Ca^{2+} operada por depósitos intracelulares.

Como hemos descrito anteriormente, la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos intracelulares (SOCE) es un sistema de influjo de Ca^{2+} que mantiene la permanencia de la señalización mediada por Ca^{2+} , preservando los niveles de Ca^{2+} en el interior del RE en un rango de concentración micromolar. Por esta extraordinaria propiedad, SOCE es un mecanismo ubicuo y es una de las rutas de señalización mediada por Ca^{2+} más importante tanto en células excitables como no excitables (Smyth et al., 2010). La primera identificación directa de la ruta de señalización de SOCE corresponde a un estudio electrofisiológico que tenía como objetivo identificar canales de Ca^{2+} que regulan la secreción de mastocitos de ratón. Utilizando una combinación de estudios de patch-clamp e imágenes de epifluorescencia de Ca^{2+} , Penner y cols. describieron una pequeña corriente que se desarrollaba en paralelo a un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Matthews et al., 1989; Penner et al., 1988). Posteriormente, Hoth y Penner identificaron en mastocitos una corriente muy selectiva para Ca^{2+} que denominaron corriente CRAC (Ca^{2+} release-activated Ca^{2+}) (Hoth and Penner, 1992). Estudios posteriores demostraron que los canales CRAC, permeables a la corriente I_{CRAC} , se activaban sólo en respuesta a una reducción significativa en la concentración luminal de Ca^{2+} , asumiendo, por tanto, que los canales CRAC son un prototipo de los canales SOC. La descripción molecular de los componentes que controlan el influjo de Ca^{2+} (SOCE), tuvo lugar hace poco más de 10 años con el descubrimiento de dos proteínas, STIM1 (Stromal Interaction Molecule 1) y ORAI1 (Feske et al., 2006; Liou et al., 2005; Luik et al., 2006; Prakriya et al., 2006; Roos et al., 2005; Zhang et al., 2005) (figura 3). El descubrimiento tuvo lugar mediante estudios con RNA de interferencia, que permitieron la identificación de las proteínas STIM1 y ORAI1 como componentes esenciales para la completa reconstitución de la función del canal CRAC. Además, el síndrome de inmunodeficiencia severa combinada (SCID), que se caracteriza por una deficiencia en la función del canal CRAC, facilitó el descubrimiento de ORAI1. Esta proteína se describió como la subunidad formadora del poro del canal CRAC, siendo la mutación

R91W, presente en enfermos afectados de SCID, la responsable de la ausencia de la corriente CRAC en estos pacientes (Feske et al., 2006).

El mecanismo que conecta los niveles de Ca^{2+} citosólicos con la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática está mediado por STIM1, una proteína transmembranal localizada en el RE que actúa como sensor de Ca^{2+} . STIM1 contiene en la región intraluminal del RE un dominio sensible a Ca^{2+} , denominado dominio EF-hand, y tras una depleción de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} el extremo citosólico de STIM1 activa los canales SOCs localizados en la MP. Este vaciado de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} causa la oligomerización de STIM1 y la relocalización en yuxtaposiciones de RE-MP necesarias para la unión y la activación de los canales SOCs (figura 3).

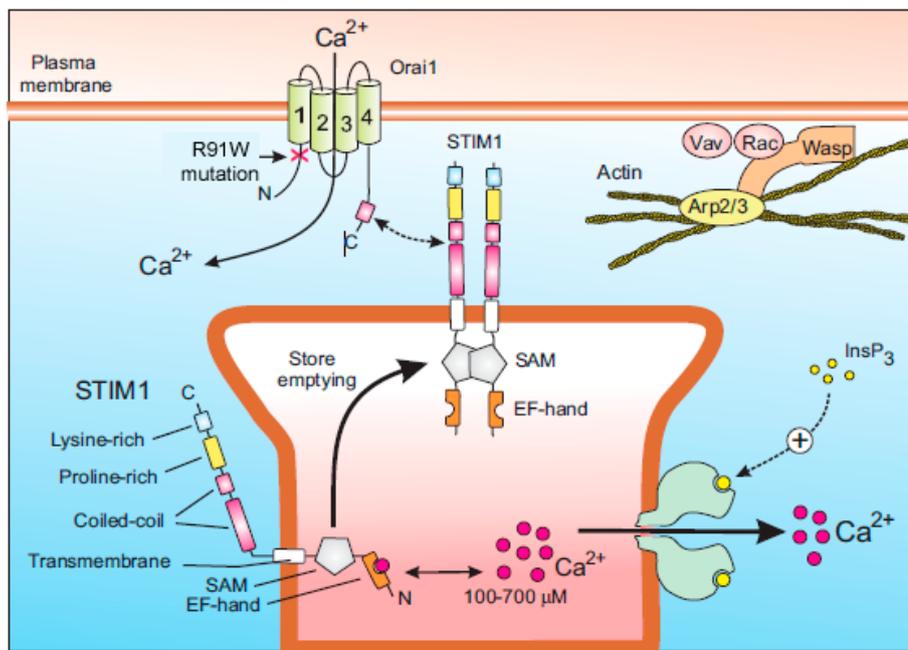


Figura 3. Componentes moleculares de la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos (SOCE). El canal de Ca^{2+} operado por depósitos mejor caracterizado es ORAI1, que está compuesto por 4 dominios transmembranales. Los extremos N- y C-terminal están orientados hacia el citosol, donde participan en la conformación abierta-cerrada del canal. La proteína STIM1 se localiza en el RE, con un dominio EF-hand que monitoriza los niveles de Ca^{2+} en el lumen del RE. En respuesta a un incremento de inositol 1,4,5-trisfosfato (InsP_3) se produce un vaciado de los depósitos y STIM1 se localiza en yuxtaposiciones MP-RE donde activa la entrada de Ca^{2+} (Berridge, 2014).

3.1. Estructura molecular y dominios en las proteínas STIM.

La familia de proteínas STIM (Stromal Interaction Molecule) incluye dos componentes, STIM1 y STIM2 (Soboloff et al., 2012), que se expresan principalmente en el RE (Liou et al., 2005; Manji et al., 2000; Soboloff et al., 2006a; Zhang et al., 2005). Una cantidad mínima también se expresa en la MP, la cual sin embargo no es necesaria para la activación del canal CRAC (Ambily et al., 2014; Cahalan, 2009). Ambas proteínas están muy relacionadas y comparten aproximadamente el 61% de la secuencia genómica (Cahalan, 2009). A diferencia de STIM1, STIM2 actúa débilmente como activador de los canales ORAI y es responsable del mantenimiento de la concentración de Ca^{2+} citosólico para evitar una activación descontrolada de SOCE (Wang et al., 2014). STIM es una familia de proteínas altamente conservada desde *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila* a *Homo sapiens* (Collins and Meyer, 2011). Como se ha indicado anteriormente, las proteínas STIM son proteínas transmembranales con una región N-terminal que incluye un dominio sensor de Ca^{2+} localizado en el lumen del RE, y una región C-terminal localizada en el citosol, responsable de la activación de los canales ORAI (Cahalan, 2009; Liou et al., 2005; Roos et al., 2005) (figura 4). En el extremo N-terminal el dominio sensible a Ca^{2+} está formado por un dominio EF-hand muy próximo a un dominio SAM (sterile- α -motif). Por otro lado, la región C-terminal de STIM1 incluye sitios esenciales para el acoplamiento a ORAI1 (Hou et al., 2012; Huang et al., 2006; Muik et al., 2008), los cuales corresponden a tres dominios coiled-coil (CC) denominados CC1, CC2 y CC3. En base a la predicción estructural, el dominio CC1 puede subdividirse en tres regiones α -hélices (CC1 α 1, CC1 α 2 y CC1 α 3) (Soboloff et al., 2012; Stathopoulos et al., 2013; Yang et al., 2012). Del mismo modo, el estudio cristalográfico del fragmento C-terminal de STIM1 permitió la descripción de la región SOAR (STIM-ORAI1 activating region) como la secuencia mínima necesaria para la activación de ORAI1. La región SOAR incluye los dominios CC2 y CC3, y está formada por cuatro α -hélices denominadas, S α 1, S α 2, S α 3 y S α 4 (Yang et al., 2012). Otros autores han denominado a esta región “dominio de activación de la corriente CRAC” o CAD (CRAC activation domain) (Soboloff et al., 2012). A continuación STIM1 presenta un dominio rico en serinas y prolinas (residuos 600-629), una secuencia de interacción a microtúbulos (Thr-Arg-Ile-Pro, residuos 642-645) (Honnappa et al., 2009) y un dominio rico en lisinas (residuos 671-685) (Liou et al., 2007).

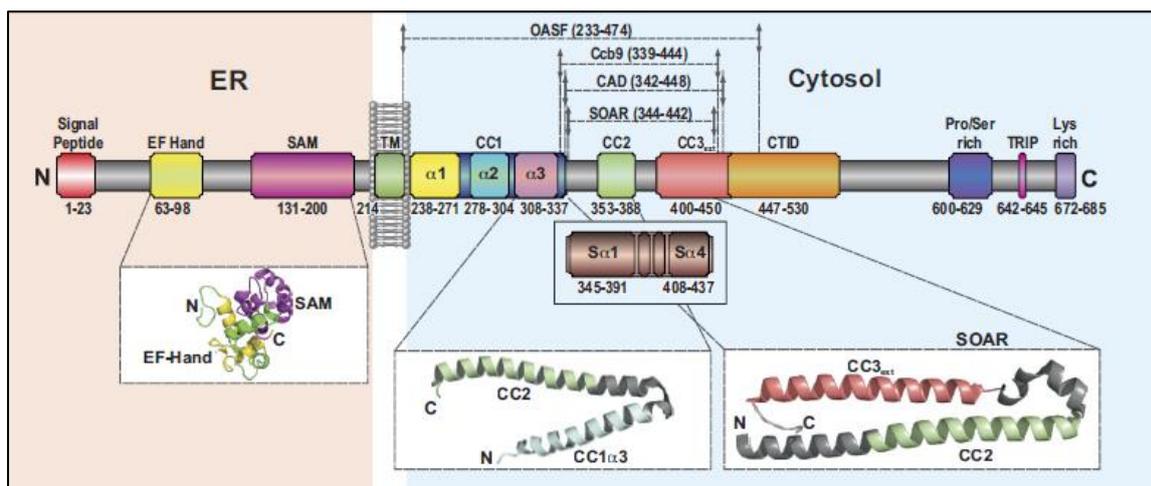


Figura 4. Esquema de la proteína STIM1 humana. En este esquema se representan las regiones esenciales implicadas en la activación del complejo STIM1/ORAI1. En detalle se muestran las siguientes estructuras: dominio EF-hand y sterile- α -motif (SAM), el dominio coiled-coil (CC1 α 3-CC2) y el fragmento SOAR (344-442). Además se pueden observar los dominios ricos en Pro/Ser, secuencia TRIP de unión a microtúbulos y dominio rico en lisinas (Derler et al., 2016).

Tras el vaciado de depósitos, el dominio EF-hand se disocia de Ca^{2+} causando la desestabilización del complejo EF-SAM, y este cambio conformacional se transmite a través de su región citosólica resultando en una conformación desplegada y activa de STIM1 (Zheng et al., 2008; Zheng et al., 2011). Tras el vaciado de depósitos intracelulares la activación de STIM1 permite la exposición de la región SOAR induciendo la activación de la corriente CRAC a través de ORAI1 (Li et al., 2007; Muik et al., 2011) (figura 4).

3.2. Estructura molecular y dominios en las proteínas ORAI.

Los canales ORAI son una familia de canales de MP selectivos para la entrada de Ca^{2+} que incluye a tres miembros homólogos, denominados ORAI1-3 (Feske et al., 2006; Vig et al., 2006). Cada monómero de ORAI contiene cuatro segmentos transmembranales (TM1-TM4) unidos mediante lazos, uno intracelular y dos extracelulares, además de las regiones N-terminal y C-terminal orientados hacia el citosol (Mignen et al., 2008; Penna et al., 2008). Las regiones transmembranales están más conservadas entre la familia de proteínas ORAI, a diferencia de los lazos extra- e intracelular que están menos conservados, con excepción del segmento que participa en la unión a STIM1 (Hogan and Rao, 2015). Las diferencias estructurales más significativas entre las diferentes isoformas residen en el segundo lazo extracelular que

que un péptido pequeño que comprende los residuos ¹⁵³NVHNL¹⁵⁷ en el lazo intracelular bloquea la corriente CRAC generada en el canal ORAI1, sugiriendo la importancia del lazo intracelular en la inactivación del canal (Srikanth et al., 2010). En este sentido, los dominios intracelulares de ORAI1 no solo son importantes para la apertura y cierre del canal dependiente de STIM1, sino que también son esenciales para la inactivación del canal y la comunicación con otras rutas de señalización como discutiremos más adelante.

3.3. Activación de los canales SOCs.

Tras el vaciado de depósitos, Ca²⁺ se disocia del dominio EF-hand induciendo un cambio conformacional de la proteína desde el estado de reposo (conformación plegada) al estado activo (conformación extendida) (Zheng et al., 2008; Zheng et al., 2011). La activación de STIM1 permite la exposición de la región SOAR induciendo de este modo la activación de la corriente CRAC (Li et al., 2007; Muik et al., 2011). En estado de reposo, es decir con los depósitos intracelulares de Ca²⁺ llenos, los dominios EF-hand de dos moléculas de STIM1 adquieren una conformación que le permite la interacción de sus residuos hidrofóbicos con los residuos hidrofóbicos del dominio SAM, formando el complejo EF-SAM (Zheng et al., 2011) (figura 6). Además de la porción luminal y los dominios TM, la porción citosólica de STIM1 también participa en el mantenimiento del estado plegado e inactivo de la proteína. La conformación inactiva de STIM1 se mantiene principalmente por la interacción entre CC1α1-CC3, la cual retiene a las regiones funcionales de STIM1 cerca del RE, manteniendo ocultas las regiones necesarias para la oligomerización con múltiples moléculas de STIM1 (Fahrner et al., 2014; Zhou et al., 2013). En este sentido, la disociación de Ca²⁺ desestabiliza el complejo EF-SAM y este cambio se transmite al dominio TM y al extremo C-terminal. Así, el vaciado de los depósitos de Ca²⁺ inicia la activación de STIM1 mediante la dimerización de los dominios luminales, la liberación de la región polibásica que interacciona con los lípidos de la MP, la exhibición del dominio CAD/SOAR que ahora queda expuesto para interaccionar con ORAI1, y por último la oligomerización de las regiones citoplasmáticas de diferentes moléculas de STIM1 mediante la interacción CC3-CC3 (Zhou et al., 2013) (figura 6). La unión de STIM1 y ORAI1 no solo induce la apertura del canal sino que también aumenta la selectividad del canal por Ca²⁺, lo que sugiere una actividad de STIM1 similar a una subunidad reguladora de ORAI1 (McNally et al., 2012).

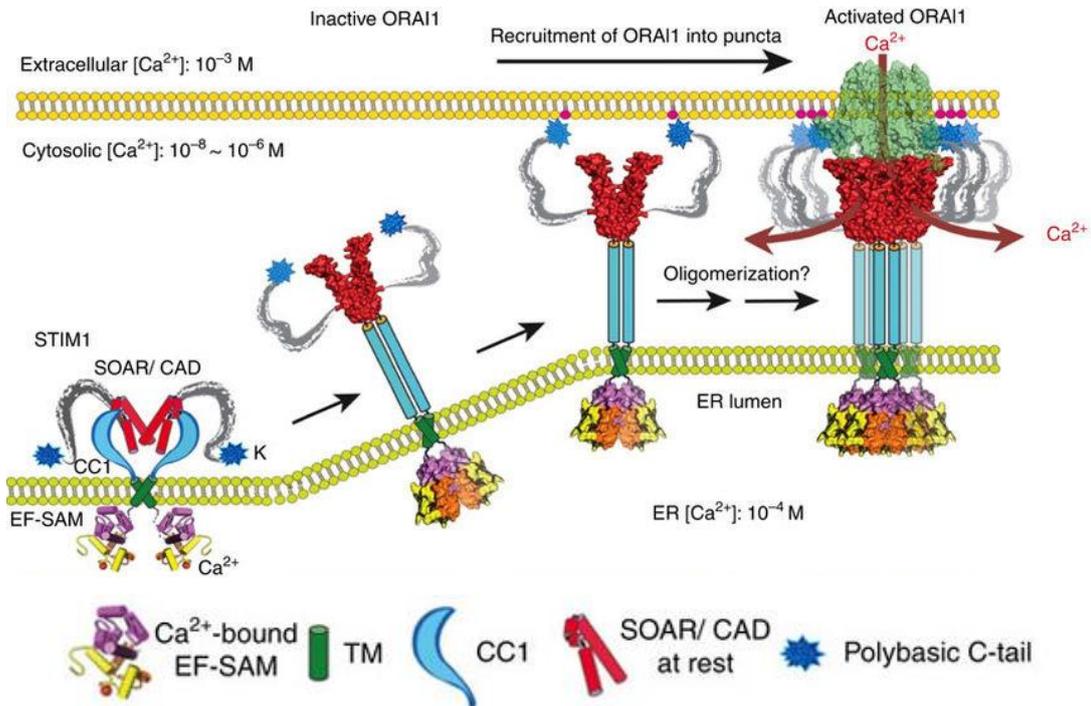


Figura 6. Modelo del cambio conformacional de STIM1 necesario para la activación de SOCE. En condiciones de reposo el dominio EF-SAM de STIM1 está unido a Ca²⁺ y permanece en forma de monómero. El dominio citoplasmático de STIM1 incluye un dominio coiled-coil (CC1), una región mínima de activación de Orai1 (SOAR o CAD) y una región rica en residuos básicos (K). En estado de reposo STIM1 permanece como dímero y adopta una conformación plegada que se mantiene inactiva por la interacción entre CC1 y SOAR. Tras el vaciado de los depósitos de Ca²⁺ se produce la disociación de Ca²⁺ y del dominio EF-SAM, iniciándose un proceso de desestabilización de la proteína en el lumen del RE. Estos cambios conformacionales se propagan al dominio TM y citosólico, adoptando la proteína una conformación extendida y activa que expone el dominio SOAR/CAD y la región polibásica. A continuación, STIM1 activado multimeriza y migra hacia yuxtaposiciones de RE-MP, donde a través de un contacto directo activa a los canales Orai1 (Ma et al., 2015).

Además de Orai1, algunos de los miembros de la familia de canales TRPC pueden actuar de manera dependiente de STIM1 (figura 7). STIM1 activa directamente a los canales TRPC1, TRPC4 y TRPC5, que pueden actuar como canales SOCs (Yuan et al., 2007). TRPC1 también se une a Orai1 formando el complejo ternario TRPC1-Orai1-STIM1, de modo que TRPC1-Orai1 puede ser considerado como canal SOC (Ong et al., 2007). STIM1 también puede activar a TRPC3 y TRPC6, no por una interacción directa, pero sí mediando la heteromultimerización de TRPC3 con TRPC1 y TRPC6 con TRPC4 (Yuan et al., 2007).

La apertura de los canales ORAs y TRPCs dependiente de STIM1 también es diferente. STIM1 activa el canal Orai1 por interacción directa a través de la región de activación STIM1-Orai1, la mencionada región SOAR o CAD. Por el contrario, la unión a TRPC1 tiene lugar a través del extremo C-terminal de STIM1, que contiene una zona

polibásica que activa a TRPC1 mediante un mecanismo electrostático, induciendo la activación del canal SOC (Park et al., 2009; Yuan et al., 2009) (figura 7).

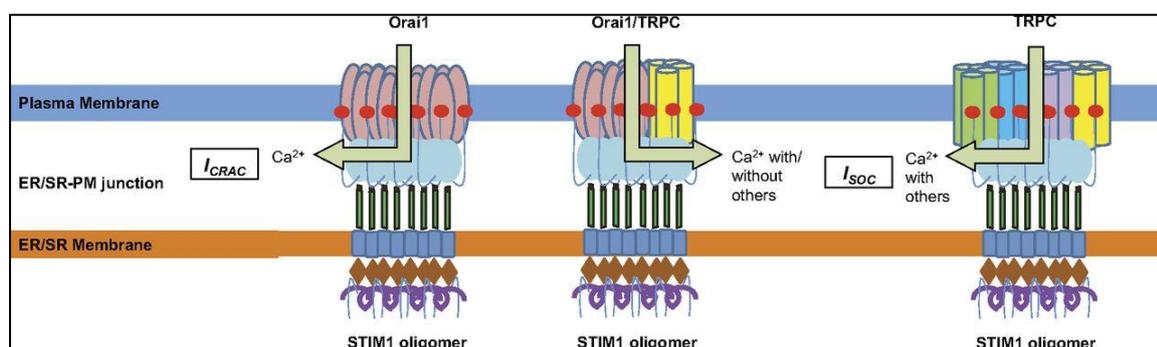


Figura 7. Activación dependiente de STIM1 de ORAI1 y TRPC1. El complejo STIM1-ORAI1 regula la entrada altamente selectiva de Ca^{2+} y no dependiente de voltaje (I_{CRAC}), mientras que el complejo TRPC1-STIM1 regula un flujo operado por depósitos no selectivo de Ca^{2+} (I_{SOC}). ORAI1/TRPC1 puede regular un flujo selectivo y/o no selectivo de Ca^{2+} (I_{SOC}) (Collins et al., 2013).

STIM1 puede interactuar con otro tipo de canales de Ca^{2+} , como son los canales $\text{Ca}_v1.2$, pero en este caso STIM1 provoca la inhibición de los mismos (Park et al., 2010; Wang et al., 2010). Por otra parte, esta actividad inhibitoria está mediada por el dominio de activación de STIM1 a ORAI1 (SOAR o CAD) y esta unión directa a $\text{Ca}_v1.2$ causa también la internalización del canal, lo cual explica la regulación coordinada de la entrada de Ca^{2+} a través de los canales VOCCs y SOCs. Así, la combinación de los diferentes canales de Ca^{2+} provee a la célula de una gran diversidad de conductancias de Ca^{2+} en respuesta a una gran variedad de estímulos. A pesar de ello, los mecanismos moleculares que posibilitan las diferentes localizaciones de STIM1 en la célula están aún sin describir.

Se ha descrito que las células en reposo exhiben una distribución homogénea de STIM1, que se desplaza rápidamente de manera dependiente de microtúbulos. Baba y cols. describieron el movimiento dinámico y constante de STIM1 previo al vaciado de depósitos intracelulares de Ca^{2+} , el cual está regulado por el dominio coiled-coil (CC) y el dominio rico en Ser/Pro (Baba et al., 2006). En este sentido, el citoesqueleto parece ser necesario para la función y unión de STIM1 a ORAI1 y consecuentemente para la activación de SOCE. También es conocido que SOCE es sensible a compuestos químicos que modifican los componentes del citoesqueleto, como son citocalasina D o nocodazol en células NIH3T3 (Ribeiro et al., 1997), células del endotelio vascular (Holda and Blatter, 1997) y más recientemente en células RBL-2H3 derivadas de médula ósea

(Oka et al., 2005), células HEK293 (Smyth et al., 2007) y plaquetas (Redondo et al., 2007; Rosado et al., 2000; Rosado and Sage, 2000).

Con toda esta información podemos concluir que el citoesqueleto no es solo un modulador crítico de SOCE, sino que también podríamos sugerir que el citoesqueleto es un regulador de la interacción de STIM1 con diferentes transportadores de Ca^{2+} .

4. Modificaciones postraduccionales de STIM1 y ORAI1.

En la actualidad, el estudio de las modificaciones postraduccionales de STIM1 y ORAI1 es motivo de interés para numerosos grupos de investigación. Ya en el año 2000 se describió que STIM1 es una fosfoproteína (Manji et al., 2000). Sin embargo, hasta los años 2009-2010 no se publicaron trabajos que determinaron el papel de la fosforilación de residuos específicos de STIM1. Putney y cols. describieron que las Ser486 y Ser668, localizadas en el dominio rico en Ser/Thr de STIM1, se fosforilaban durante la mitosis por la quinasa CDK1 (cyclin dependent kinase 1) y que esta fosforilación causaba la inhibición de SOCE durante esta etapa del ciclo celular (Smyth et al., 2009). En un estudio diferente, Machaca y cols. describieron que esta inhibición de SOCE también se observaba en células en meiosis (Yu et al., 2009), pero que los anteriores residuos no estaban relacionados con esta inhibición. Posteriormente, nuestro grupo de investigación identificó varios fosforesiduos de STIM1 que tenían un papel crítico en la activación de SOCE. Pozo-Guisado y cols. describieron que la quinasa ERK1/2 fosforila a STIM1 en los residuos Ser575, Ser608 y Ser621 localizados en el dominio rico en Ser/Pro del extremo citosólico (Pozo-Guisado et al., 2010). El evento de fosforilación tenía lugar como consecuencia del vaciado de depósitos provocado por taspigargina, así como por TPA, un éster de forbol activador de ERK1/2. Además, mediante la utilización de mutantes de STIM1 en el que se sustituyeron estas serinas por alaninas, mimetizando así la desfosforilación constitutiva de la proteína, se demostró que la fosforilación de STIM1 en secuencias diana de ERK1/2 es necesaria para la activación de SOCE. Experimentos de co-precipitación y FRET permitieron observar que la fosforilación de STIM1 incrementa la asociación de STIM1 con ORAI1, comparándolo con un mutante de STIM1 que no puede ser fosforilado por ERK1/2 (Pozo-Guisado et al., 2010). En relación a estos resultados, Yazbeck y cols. han descrito recientemente que la fosforilación en el residuo Tyr365 de STIM1 por PyK2 es también necesaria para la activación de SOCE. En este estudio, los autores describen que la fosforilación en el residuo Tyr365 no es necesaria para la multimerización de STIM1 pero sí regula el

reclutamiento de ORAI1 con STIM1 en la MP, permitiendo la entrada de Ca^{2+} a través del canal ORAI1 (Yazbeck et al., 2017). Otro mecanismo postraduccional que regula STIM1 y por tanto a SOCE es la ubiquitinación. En este sentido, Keil y cols., empleando neuronas de hipocampo, describieron que STIM1 se ubiquitina, lo que reduce su expresión en la superficie de neuronas de hipocampo (Keil et al., 2010).

En relación al estudio de las modificaciones postraduccionales de ORAI1, Kawasaki y cols. describieron que ORAI1 se fosforila en los residuos Ser27 y Ser30 en el extremo N-terminal, causando esta fosforilación la inhibición de SOCE (Kawasaki et al., 2010). Los autores sugirieron que esta fosforilación es debida a un miembro de la familia de las quinasas PKC, PKC β , basándose en resultados de ensayos quinasa *in vitro*. Teniendo en cuenta la localización de estos residuos, es posible que la fosforilación de los mismos pueda influir en la interacción con STIM1 y la regulación de la apertura del canal. En relación a la ubiquitinación, Lee y cols. identificaron a ubiquilina 1 como una proteína que interactúa con ORAI1. Ubiquilina 1 aumenta la ubiquitinación de ORAI1, y la sobre-expresión de Ubiquilina 1 produce la inhibición de la entrada de Ca^{2+} a través de los canales SOC en respuesta a taspigargina (Tg) (Lee et al., 2013). Sin embargo, y debido a la falta de más estudios, es necesario profundizar en la regulación de las proteínas STIM1 y ORAI1 mediante otras modificaciones postraduccionales, así como su influencia en SOCE.

5. STIM1 y la ruta de señalización de las quinasas MAPK.

La ruta de señalización de entrada de Ca^{2+} regulada por STIM1-ORAI1 modula eventos celulares críticos, entre los que se incluyen expresión génica, ciclo celular, proliferación, motilidad celular y migración (Prakriya and Lewis, 2015). Numerosos estudios han mostrado que estos eventos celulares se encuentran regulados por la ruta de señalización de las MAPK (mitogen-activated protein kinases). En este sentido ya hemos descrito anteriormente que STIM1 es una fosfoproteína que se fosforila en tres residuos diana de ERK1/2 (Ser575, Ser608 y Ser621) y que esta fosforilación regula la activación de STIM1 y su localización. Se ha observado que la mutación de estos residuos a alanina inhibe fuertemente la entrada de Ca^{2+} y que los inhibidores de MEK1/2, que inhiben la actividad de ERK1/2, reducen significativamente la entrada de Ca^{2+} . Por otro lado, TPA, que activa fuertemente a ERK1/2, produce un aumento en SOCE en células que sobre-expresan STIM1 pero no en células que sobre-expresan STIM1 mutado a alanina en los residuos diana de ERK1/2. Todos estos resultados

ponen de manifiesto que la fosforilación de STIM1 en residuos diana de ERK1/2 es necesaria para la activación de SOCE. En este sentido, y más recientemente, se ha descrito la fosforilación de STIM1 por las quinasas ERK1/2 en células estimuladas con EGF (epidermal growth factor) (Casas-Rua et al., 2015) o IGF-1 (insulin-like growth factor) (Tomas-Martin et al., 2015), dos estímulos que estimulan el influjo de Ca^{2+} . Sin embargo, son necesarios estudios que clarifiquen el papel de SOCE sobre la actividad de ERK1/2, ya que estudios recientes han descrito que la entrada de Ca^{2+} a través de los canales SOC es necesaria para activar ERK1/2 en células acinares de la glándula parótida (Soltoff and Lannon, 2013) y en células de melanoma (Umemura et al., 2014), proponiendo un modelo en el que SOCE es un regulador (upstream) de la ruta de señalización de ERK. Soltoff y cols. observaron que la fosforilación de ERK1/2 aumentaba tras el tratamiento con tpsigargina (Tg), así como con el agonista de receptores muscarínicos carbacol; sin embargo, la fosforilación de ERK1/2 no aumentaba en respuesta a un aumento global en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta a un ionóforo de Ca^{2+} o a la entrada de Ca^{2+} por los canales ARC (arachidonic acid-activated channels). Estos autores también observaron que el tratamiento de las células con inhibidores de SOCE, como 2-aminoetil difenil borato (2-APB), SKF96365 o la depleción del Ca^{2+} extracelular, producían una disminución en la fosforilación de ERK1/2 causada por Tg o carbacol. Además, la fosforilación de ERK1/2 inducida por Tg también disminuía al inhibir las quinasas Src y PKC en células pre-tratadas con el agonista β -adrenérgico isoproterenol (Soltoff and Lannon, 2013).

A la luz de la existencia de dos posibles modelos de interrelación entre SOCE y ERK1/2, en este trabajo de investigación nos propusimos analizar: (1) El modelo propuesto por Pozo-Guisado y cols. en el que la fosforilación dependiente de ERK1/2 es crítica para una completa activación de SOCE; y (2) el modelo descrito en los trabajos de Soltoff y cols., y Umemura y cols. en el que SOCE es un regulador de la ruta de señalización de ERK1/2, y es necesaria una completa activación de SOCE para la activación de ERK1/2. Para poder analizar estos dos posibles mecanismos nos propusimos evaluar el impacto del knock-out de STIM1, y por lo tanto de la inhibición de SOCE, sobre la activación de las quinasas ERK1/2. Estos resultados se analizarán en los apartados de Resultados y Discusión de este trabajo.

6. Componentes del citoesqueleto que regulan SOCE.

En la actualidad, son numerosos los trabajos que relacionan la entrada de Ca^{2+} a través de los canales SOCs con procesos regulados por el citoesqueleto. En este apartado se detallan componentes del citoesqueleto que han sido descritos como posibles reguladores de SOCE: (1) las proteínas de unión a microtúbulos EB1 (end binding protein 1) y APC (adenomatous polyposis coli), (2) la familia de proteínas septinas y (3) la proteína Homer1.

Tras la descripción molecular de STIM1 y ORAI1 como los dos elementos principales responsables de SOCE, se describió que los microtúbulos del citoesqueleto participan en la regulación de la entrada de Ca^{2+} a través de canales SOCs. Smyth y cols. describieron que STIM1 marcado con proteína fluorescente colocalizaba con tubulina endógena y que el tratamiento con nocodazol, que induce la despolimerización de la tubulina, provocaba la pérdida de esta colocalización en células HEK293. Además, también describieron que nocodazol tenía un efecto inhibitorio sobre SOCE, el cual podía ser revertido por la sobre-expresión de YFP-STIM1 (Smyth et al., 2007). Estos autores sugirieron que los microtúbulos del citoesqueleto tienen un papel importante en la activación de SOCE mediante la facilitación de la apropiada localización de STIM1 para activar los canales SOCs. Resultados similares se describieron también en células COS-7, en las que el tratamiento con nocodazol causó la retracción de los filamentos de tubulina en la zona de la periferia celular provocando la pérdida progresiva de SOCE (Russa et al., 2008), resultados muy similares a los descritos por el grupo de James W. Putney para células en mitosis. Por el contrario, paclitaxel, que estabiliza los microtúbulos, promueve SOCE (Russa et al., 2008), lo cual apoya los resultados que sugieren un papel crítico de los microtúbulos en la normal activación de SOCE.

Estudios posteriores describieron la interacción directa de STIM1 a EB1, una proteína asociada a los extremos en crecimiento (extremos +) de los microtúbulos, permitiendo así que STIM1 se desplace a través de la superficie del RE por un mecanismo dependiente de microtúbulos (Grigoriev et al., 2008). Además, se observó que la sobre-expresión ectópica de STIM1 permite la extensión del RE, un efecto que fue explicado por la interacción directa del RE y los microtúbulos en polimerización. Además, esta observación también reveló que la concentración de STIM1 también podría regular la extensión y remodelación del RE. En relación a estos resultados, Vaca y cols. describieron que STIM1 se une a EB1 cuando se desplaza a través del RE en condiciones de reposo y que el complejo STIM1-EB1 se disocia como consecuencia de

la depleción de Ca^{2+} del RE, un evento que facilita la multimerización de STIM1, formando clusters (multímeros) en la periferia de la célula (Sampieri et al., 2009) (figura 8).

La unión STIM1-EB1 se ha estudiado posteriormente con más detalle. Se ha descrito que la secuencia Thr-Arg-Ile-Pro (TRIP) en la región del extremo C-terminal de STIM1 (ver figura 4) es la responsable de la unión directa a EB1 (Honnappa et al., 2009). Esta secuencia pertenece a una secuencia polipeptídica corta S/TxIP que ha sido encontrada en otras proteínas de unión a microtúbulos (microtubule plus-end tracking proteins, +TIPs). En estos +TIPs que contienen una secuencia S/TxIP se ha descrito una regulación por fosforilación de la unión a microtúbulos. Los +TIPs como APC (Nathke, 2004; Zumbunn et al., 2001), MCAK (Andrews et al., 2004) y CLASP2 (Kumar et al., 2009; Watanabe et al., 2009) están fosforilados en la proximidad de la secuencia S/TxIP, regulando negativamente la unión a microtúbulos. En estas +TIPs encontramos un alto número de prolinas, serinas y residuos básicos que aportan una carga positiva a la proximidad del dominio de unión de EB1. Esta es la razón por la cual la carga negativa de los residuos fosforilados en la proximidad de la secuencia S/TxIP causa el bloqueo de la unión a los extremos de los microtúbulos.

En este sentido, resultados de nuestro grupo mostraron que, como había sido descrito para estas otras +TIPs, la unión de STIM1 a los extremos de microtúbulos está regulada por fosforilación. La secuencia S/TxIP de STIM1 humano se encuentra en los residuos 642-645 (Thr-Arg-Ile-Pro), muy próxima a los residuos dianas de ERK1/2 descritos por nuestro grupo de investigación (Pozo-Guisado et al., 2010). Utilizando la sobre-expresión de STIM1 mutado en los residuos diana de ERK1/2, nuestro grupo describió que la desfosforilación de STIM1 estimulaba la unión de STIM1 a EB1, mientras que la fosforilación constitutiva de los residuos Ser575, Ser608 y Ser621 (emulada por la sustitución Ser/Glu) causaba la disociación de EB1 (Casas-Rua et al., 2013; Pozo-Guisado et al., 2013). Mediante la generación de anticuerpos fosfo-específicos que reconocen estos tres residuos de manera individual, nuestro grupo describió que hay una fosforilación dinámica y reversible de STIM1 durante su activación. Por lo tanto, la activación de SOCE mediada por taspigargina o 2,5-di-terbutil-1,4-benzohidroquinona, dos inhibidores de la SERCA que causan el vaciado del RE, está acompañada por el incremento en la fosforilación de los residuos diana de ERK1/2 (Ser575, Ser608 y Ser621). Además, también se observó que el lavado del inhibidor en un medio con Ca^{2+} milimolar, para permitir el rellenado de los depósitos del RE, se produce en paralelo a la desfosforilación de STIM1 (Pozo-Guisado et al., 2013).

Además, los resultados de nuestro grupo mostraron que la mutación Ser/Ala de estos residuos disminuye la unión de STIM1 a ORAI1 y por tanto reduce el nivel de SOCE. En consecuencia, la mutación Ser/Glu promueve una cinética más rápida en la formación de clusters (multímeros) de STIM1, lo que conduce a un aumento en la unión a ORAI1, incrementando el nivel de SOCE. Posteriormente, nuestro grupo también describió que, al igual que con tapsigargina, IGF-1 y EGF, que también estimulan la liberación de Ca^{2+} desde el RE, inducen la fosforilación de STIM1, promueven la disociación de EB1 y finalmente la activación de SOCE (Casas-Rua et al., 2015) (Tomas-Martin et al., 2015) (figura 8).

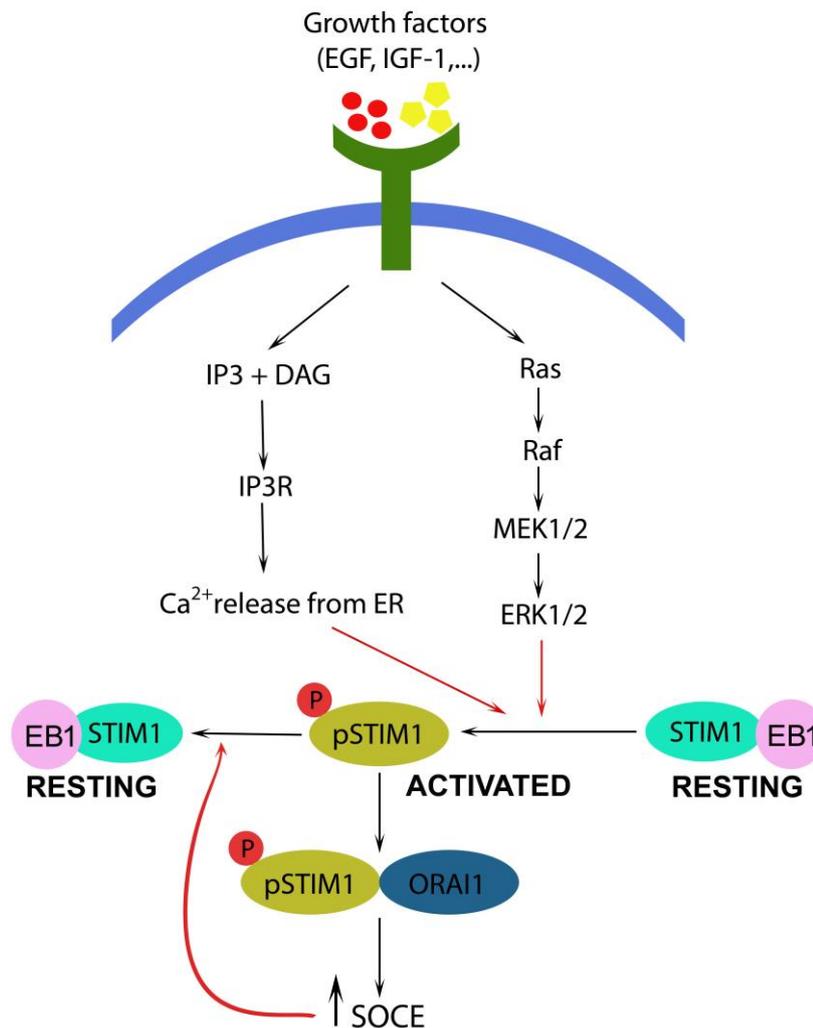


Figura 8. Modelo de regulación de SOCE por la proteína de unión a microtúbulos EB1. La movilización de Ca^{2+} desde el RE y la fosforilación de STIM1 son dos eventos esenciales para la activación de STIM1. Fosfo-STIM1 se disocia de microtúbulos facilitando su multimerización, la activación de los canales ORAI1 y el aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} . STIM1 sufre una fosforilación reversible, y tras el relleno de los depósitos de Ca^{2+} STIM1 se desfosforila, se asocia de nuevo con EB1 y microtúbulos, pasando a su estado inactivo o de reposo.

El conjunto de estos resultados apoyan un mecanismo que explica la interacción reversible de STIM1 a EB1 (Pozo-Guisado et al., 2013; Pozo-Guisado and Martin-Romero, 2013). Este mecanismo predice que los estímulos que inducen el vaciado de los depósitos de Ca^{2+} y la activación de ERK1/2 causan la fosforilación de STIM1 en los residuos Ser575, Ser608 y Ser621, un evento que promueve la disociación de STIM1 de EB1 (figura 8). Esta disociación permite la formación de clusters de STIM1 y la unión a los canales SOCs, para permitir la entrada de Ca^{2+} dependiente de STIM1 (SOCE). Además, la activación de la entrada de Ca^{2+} y el consecuente rellenado de los depósitos de Ca^{2+} inducen la desfosforilación de STIM1, promoviendo de nuevo la asociación de STIM1 con EB1 y su unión a microtúbulos.

Además de EB1, otros miembros del citoesqueleto pueden participar en la regulación de SOCE. En este sentido, se ha descrito que la proteína de unión a microtúbulos APC es necesaria para la formación de agregados de STIM1 en yuxtaposiciones RE-MP (Asanov et al., 2013). El dominio de unión de APC se encontró en el extremo C-terminal de STIM1 (residuos 650-685), de manera análoga a los residuos descritos para la unión de STIM1-EB1. Por lo tanto, se asume que tras el vaciado de depósitos del RE, STIM1 se disocia de EB1 y se asocia a APC para formar agregados en las yuxtaposiciones de RE-MP y así activar al canal ORAI1.

Un efector de la ruta de señalización de SOCE es el factor de transcripción NFAT (nuclear factor of activated T-cells). Una vez se produce la activación de la entrada de Ca^{2+} , el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ activa la fosfatasa dependiente de Ca^{2+} calcineurina (o proteína fosfatasa 2B), la cual desfosforila a NFAT, promoviendo su translocación nuclear. La translocación nuclear de NFAT puede ser fácilmente monitorizada utilizando NFAT-GFP, de modo que algunos autores han utilizado este mecanismo como marcador de la activación de SOCE. Este fue el caso de Sharma y cols. que diseñaron experimentos de RNA de interferencia para encontrar posibles reguladores de SOCE e identificaron a las proteínas septinas como reguladores clave de SOCE (Sharma et al., 2013). Así, el knock-down de la expresión de la SEPT4 presentó una disminución en la translocación de NFAT que se correspondía con una reducción de SOCE sin afectar a la liberación de Ca^{2+} desde el RE y sin causar la inhibición de las bombas SERCA o PMCA. En este sentido, se ha descrito que las septinas son necesarias para la correcta organización de ORAI1 en la MP incluso antes del vaciado de depósitos del RE (Sharma et al., 2013). Las septinas además promueven la localización de STIM1 en yuxtaposiciones del RE-MP y la formación estable de clusters (multímeros) de ORAI1 tras el vaciado de los depósitos. Debido a que las septinas actúan como proteínas de

andamiaje, participan en el reclutamiento y organización de otras proteínas, actuando como barrera de difusión para separar distintos dominios en las membranas (Mostowy and Cossart, 2012). Por ello las septinas podrían ser consideradas precursoras del reclutamiento de STIM1-ORAI1 en las intersecciones RE-MP.

Sin embargo, el papel de las septinas parece ser dependiente de la isoforma. Recientemente se ha descrito que la septina7 inhibe la activación de los canales Orai en las neuronas de *Drosophila* (dOrai) y que la disminución en los niveles de septina7 resulta en una mayor entrada de Ca^{2+} mediada por dOrai, sugiriendo que septina7 es un regulador negativo de la función del canal dOrai (Deb et al., 2016). Estos autores afirman que el knock-down de SEPT7 provoca la formación de filamentos de septina cortos que permiten el reclutamiento de STIM1 a la zona periférica del RE en neuronas en reposo y la activación de dOrai. Como resultado se produce una activación del canal dOrai independiente del vaciado de depósitos de Ca^{2+} del RE (Deb et al., 2016)

Homer1 es otra proteína de andamiaje molecular que se une a canales TRPC a través de la secuencia PPPF del canal de Ca^{2+} . Esta secuencia se localiza próxima a la secuencia de unión de STIM1, sugiriendo que Homer1 y STIM1 podrían competir por la unión a los canales TRPC (Yuan et al., 2012). En este sentido, Yuan y cols. han propuesto que Homer1 sirve de nexo de unión entre canales TRPC y receptores de IP3 (IP3R) para mantener estos canales cerrados, y la disociación del complejo TRPC-Homer1-IP3R permite a STIM1 el acceso a TRPC, activando la apertura de estos últimos. Una propuesta similar fue descrita posteriormente para $Ca_v1.2\alpha1$. Estos resultados indicaban que el péptido PPKKFR o bien el knockdown mediante siRNA específico para Homer1 reducía la asociación de STIM1 a $Ca_v1.2\alpha1.2$ (Dionisio et al., 2015), añadiendo una nueva proteína de andamiaje a la lista de proteínas reguladoras de la entrada de Ca^{2+} .

En resumen, el incremento en el número de componentes del citoesqueleto que participan específicamente en la interacción de STIM1 a diferentes canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática nos permite sugerir que el citoesqueleto regula SOCE, así como la activación y la inhibición de otros sistemas transportadores de Ca^{2+} .

7. Localización y polarización de SOCE en células migratorias.

La polarización de la entrada de Ca^{2+} extracelular ha sido descrita en distintos tipos celulares, especialmente en células de las glándulas exocrinas. En células

acinares del páncreas la estimulación de los receptores que movilizan Ca^{2+} causa la liberación de este ion desde el RE justo en la región apical de la célula, y de la misma manera, el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ permanece restringido a esta región celular (Yule, 2001). Posteriormente, la señal se propaga basolateralmente a regiones con concentraciones más elevadas de agonistas. En células acinares de la glándula salival, el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se localiza también en la región apical de la célula y se propaga posteriormente a la región basal (Bruce et al., 2004). En este sentido, tanto TRPC1 como TRPC3 son componentes fundamentales en células acinares de glándula salival y páncreas, y participan en el influjo de Ca^{2+} mediado por la estimulación de receptores (Ambudkar, 2013). Además, SOCE es la principal contribución de influjo de Ca^{2+} en las células exocrinas de la glándula salival y páncreas, por lo que se espera una distribución asimétrica de STIM1, ORAI1 y TRPC1-3. De esta manera, se ha descrito que todas las proteínas que participan en la señalización mediada por Ca^{2+} presentan una localización polarizada en estas glándulas exocrinas: IP3R, SERCA, PMCA, GPCR, canales TRPC, canales ORAI y STIM1 (Bandyopadhyay et al., 2005; Hong et al., 2011; Yule, 2001), presentan una distribución asimétrica permitiendo la secreción polarizada en estas células. Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo que dirige los complejos moleculares de señalización de Ca^{2+} hacia estas regiones.

Debido a que las células migratorias presentan polarización, la entrada de Ca^{2+} en células en migración es también objeto de estudio en la actualidad. En este sentido, Tsai y cols. describieron que STIM1 se localiza en la zona del frente de migración, para lo que emplearon expresión heteróloga de proteínas con YFP-STIM1 y un marcador del RE unido a CFP (Tsai et al., 2014). Estos autores concluyeron que la distribución de STIM1 es dependiente de la unión a microtúbulos. Utilizando el mutante STIM1-I644N/P645N, que no se une a EB1, observaron una falta de polarización en células migratorias. Debido al enriquecimiento de receptores tirosina quinasas en el frente de migración, frecuentemente se observan pulsos locales de Ca^{2+} en dicha zona, al mismo tiempo que se observan bajos niveles de Ca^{2+} en el RE y una alta actividad de la PMCA en este frente de migración. En este artículo los autores también describieron un gradiente de 1,2-diacilglicerol (DAG) como resultado de la actividad asimétrica de fosfolipasa C (PLC), lo cual resulta en el reclutamiento y la activación de PKC β . PKC β es una quinasa que participa en migración mediante la fosforilación de miosina u otros sustratos del citoesqueleto como GAP43, aducina o fascina. A pesar de estos resultados, el mecanismo preciso por el cual el ensamblaje de STIM1-ORAI1 y/o STIM1-TRPC1 presenta una distribución polarizada en las células permanece aún sin describir

por lo que es posible que otros componentes del citoesqueleto faciliten esta polarización.

8. Cortactina y reorganización del citoesqueleto.

La dinámica celular está influenciada por estímulos externos e internos que ejercen su efecto gracias a una precisa coordinación de varias rutas de señalización y de la dinámica del citoesqueleto. Esto requiere la activación e inactivación de multitud de modificadores de actina y microtúbulos, quinasas, GTPasas y sus efectores y reguladores (Rodríguez et al., 2003). Desde su descubrimiento cortactina (CTTN) ha emergido como una proteína de anclaje o andamiaje que regula la organización del citoesqueleto de actina. Aunque en los últimos años el conocimiento sobre cortactina ha aumentado exponencialmente, los mecanismos que regulan sus funciones celulares principales permanecen aún sin describir.

Cortactina fue identificada por Parson T. y cols. como una proteína de unión a los filamentos de actina, sustrato de la tirosina quinasa v-Src (Wu and Parsons, 1993). Estas dos propiedades iniciaron el estudio de esta proteína y centraron la atención en cortactina como candidata molecular que podría vincular el citoesqueleto con la señalización celular.

8.1. Estructura molecular y dominios de CTTN.

La estructura molecular de cortactina consiste en: (1) un dominio rico en aminoácidos ácidos en el extremo N-terminal (NTA, N-terminal acidic), (2) una secuencia que se repite en tándem seis veces y media (repeticiones de cortactina), (3) seguida de una α -hélice, (4) una región rica en prolinas, (5) y un dominio SH3 (Src homology domain) en su extremo C-terminal (figura 9). Cortactina se expresa de manera ubicua y está descrita su participación en numerosas enfermedades humanas debido a algunas alteraciones genómicas, como en cáncer de mama (Campbell et al., 1996), a una sobreexpresión de su mRNA, como en cáncer de vejiga (Bringuier et al., 1996), o mediante la interacción con dianas específicas como Fgd-1 (Faciogenital Dysplasia protein-1) (Hou et al., 2003).

Existen varias isoformas de cortactina que presentan diferencias en el dominio de repeticiones de cortactina mientras que conservan homología en la región C-terminal.

Estas variantes presentan diferentes características en la expresión y en la capacidad de unión a los filamentos de actina (actina-F) (Ohoka and Takai, 1998; van Rossum et al., 2003). El dominio NTA a su vez alberga el dominio DDW de unión al complejo Arp2/3. Arp2/3 es activado por factores promotores de la nucleación o ramificación de actina (NPFs) como WASP y N-WASP, que reclutan monómeros de actina globular (actina-G) a su sitio de polimerización (Ammer and Weed, 2008; Welch and Mullins, 2002). Por otro lado WASP y N-WASP se unen al dominio SH3 de cortactina formando un complejo estable (Arp2/3-WASP-cortactina) que es responsable del ensamblaje y estabilización de las ramificaciones de actina (Martinez-Quiles et al., 2004).

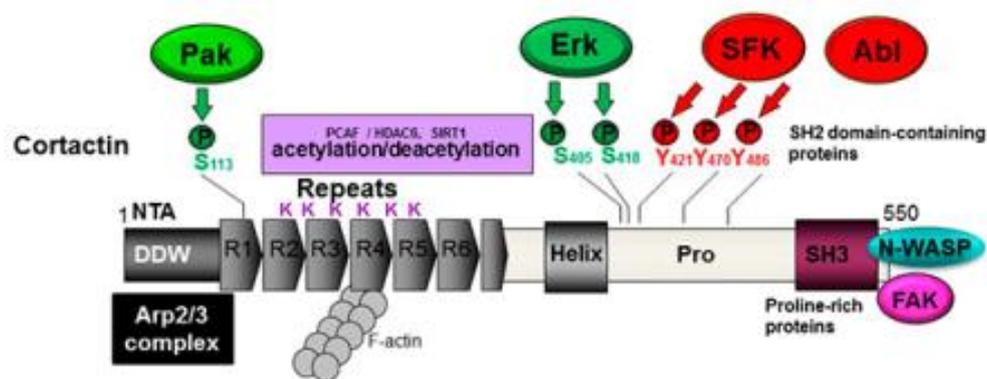


Figura 9. Esquema del diseño molecular de cortactina. En este esquema se representa la organización de los dominios principales, las modificaciones postraduccionales y proteínas que interaccionan con cortactina (Martinez-Quiles, 2013).

8.2. Modificaciones postraduccionales de CTTN.

Además de interaccionar con otras proteínas, la actividad de cortactina también se regula por modificaciones postraduccionales (PTMs). Cortactina se fosforila en residuos de tirosina en respuesta a diferentes estímulos, incluyendo receptores de integrina y cadherina, o receptores de factores de crecimiento (Helwani et al., 2004; Ren et al., 2009b; Vuori and Ruoslahti, 1995). Además, otras quinasas también participan en la fosforilación de cortactina, incluyendo la familia de quinasas Src, la familia de quinasas ABL, FER, SyK (Boyle et al., 2007; Sangrar et al., 2007; Zhang et al., 2009). La activación del receptor del factor de crecimiento de hepatocitos, HGFR (también conocido como MET) y del receptor del factor de crecimiento epidémico HER2 (también conocido como ERBB2), ambos del tipo tirosina quinasa, también estimulan la fosforilación de cortactina en células tumorales (Crostella et al., 2001; Garcia-Castillo et al., 2009).

La fosforilación en residuos de tirosina estimula la ruptura de cortactina por calpaína y esta ruptura media la formación de protrusiones dependiente de cortactina en el frente de migración (Perrin et al., 2006). También se ha descrito que la fosforilación de cortactina es necesaria para la endocitosis de receptores membrana (Luo et al., 2006; Smith-Pearson et al., 2010; Zhu et al., 2007). Además, la fosforilación en residuos tirosina causa el reclutamiento de proteínas con dominio SH2, incluyendo varias quinasas y NCK1, la cual conecta cortactina con N-WASP y WIP, permitiendo la activación del complejo Arp2/3 (Oser et al., 2010; Tehrani et al., 2007).

Cortactina también puede fosforilarse por quinasas de tipo serina/treonina. La serina/treonina quinasa PAK (p21 associated kinase), la cual tiene un papel crítico en la formación de podosomas y ruffles de membrana, es capaz de fosforilar a cortactina *in vitro* en el residuo Ser113, localizado en la primera repetición de cortactina (Webb et al., 2006). Las quinasas MEKs y ERKs también fosforilan a cortactina en los residuos Ser405 y Ser418 (Campbell et al., 1999). La fosforilación dependiente de ERK promueve la asociación de cortactina y N-WASP, aumentando así la polimerización de actina mediada por el complejo Arp2/3 (Martinez-Quiles et al., 2004). La proteína quinasa D (PKD) fosforila a cortactina en el residuo Ser298, lo cual se relaciona con un aumento en la migración celular mediado por la activación del complejo Arp2/3 (Eiseler et al., 2010). PKD también fosforila a cortactina en el residuo Ser348 en invadopodios de células de cáncer de mama, pero la función de la fosforilación de este residuo permanece aún sin describir (De Kimpe et al., 2009). En relación a los estudios sobre modificaciones postraduccionales de cortactina, resultados recientes indican que la fosforilación tanto en residuos de tirosina como serina puede ocurrir de manera simultánea, sugiriendo que cortactina puede integrar varias señales procedentes de rutas de señalización distintas (Kelley et al., 2010; Kelley et al., 2011).

Además de la fosforilación, cortactina también puede ser regulada por acetilación (Zhang et al., 2007), de modo que la acetilación permite la neutralización de las cargas de lisinas de las repeticiones de cortactina, lo cual conduce a la unión de cortactina y actina-F, reduciendo la movilidad celular (Rey et al., 2011).

8.3. CTTN, migración celular y cáncer.

La amplificación en el genoma y la sobre-expresión de cortactina han sido relacionados con diversos tipos de cáncer (Akervall et al., 1995; Cai et al., 2010; Campbell et al., 1996; Faoro et al., 2010; Xu et al., 2010). Puesto que cortactina se considera un marcador de cáncer agresivo, la sobre-expresión de cortactina se ha relacionado con una alteración en la progresión del ciclo celular dependiente de RhoA (Croucher et al., 2010) y una alteración en la migración celular. Recientemente, se ha descrito la expresión de cortactina como un factor clave en la secreción de la matriz extracelular (ECM), un proceso vinculado a la migración que podría explicar la importancia de cortactina en la motilidad celular (Sung et al., 2011).

Existe un consenso generalizado en el campo científico sobre la relevancia de cortactina en la formación y función de invadopodios. Estas estructuras son protrusiones ventrales de membrana que penetran en la ECM y contienen enzimas proteolíticas como las metaloproteasas (Weaver, 2006). Cortactina es esencial en la formación de invadopodios, posiblemente a través de proteínas de anclaje como TKS5 (tyrosine kinase substrate with five SH3 domains) (Artym et al., 2006; Ayala et al., 2008; Crimaldi et al., 2009; Webb et al., 2007). Además, cortactina también regula el tráfico y la secreción de metaloproteínas (MMPs) en el extremo en degradación del invadopodio, un paso crítico para la función de los invadopodios (Clark et al., 2007).

8.4. CTTN y la señalización mediada por Ca^{2+} .

El citoesqueleto de actina participa notablemente en una gran variedad de funciones celulares, incluyendo migración celular direccional y la organización y transporte de proteínas intracelulares y transmembranales. Tras la activación, el citoesqueleto de actina lleva a cabo la polimerización para formar filamentos de actina, los cuales permiten la creación de varias estructuras celulares como lamelipodios, filopodios y ondas (ruffles) de membrana (Porat-Shliom et al., 2013). Un paso crítico en la inducción rápida de la polimerización de la actina cortical es el proceso de nucleación o ramificación de actina, mediado por el complejo Arp2/3. Arp 2/3, que es un factor de nucleación, une filamentos de actina preexistentes facilitando la ramificación. Tal y como se ha descrito en el apartado 8.1 de este trabajo, Arp2/3 se une a cortactina incrementando su actividad de nucleación (Ren et al., 2009a; Weed and Parsons, 2001). Puesto que, como se ha mencionado anteriormente, el influjo de Ca^{2+} extracelular es crítico en la migración y en la actividad de ruffling (Berridge et al., 2003; Evans and

Falke, 2007), en este trabajo abordaremos la posible relación de SOCE, y más concretamente de STIM1 y ORAI1, sobre CTTN, que subyace a la formación de ruffles en el frente de avance de células en migración.

9. Regulación de la dinámica del citoesqueleto y migración celular mediada por Ca^{2+} .

Debido a que la localización y función de STIM1 y ORAI1 dependen en gran medida de los componentes del citoesqueleto actina y tubulina, el estudio de cómo SOCE y la dinámica de Ca^{2+} influyen en eventos dependientes de citoesqueleto, como adhesión y migración celular, es un tema de interés para muchos grupos de investigación.

Las adhesiones focales son complejos de macromoléculas que actúan como nexo de unión física entre el sustrato extracelular y el citoesqueleto. Este ensamblaje es muy dinámico y complejo, por lo que el mecanismo molecular por el cual Ca^{2+} regula el reciclaje de las adhesiones focales no se ha esclarecido completamente. Algunas proteínas que regulan el ensamblaje y disociación de las adhesiones focales son sensibles a la concentración de Ca^{2+} libre. Por ejemplo, la proteína dependiente de Ca^{2+} calpaína (Huttenlocher et al., 1997), que es la responsable de la ruptura de la proteína de citoesqueleto talina, provoca el aumento de la desorganización de las adhesiones focales. Además, el desensamblaje de otros componentes de las adhesiones focales, como paxilina, vinculina, y zyxina, ha sido descrito como dependiente de la ruptura de talina mediada por calpaína, lo que apoya el importante papel de la proteólisis de talina dependiente de Ca^{2+} en la regulación del reciclaje de las adhesiones focales (Franco et al., 2004). En este sentido, se ha descrito que la disminución de la expresión génica de STIM1 y ORAI1, utilizando RNA de interferencia, tiene un efecto significativo sobre el reciclaje de las adhesiones focales, alterando negativamente la migración *in vitro* e inhibiendo metástasis en células MDA-MB-231 (Yang et al., 2009). Yang y cols. también describieron que el tratamiento de células con SKF96365, un inhibidor de SOCE, inducía adhesiones focales de mayor tamaño *in vitro*, debido a la falta de reciclaje de las dichas estructuras, una observación que iba acompañada de la inhibición de la progresión tumorigénica en ratones mediada por este mismo inhibidor SKF96365 (Yang et al., 2009).

Las quinasas FAK (focal adhesion kinase) y PTK2B o PYK2 (proline-rich tyrosine kinase 2 beta) son quinasas que participan en el ensamblaje de las adhesiones focales (Mitra et al., 2005). La actividad de la quinasa PYK2 es necesaria para el reciclaje de las adhesiones focales. Chen y cols. abordaron el estudio de la correlación entre la estimulación por EGF, fosforilación por PYK2 y nivel de expresión de STIM1 en células siHA (Chen et al., 2011). EGF activa la autofosforilación de PYK2 en el residuo Tyr402 y esta fosforilación es inhibida por el silenciamiento de STIM1 con siRNA. Además, independientemente de la estimulación con EGF, el knock-down de STIM1 produjo un aumento en el tamaño de las adhesiones focales (debido a la falta de reciclaje de dichas estructuras), confirmando que la entrada de Ca^{2+} promueve el reciclaje de las adhesiones focales. Del mismo modo, EGF indujo la fosforilación de FAK en la Tyr397, necesaria para el reciclaje de las adhesiones focales y se demostró que dicha fosforilación se inhibía con el silenciamiento de STIM1 (Chen et al., 2011).

En este sentido, se conoce que EGF causa la activación de la ruta de señalización de fosfoinosítidos, generando la activación de IP3 y la liberación de Ca^{2+} desde el RE. EGF también activa la ruta de las quinasas MAPK. Como consecuencia de la activación con EGF, STIM1 se fosforila en residuos diana de ERK1/2 (Ser575, Ser608 y Ser621), permitiendo la disociación de los microtúbulos (ej. EB1) y la activación de SOCE (Casas-Rua et al., 2015). Casas-Rua y cols. describieron que la sobre-expresión de mutantes que emulaban una desfosforilación constitutiva de STIM1 (STIM1-S575A/S608A/S621A) bloqueaban la ruta de señalización de EGF, inhibiendo la migración celular en células de adenocarcinoma endometrial Ishikawa (Casas-Rua et al., 2015). El efecto de STIM1 también se observó a nivel genómico, ya que la sobre-expresión ectópica de STIM1-S575A/S608A/S621A produjo un bloqueo de la transición epitelio-mesénquima (EMT) de células Ishikawa tratadas con EGF, sugiriendo un papel crítico de la fosforilación de STIM1 en la regulación de la migración celular y la transformación celular que da lugar al fenotipo mesenquimal.

El incremento en los niveles de Ca^{2+} citosólico también regula actomiosina, el complejo macromolecular formado por actina y miosina que dirige la fuerza mecánica necesaria para la contracción celular durante la migración. La contracción de células no musculares está controlada por la miosina II, no muscular, mediante la fosforilación de sus cadenas ligeras (MLC2) en la Ser19 de manera dependiente de Ca^{2+} (Vicente-Manzanares et al., 2009). Esta fosforilación puede bloquearse por el inhibidor de canales de Ca^{2+} SKF96365, y también por el silenciamiento de la expresión de STIM1 (Chen et al., 2013), indicando que la entrada de Ca^{2+} mediada por STIM1 tiene un papel

importante en la activación de MLC2 y en la reorganización del citoesqueleto de actina-miosina en células migratorias.

Además de las adhesiones focales, podosomas e invadopodios son también estructuras de adhesión regulados por la señalización mediada por Ca^{2+} . Sun y cols. describieron que la invasión de melanoma se ve aumentada por STIM1-ORAI1 mediante las oscilaciones de Ca^{2+} citosólico, las cuales promueven la formación de invadopodios y la degradación de la matriz extracelular (ECM)(Sun et al., 2014). Estos autores describieron que la señalización de Ca^{2+} mediada por STIM1-ORAI1 es esencial para la formación de invadopodios sobre una matriz de colágeno, y que la adición del inhibidor SKF96365, o el tratamiento con el quelante de Ca^{2+} extracelular EGTA, producen un bloqueo en el ensamblaje de los invadopodios. Además, la sobreexpresión ectópica de STIM1 o STIM1-ORAI1 aumentó los niveles de fosforilación de la quinasa Src en el residuo Tyr416, sin causar ninguna alteración en los niveles de fosfo-FAK. Este efecto fue observado en células MCF-7 (células de cáncer de mama), NMuMG (células epiteliales de mama de ratón) y WM793 (células de melanoma), en las cuáles la activación de la entrada de Ca^{2+} con taspigargina o el ionóforo A23187 dio lugar a los mismos resultados, el incremento de la quinasa Src fosforilada en la Tyr416. Por otro lado, el shRNA de STIM1, la quelación de Ca^{2+} extracelular, o la inhibición de SOCE con 2-APB, producen una reducción en los niveles de fosforilación de la quinasa Src en Tyr416, lo que sugiere un papel directo del influjo de Ca^{2+} mediado por STIM1-ORAI1 en la activación de la quinasa Src y en la formación de invadopodios (Sun et al., 2014).

En resumen, la información descrita hasta ahora sugiere que una de las dianas principales de SOCE es el citoesqueleto y que la dinámica en el ensamblaje de las adhesiones focales así como la dinámica del citoesqueleto de actina y tubulina están fuertemente reguladas por la cinética de entrada de Ca^{2+} a través de los canales operados por depósitos intracelulares.



Objetivos

La motilidad celular es un evento celular complejo que requiere la reorganización del citoesqueleto. Esta reorganización sucede en paralelo a una polarización transitoria de la célula para facilitar las ondas de membrana, conocidas como ruffling, una reorganización dinámica del citoesqueleto de actina necesaria para el desarrollo de protrusiones celulares. La señalización que controla estos eventos permanece aún sin esclarecer pero es conocido que el influjo de Ca^{2+} extracelular es esencial para la migración y para el mantenimiento de las estructuras que mantienen la actividad del ruffling de membrana en la región de avance de células en migración. Por ello, en esta Tesis Doctoral nos hemos planteado como objetivo general estudiar la reorganización del citoesqueleto mediada por SOCE en células en migración y para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar el efecto del influjo de Ca^{2+} extracelular y SOCE sobre la activación de ERK1/2 para establecer qué tipo de interdependencia existe entre SOCE y ERK1/2.
2. Analizar la localización intracelular de STIM1 y ORAI1 en células estimuladas para promover migración celular, y estudiar co-localización e interacción con componentes del citoesqueleto.
3. Determinar el impacto de la supresión de todas las variantes transcripcionales (conocidas) de STIM1 y ORAI1 sobre la migración celular y la formación de lamelipodios en el frente de migración mediante la generación de líneas celulares modificadas con el sistema CRISPR/Cas9.
4. Definir un modelo que explique la distribución asimétrica de la señalización celular mediada por SOCE que permita la reorganización del citoesqueleto en células en migración.



Resultados

1. ESTUDIO DE LA INTERRELACIÓN ENTRE SOCE Y ERK1/2

Un objetivo esencial de este trabajo es el estudio de la regulación del citoesqueleto por SOCE. Como hemos mencionado en el apartado de Introducción, se ha determinado que la fosforilación de STIM1 en sitios dianas de ERK1/2 es crítica para la completa activación de SOCE. Sin embargo, existen 2 hipótesis relacionadas con la activación de ERK1/2: (1) SOCE es necesaria para la activación de ERK1/2, y (2) la actividad ERK1/2 es necesaria para la completa activación de SOCE. Para analizar el papel de SOCE en la regulación del citoesqueleto hemos abordado un primer objetivo en el que analizamos el papel del calcio extracelular y SOCE sobre la activación de las quinasas ERK1/2, ya que existen numerosos componentes del citoesqueleto que son dianas de ERK1/2. Para llevar a cabo este estudio se optimizaron las condiciones de cultivo celular que permitieran obtener un nivel bajo de fosforilación de la ruta de las quinasas MAPK y se utilizó como estímulo EGF para valorar la activación de esta ruta de señalización. También se diseñaron experimentos para optimizar las condiciones de ensayo adecuadas en ausencia de Ca^{2+} extracelular para comparar posteriormente el nivel de activación de ERK1/2 en ausencia o presencia de Ca^{2+} .

1.1. Activación de las quinasas MAPK en ausencia de Ca^{2+} extracelular.

En el desarrollo de este trabajo y para este objetivo concreto se utilizó como modelo de estudio la línea celular PC3 que deriva de un de cáncer de próstata. Esta línea celular se caracteriza por presentar un alto nivel en la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), así como un nivel basal de fosfo-ERK1/2 muy bajo, condiciones que permiten un estudio en profundidad de la activación de ERK1/2 en células en cultivo.

Para evaluar el papel de la entrada de Ca^{2+} extracelular en la activación de la cascada de señalización de las MAPK se diseñó un experimento preliminar que nos permitiera determinar el nivel de fosforilación de estas quinasas tras ser privadas de suero durante diferentes tiempos. Para ello, las células PC3 se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de suero durante un mínimo de 24 horas. A continuación, el medio de cultivo se sustituyó por medio DMEM sin suero. Finalmente, las células se privaron de suero durante diferentes tiempos (de 6 a 12 horas), se lisaron y se determinó el nivel de fosforilación de las quinasas MAPK mediante inmunoblot. En este sentido, se monitorizó el nivel de fosforilación de las quinasas ERK1/2 y p38 MAPK, y el nivel de fosforilación de c-Jun, sustrato de la quinasa JNK1/2

(c-Jun N-terminal kinase). En la figura 10 se muestra el nivel de fosforilación de fosfo-ERK1/2, fosfo-p38 MAPK y fosfo-c-Jun, así como el nivel total de ERK1/2, p38 MAPK y c-Jun. Los resultados de este experimento muestran que los residuos Thr180/Tyr182 de p38 MAPK se desfosforilaron tras 6 horas de privación de suero, mientras que la JNK1/2 se inactivó tras una privación de suero de 12 horas. La quinasa ERK1/2 permanece inactiva en todas las condiciones del ensayo debido a que la actividad basal de ERK1/2 es muy baja en la línea celular PC3. Esta característica de las células PC3 es el resultado de la ausencia de la fosfatasa PTEN (Vlietstra et al., 1998) y la consecuente sobre-activación de la quinasa PKB (Yamada and Araki, 2001), la cual regula negativamente la ruta de señalización de ERK1/2. Para el estudio del nivel de fosforilación de la quinasa ERK1/2 utilizamos como control positivo del experimento lisados de células HEK293 estimuladas con taspigargina 1 μM (Tg) que se analizaron en paralelo a las muestras de PC3, confirmando así la especificidad del anticuerpo anti-fosfo-ERK1/2. El resultado de este experimento nos permitió determinar que tras 12 horas de privación de suero las quinasas ERK1/2, p38 y JNK1/2 se encuentran desfosforiladas e inactivas, de modo que para evaluar la activación de la cascada de señalización de las quinasas MAPK sería conveniente privar de suero estas células al menos 12 horas.

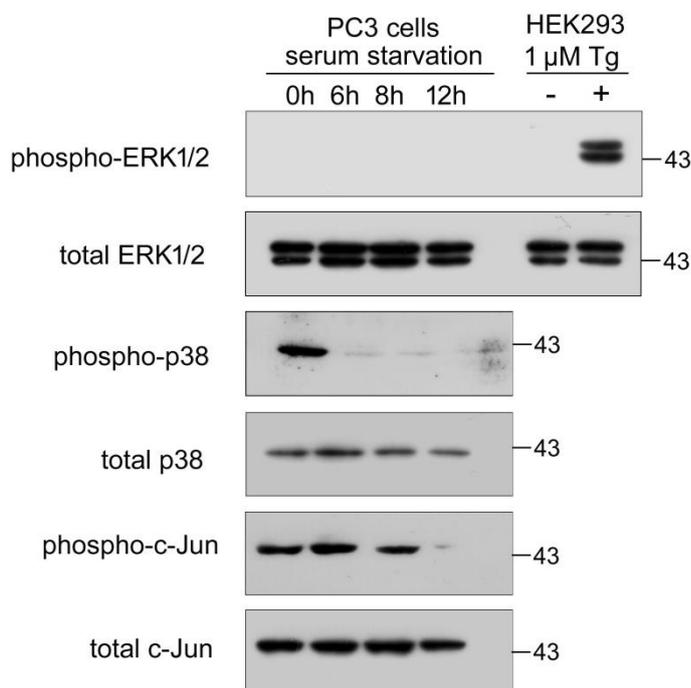


Figura 10. Inactivación de la ruta de las quinasas MAPK mediante privación de suero. Las células PC3 se sembraron y tras 24 horas en cultivo se privaron de suero durante 6-12 horas. La activación de las quinasas MAPK se evaluó mediante inmunoblot utilizando 20 μg de proteína de lisado total. La activación de la quinasa JNK se evaluó monitorizando el nivel de fosforilación de su sustrato c-Jun en el residuo Ser63. Para todos los casos, se analizó el nivel de proteína total (control de carga). Como control adicional del inmunoblot de fosfo-ERK1/2 se utilizaron células HEK293 tratadas con Tg (1 μM). Los inmunoblots son representativos de 2 ensayos independientes.

Una vez establecidas las condiciones de cultivo adecuadas para lograr un bajo nivel de fosforilación de las MAPK, estudiamos la activación de esta ruta de señalización tras el tratamiento con EGF. Para ello, las células PC3 privadas de suero durante 12

horas se trataron durante 10 min con diferentes concentraciones de EGF (5, 10, 50 y 100 ng/ml) en medio HBSS libre de Ca^{2+} . La activación de ERK1/2 se determinó por inmunoblot mediante la monitorización de fosfo-ERK1/2. En la figura 11, los resultados muestran una activación máxima de fosfo-ERK1/2 con una concentración de EGF de 50 ng/ml, dentro del rango de concentraciones de EGF utilizadas por otros grupos de investigación. A partir de estos resultados se estableció la concentración de EGF de 50 ng/ml para el estudio de la activación de las rutas de señalización de las quinasas MAPK en ausencia de Ca^{2+} extracelular.

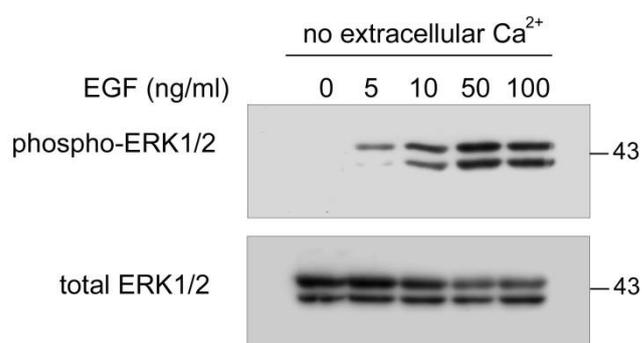


Figura 11. Concentración de EGF necesaria para la activación de ERK1/2 en ausencia de Ca^{2+} extracelular. Las células PC3 se privaron de suero durante 12 horas y se trataron con concentraciones crecientes de EGF (5-100 ng/ml) en HBSS libre de Ca^{2+} . El nivel de fosfo-ERK1/2 se evaluó mediante inmunoblot utilizando 20 μg de proteína de lisado total. Los inmunoblots son representativos de 3 ensayos independientes.

Además, en este estudio se utilizó el inhibidor PD0325901, un inhibidor de MEK1/2, que por tanto inhibe específicamente la activación de ERK1/2 y se analizó su efecto sobre las quinasas p38 y JNK1/2 en nuestras condiciones de ensayo. Para ello, las células PC3 se pre-incubaron durante 10 min con PD0325901 (0.1 μM) y a continuación se añadió el tratamiento con EGF en HBSS libre de Ca^{2+} en presencia y ausencia de dicho inhibidor. En la figura 12 se muestra la inhibición completa de fosfo-ERK1/2 en presencia de PD0325901, validando así los resultados obtenidos por inmunoblot y la activación de fosfo-ERK1/2 en respuesta a EGF sin Ca^{2+} extracelular. En las mismas condiciones experimentales, en presencia de EGF y sin Ca^{2+} extracelular, también se estudió la activación de las quinasas p38 MAPK y JNK1/2, mostrando nuestros resultados que ambas se activan en respuesta a EGF como muestran los niveles de fosforilación de fosfo-p38 MAPK y de fosfo-c-Jun (figura 12) pero no se inhiben en presencia del inhibidor PD0325901. Estos resultados mostraron la especificidad del inhibidor PD0325901 sobre la actividad de la quinasa ERK1/2, que no afectó a las quinasas p38 y JNK1/2.

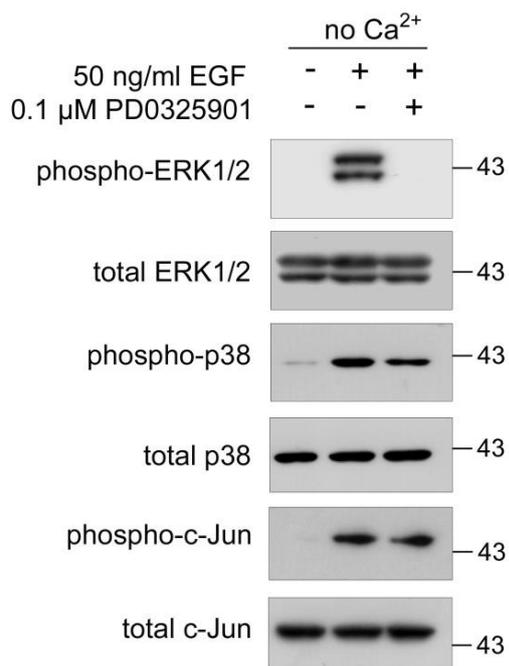


Figura 12. Activación de ERK1/2 mediada por EGF en ausencia de Ca²⁺ extracelular. Las células PC3 se privaron de suero durante 12 horas y se trataron con EGF 50 ng/ml en HBSS libre de Ca²⁺ en ausencia o presencia del inhibidor PD0325901 (0.1 μM). La activación de ERK1/2, p38 MAPK y JNK1/2 se evaluó mediante inmunoblot utilizando 20 μg de lisado total. Los inmunoblots son representativos de 3 ensayos independientes.

1.2. EGF activa la fosforilación de STIM1, sustrato de ERK1/2.

Un sustrato conocido de la quinasa ERK1/2 es STIM1 (Pozo-Guisado et al., 2010; Pozo-Guisado et al., 2013; Pozo-Guisado and Martin-Romero, 2013), el principal regulador de la entrada de Ca²⁺ operada por depósitos (SOCE) (Liou et al., 2005; Zhang et al., 2005). En este sentido, nos propusimos evaluar la fosforilación de STIM1 dependiente de ERK1/2 tras el tratamiento con EGF y en ausencia de Ca²⁺ extracelular. Para estudiar la fosforilación de STIM1 utilizamos anticuerpos fosfo-específicos de los residuos diana de ERK1/2: Ser575, Ser608 y Ser621. Para ello se utilizaron las condiciones de cultivo mostradas en el apartado anterior, es decir, privación de suero durante 12 horas y tratamiento con EGF 50 ng/ml en HBSS libre de Ca²⁺ durante 10 min. Nuestros resultados muestran que el nivel de fosforilación de STIM1 endógeno es indetectable en lisados totales de células PC3 (figura 13). Obsérvese que como control positivo del experimento se utilizaron células HEK293 que sobre-expresan Flag-STIM1, tratadas con taspigargina.

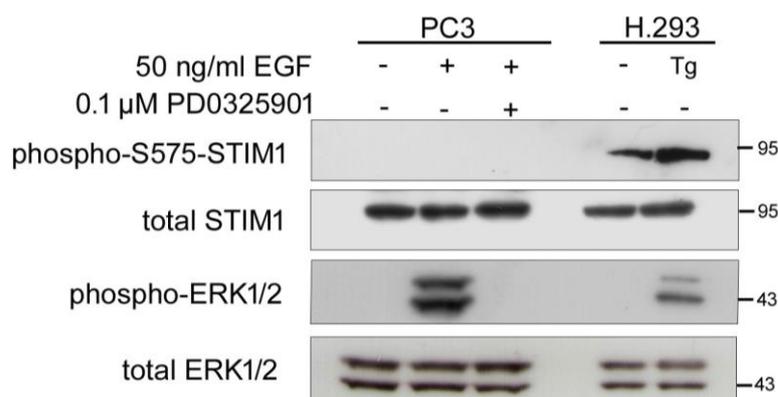


Figura 13. Nivel de fosforilación de STIM1 endógeno en células PC3. Las células PC3 se privaron de suero durante 12 horas y se trataron con EGF 50 ng/ml en medio HBSS sin Ca^{2+} , en ausencia o presencia del inhibidor PD0325901 (0.1 μ M). Como control positivo del experimento se utilizaron células HEK293 que sobre-expresan Flag-STIM1, que se trataron con taspigargina (1 μ M). Se utilizaron 20 μ g de proteína de lisado total para monitorizar por inmunoblot el nivel de fosfo-STIM1 (phospho-S575), total STIM1, fosfo-ERK1/2 y total ERK1/2.

Para poder abordar el estudio de fosfo-STIM1 tras la activación de ERK1/2 con EGF nos propusimos determinar las condiciones experimentales más adecuadas para sobre-expresar Flag-STIM1 en esta línea celular. En primer lugar, transfectamos una cantidad fija de DNA (1.5 μ g/placa de 10 cm de diámetro) a distintas horas tras la siembra, para evaluar así el tiempo más adecuado para realizar la transfección. En la figura 14 observamos que la transfección a partir de las 4-8 horas de la siembra permite un nivel alto de expresión de Flag-STIM1, de modo que se escogió un tiempo de 8 horas tras la siembra para transfectar las células PC3 con las construcciones de DNA para la expresión transitoria de Flag-STIM1.

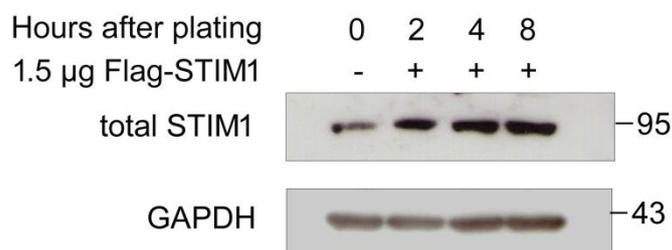


Figura 14. Optimización del tiempo adecuado para transfectar las células PC3 tras la siembra. Las células PC3 se transfectaron con 1.5 μ g de DNA (pCMV-Flag-STIM1) a distintos tiempos tras la siembra (0-8 horas). La eficiencia de la transfección se evaluó monitorizando el nivel de expresión de Flag-STIM1 mediante inmunoblot, con un anticuerpo anti-STIM1 y utilizando 20 μ g de lisado total. Los inmunoblots son representativos de 2 ensayos independientes.

También se realizó un ensayo para determinar la cantidad de DNA adecuada para obtener un nivel alto de expresión de Flag-STIM1 en PC3. Para ello, se sembraron las células y 8 horas más tarde se transfectaron con distintas cantidades de DNA. En la

Resultados

figura 15 observamos que el nivel de expresión máximo de Flag-STIM1 se alcanza al transfectar con 3 μg de DNA, puesto que esta cantidad es la única que se detectó en el inmunoblot frente al marcador anti-Flag. En relación a estos resultados consideramos que las condiciones óptimas de transfección de Flag-STIM1 en la línea celular PC3 son: Transfección tras 8 horas de siembra y 3 μg de DNA por placa de 10 cm de diámetro.

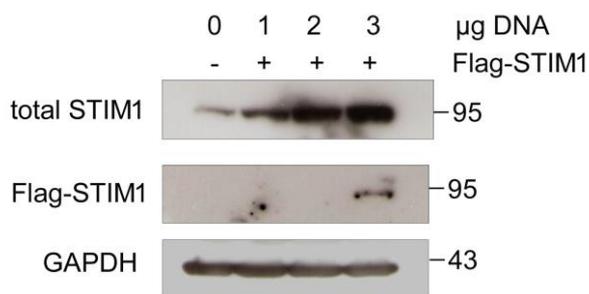


Figura 15. Optimización de la cantidad de DNA adecuada para la transfección transitoria de Flag-STIM1 en PC3. Las células PC3 se sembraron y tras 8 horas se transfectaron con 0-3 μg de DNA (pCMV-Flag-STIM1). La eficiencia de la transfección se analizó mediante la expresión de Flag-STIM1 por inmunoblot utilizando 20 μg de lisado total y anticuerpos específicos anti-STIM1 y anti-Flag. Los inmunoblots son representativos de dos ensayos independientes.

Tras optimizar todas estas condiciones experimentales pasamos a evaluar el nivel de fosfo-STIM1 en respuesta a EGF en células PC3 que sobre-expresan Flag-STIM1. Las células se transfectaron para la expresión transitoria de Flag-STIM1 y, tras una privación de suero de 12 horas, se trataron con EGF 50 ng/ml en HBSS libre de Ca^{2+} durante 10 min. La fosforilación en respuesta al tratamiento con EGF se analizó en presencia o ausencia del inhibidor de MEK1/2, PD0325901 (0.1 μM). Como control del ensayo se utilizaron células HEK293 que sobre-expresan Flag-STIM1 tratadas con taspigargina 1 μM en medio HBSS sin Ca^{2+} , condiciones experimentales que inducen la activación de ERK1/2 y la fosforilación de STIM1 y que ya han sido descritas anteriormente (Pozo-Guisado et al., 2010; Pozo-Guisado et al., 2013). En la figura 16 podemos observar que ERK1/2 se activa en respuesta a EGF en ausencia de Ca^{2+} extracelular, y que esta activación ocurre en paralelo a la fosforilación de STIM1 en los residuos diana de ERK1/2, siendo esta fosforilación inhibida en respuesta a PD0325901.

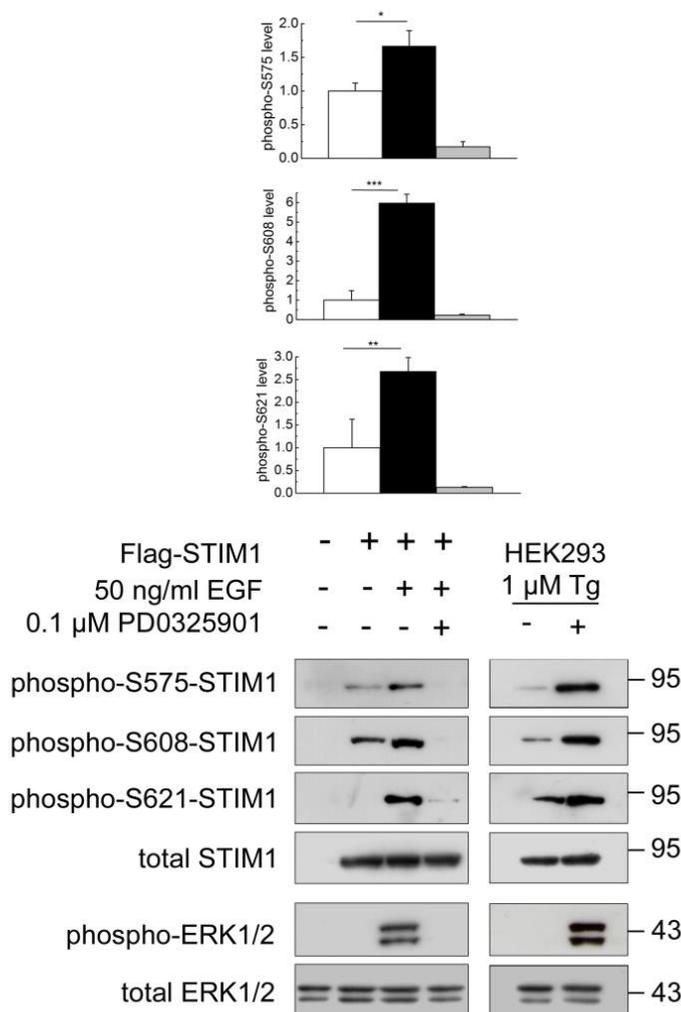


Figura 16. Nivel de fosforilación de STIM1, sustrato de ERK1/2, en medio libre de Ca^{2+} extracelular.

Las células PC3 se transfectaron para la expresión transitoria de Flag-STIM1 y 24 horas tras la transfección se privaron de suero durante 12 horas. Las células se trataron con EGF (50 ng/ml) durante 10 min en HBSS libre de Ca^{2+} en presencia o ausencia de PD0325901 (0.1 μ M). Los niveles de fosfo-ERK1/2 y fosfo-STIM1 (pSer575, pSer608, y pSer621) se evaluaron mediante inmunoblot utilizando 40 μ g de lisado total. Como control del experimento se utilizaron células HEK293 que sobre-expresan Flag-STIM1 y que fueron tratadas con taspigargina 1 μ M en HBSS libre de Ca^{2+} . Los datos representan la media \pm desviación estándar (s.d.) de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó utilizando el test estadístico t-test. (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.001$.

Los resultados mostrados hasta ahora indican que las quinasas ERK1/2 se fosforilan en ausencia de Ca^{2+} extracelular y que en estas condiciones ERK1/2 fosforilan a su sustrato, STIM1, en los residuos Ser575, Ser608 y Ser621. Por lo tanto nuestro siguiente objetivo fue estudiar cómo afecta la presencia de Ca^{2+} extracelular a la fosforilación de ERK1/2 y de STIM1 y determinar si en presencia de Ca^{2+} hay un incremento o disminución en el nivel de fosforilación de estas proteínas. Para ello las células PC3 se sembraron, se privaron de suero durante 12 horas y se estimularon

Resultados

con EGF (50 ng/ml) en presencia y ausencia de Ca^{2+} extracelular. Los resultados de la figura 17 muestran que no hay un incremento significativo en el nivel de activación de ERK1/2 en presencia de Ca^{2+} extracelular.

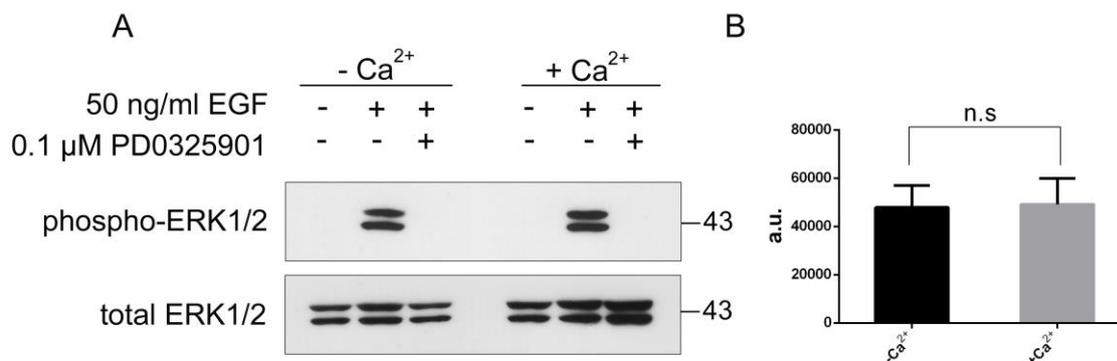


Figura 17. La activación de ERK1/2 es independiente del influjo de Ca^{2+} extracelular. *Panel A:* Las células PC3 se privaron de suero durante 12 horas y se trataron con EGF 50 ng/ml en presencia o ausencia de Ca^{2+} extracelular. El nivel de fosfo-ERK1/2 y total-ERK1/2 se evaluó mediante inmunoblot utilizando 20 μg de lisado total. Los inmunoblots son representativos de 4 experimentos independientes. *Panel B:* Los datos se analizaron mediante densitometría utilizando el software imageJ. En la gráfica se representa la media \pm s.d. de los datos de 4 experimentos diferentes. El análisis estadístico se realizó utilizando el test t-student para muestras independientes. n.s. (no significativo).

Estos resultados apoyan la conclusión de que la entrada de Ca^{2+} extracelular no es necesaria para la activación de ERK1/2 en respuesta a EGF. Tal y como se ha comentado previamente, otros trabajos de investigación han sugerido que SOCE podría ser un activador de ERK1/2 (Soltoff and Lannon, 2013; Umemura et al., 2014), aunque en estos trabajos las células se estimularon con FBS (suero), taspigargina o carbacol. Sin embargo, nuestros resultados apoyan un modelo de señalización diferente, ya propuesto en trabajos anteriores (Pozo-Guisado et al., 2010; Pozo-Guisado et al., 2013) en el cual la activación de ERK1/2 es un evento necesario para la completa activación de SOCE. En este sentido, y para determinar si existe alguna contribución específica de SOCE en la activación de las quinasas ERK1/2, se diseñaron experimentos en los que la actividad de los canales SOC estuviera disminuida. Puesto que la actividad de estos canales depende de la actividad de STIM1, nos propusimos generar una línea celular PC3 defectiva en STIM1 (STIM1-KO) y así disminuir por completo la entrada de Ca^{2+} dependiente de STIM1 a través de los canales SOC.

1.3. Generación de la línea PC3 STIM1-KO mediante el sistema de edición genómica CRISPR/Cas9.

Utilizando el sistema de edición genómica CRISPR/Cas9 diseñamos una estrategia para modificar el locus de *STIM1* en la línea PC3. Las células se transfectaron para la expresión de la nucleasa Cas9 D10A (Cas9 nickase, o Cas9n), reduciendo así el riesgo de cortes inespecíficos en la doble cadena de DNA (Ran et al., 2013), y se emplearon RNAs guías específicos para actuar sobre las tres variantes transcripcionales conocidas de *STIM1* humano NP_001264890.1, NP_001264891.1, y NP_003147.2 (figura 18).

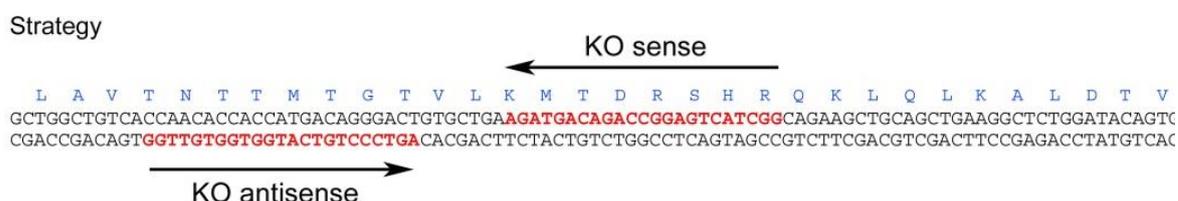


Figura 18. Estrategia para la obtención del knock-out para la expresión de *STIM1* mediante el sistema CRISPR/Cas9. Secuencia de los RNAs guías empleados para causar un doble corte en la doble cadena de DNA en el exón 5 del locus de *STIM1* (marcadas en rojo).

Tras 24 horas de recuperación y dos días adicionales en medio de selección con puromicina las células se cultivaron hasta obtener una monocapa, momento en el que se analizó el cultivo celular para comprobar la eficiencia de la modificación genómica. Para ello se llevó a cabo un análisis previo del nivel de expresión de la proteína *STIM1* mediante inmunoblot utilizando como control una muestra de lisado de células PC3 wild-type (figura 19).



Figura 19. Análisis del pool inicial de células PC3 modificadas genéticamente para la obtención de un knock-out de *STIM1*. Las células PC3 se transfectaron para la expresión de la nucleasa Cas9 D10A y RNAs guías específicos para la obtención de un knock-out de *STIM1*.

Tras la selección con puromicina se obtuvo un lisado celular mixto y se analizó la expresión de *STIM1* total mediante inmunoblot utilizando 30 µg de lisado y un anticuerpo anti-*STIM1*. Como control de carga de proteína se analizó el nivel de GAPDH.

En la figura 19 observamos en las células transfectadas (KO) un nivel de expresión de STIM1 muy inferior a la muestra control (WT). La banda inmunoreactiva que aparece en la condición STIM1-KO se debe a que el lisado procede de un cultivo celular mixto, es decir, que tras el tratamiento con puromicina no todas las células supervivientes muestran un silenciamiento o bloqueo de la síntesis de STIM1. Con este primer análisis queda demostrado que un alto porcentaje de la población celular es positivo para el knock-out de STIM1, y por ello el siguiente paso consistió en generar clones individuales de las células KO y continuar el cultivo de las mismas hasta obtener una monocapa celular. A continuación los cultivos celulares procedentes de cada clon individual se analizaron por inmunoblot para detectar el nivel de expresión de STIM1 y se observó que varias muestras (procedentes de los clones 3B, 6E y 7D) no presentaban niveles detectables de STIM1 (figura 20).

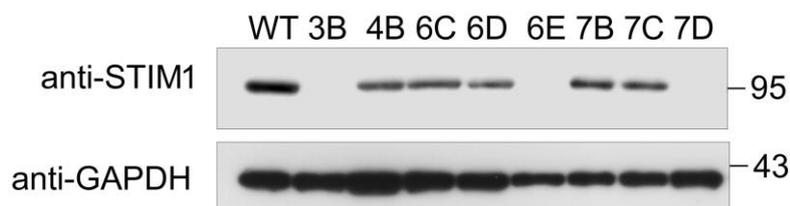


Figura 20. Selección de clones positivos para el knock-out de STIM1. Las células PC3 procedentes del cultivo mixto se individualizaron mediante citometría de flujo y los diferentes clones aislados se cultivaron hasta la obtención de monocapas celulares. Los cultivos se lisaron y de cada muestra se utilizaron 30 µg de proteína para el análisis de la expresión de STIM1 mediante inmunoblot. Las muestras 3B, 6E y 7D no presentan niveles de STIM1 detectables. Como control de carga se evaluó el nivel de GAPDH.

Para llevar a cabo nuestros experimentos y poder valorar el papel de STIM1 y SOCE en la activación de ERK1/2 seleccionamos uno de los clones positivos para el knock-out de STIM1 (clon 3E) y lo caracterizamos en detalle mediante secuenciación genómica. La secuenciación del sitio diana de DNA del clon seleccionado mostró una inserción de 16 pb (pares de bases) como única modificación a partir de la secuenciación de 12 fragmentos de PCR subclonados, por lo que podemos confirmar que esta modificación (inserción de 16 pb) estaba presente en ambos alelos. Como resultado de esta modificación genética se produce un cambio en la fase de lectura ribosomal del mRNA y la aparición de un codón de parada prematuro, que impide la síntesis de STIM1 (figura 21). Una vez determinada la mutación que produce el silenciamiento de STIM1 en el clon 3E, comprobamos la ausencia de expresión de la proteína STIM1 utilizando dos anticuerpos comerciales que reconocen diferentes epítomos, localizados en las regiones C- y N-terminal de la proteína. En el resultado del

inmunoblot (figura 22) observamos que no se detecta expresión de STIM1 con ninguno de los anticuerpos, resultado que confirma la generación de la línea PC3 STIM1-KO.

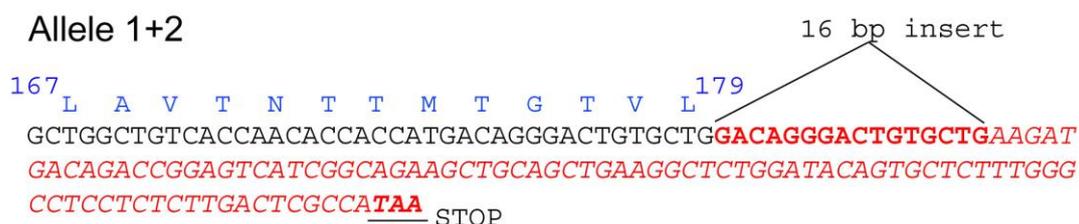


Figura 21. Secuenciación del DNA genómico en el clon STIM1-KO seleccionado. El clon de células seleccionado para el knock-out de la expresión de STIM1 se analizó mediante secuenciación del DNA genómico. La secuencia diana (ver figura 18) fue amplificada por PCR y los fragmentos subclonados para a continuación secuenciar 12 colonias conteniendo estos productos de PCR. Se detectó una única modificación: inserción de 16 pb, que por lo tanto consideramos común a los dos alelos. El inserto de 16 pb y el codón de parada prematuro se indican en la figura. La secuencia proteica nativa se indica en azul (residuos 167-179), mientras que la secuencia del transcrito modificada por el cambio de fase de lectura se indica en rojo.

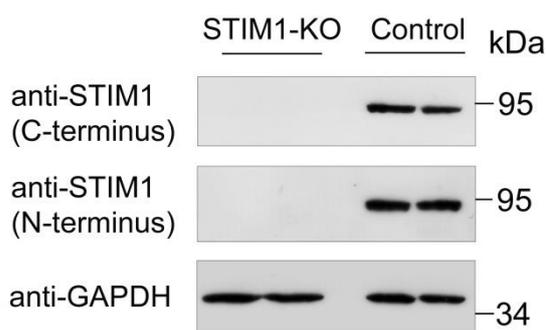


Figura 22. Análisis de la expresión de STIM1 mediante inmunoblot en la línea PC3 STIM1-KO. La expresión de STIM1 se analizó mediante inmunoblot utilizando dos anticuerpos comerciales que reconocen diferentes epítomos de STIM1 en los extremos C-terminal y N-terminal de la proteína. En la condición STIM1-KO no se detectó STIM1 con ninguno de los anticuerpos. Como control del experimento se utilizaron muestras de lisado total de PC3 WT (control). El nivel de expresión de GAPDH se evaluó como control de carga de las muestras.

1.4. Caracterización inicial de la línea celular PC3 STIM1-KO.

La caracterización de la línea celular PC3 STIM1-KO se abordó en primer lugar mediante el análisis del ciclo celular para estudiar si la modificación genética generada en el locus de *STIM1* provocaba alguna alteración en la distribución de las células en el ciclo celular o en el nivel de muerte celular. Para ello, las células STIM1-KO se sembraron y se dejaron crecer hasta alcanzar una confluencia del 50-60%, lo que representa un mínimo de 48 horas en cultivo (más de 2 veces la extensión de un ciclo celular completo), momento en el que se fijaron con etanol al 70%, para su posterior tinción con yoduro de propidio y análisis en citómetro de flujo. Como control del experimento también se analizaron células PC3 parentales (wild-type). En la figura 23 observamos que existen diferencias en la distribución del ciclo celular entre células

parentales y STIM1-KO, observándose un aumento tanto en el número de células en la fase G0/G1 como un aumento en el número de células apoptóticas en la línea STIM1-KO.

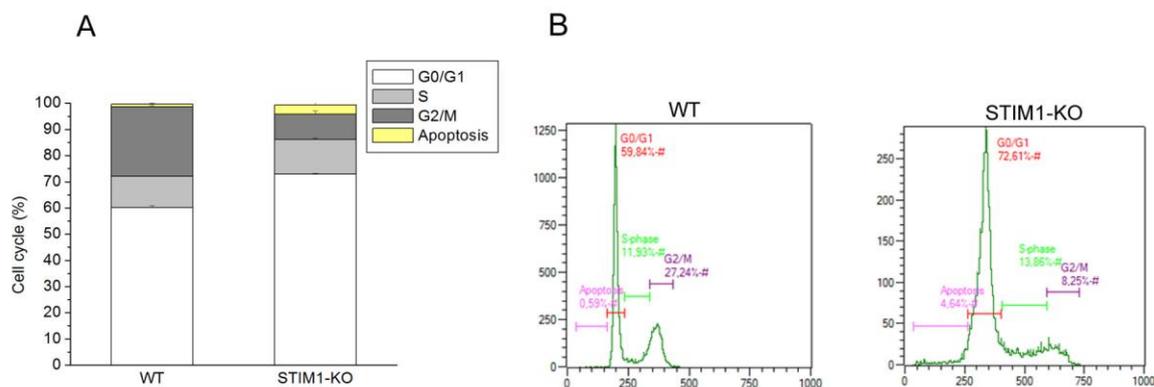


Figura 23. Distribución de ciclo celular de células PC3 wild-type y STIM1-KO. Las células se cultivaron durante 48 horas y se fijaron con etanol al 70%. Las distintas fases del ciclo celular y el número de células apoptóticas de cada línea celular se analizó mediante citometría de flujo. *Panel A:* Los datos obtenidos en el análisis se representan en una gráfica de columnas apiladas. *Panel B:* Histogramas representativos de los datos obtenidos del análisis de citometría de flujo con la identificación de las distintas fases del ciclo celular.

Si bien estas diferencias en el ciclo celular son significativas, la valoración de estas diferencias en la distribución del ciclo celular se encuentra fuera de los objetivos a desarrollar en este trabajo de investigación por lo que serán abordados por proyectos futuros de nuestro grupo de investigación, y no suponen en cualquier caso un problema a la hora de trabajar con estas células para los objetivos previstos en esta Tesis Doctoral.

Como se ha descrito ampliamente en la Introducción, la participación de STIM1 es esencial en la activación de SOCE, por lo que a continuación nos propusimos evaluar el efecto de la pérdida de STIM1 sobre SOCE mediante la medida del influjo de Ca^{2+} y comprobar así si esta ruta de entrada de Ca^{2+} extracelular se encontraba alterada. La medida de SOCE se llevó a cabo siguiendo el protocolo estándar que se detalla en el apartado de Materiales y Métodos. De forma abreviada, las células PC3 se cargaron con fura 2-AM, y a continuación y en HBSS libre de Ca^{2+} se trataron con tapsigargina (Tg) 1 μ M para inducir el vaciado de depósitos intracelulares. Pasados 6 min del tratamiento con Tg se añadió $CaCl_2$ 2 mM al medio extracelular y se cuantificó el incremento de la concentración de Ca^{2+} en el citosol (figura 24). El tratamiento con Tg produjo un incremento rápido y transitorio en el ratio F340/F380, que es indicador de la salida de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático (RE). La rápida disminución en la $[Ca^{2+}]_i$ hasta niveles basales se debe a la extrusión de Ca^{2+} al medio extracelular por la PMCA

(Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPasa), insensible a Tg. El incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que se observa al añadir CaCl_2 2 mM al medio extracelular corresponde principalmente a la apertura de los canales SOCs. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en este tipo de ensayos se mide $[\text{Ca}^{2+}]_i$, y por tanto el resultado observado es una combinación de la actividad de los canales SOC, junto con otros canales de Ca^{2+} , bombas, intercambiadores y moléculas tamponadoras. Además, también se realizó una medida de la entrada de Ca^{2+} en respuesta a EGF en ambas líneas celulares. En este último experimento las células se trataron con EGF 50 ng/ml + CaCl_2 2 mM.

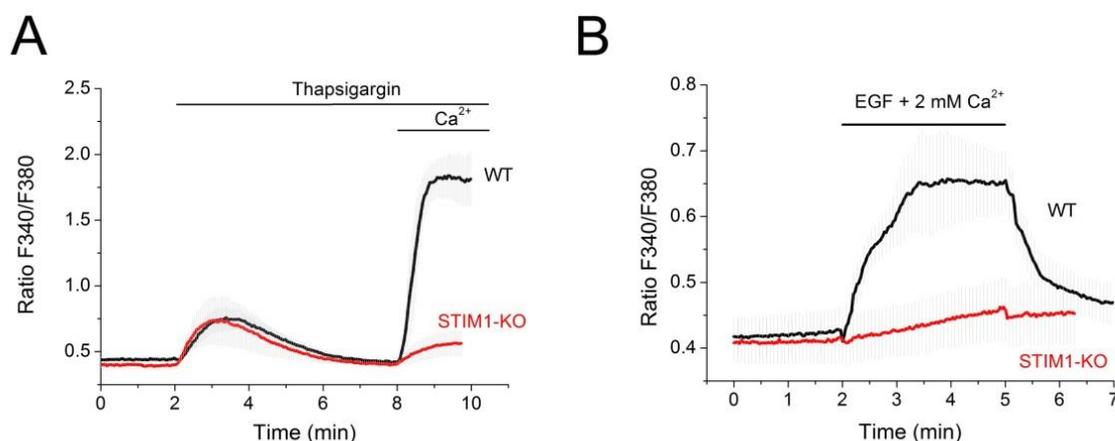


Figura 24. Medida de SOCE en células PC3 parentales y STIM1-KO. *Panel A:* las células se cultivaron en medio DMEM y se privaron de suero durante 12 horas. Para evaluar SOCE las células PC3 parentales (línea negra) y STIM1-KO (línea roja) se cargaron con fura 2-AM y se les añadió Tg 1 μM en medio libre de Ca^{2+} seguido de la adición de Ca^{2+} extracelular. El ratio F340/F380 se monitorizó por epifluorescencia como se describe en Materiales y Métodos. Los datos representan la media \pm s.d. de 3 ensayos independientes (WT $n > 25$ células; STIM1-KO $n > 25$ células). *Panel B:* las células se cultivaron como se indica en el panel A, y la entrada de Ca^{2+} se evaluó en células PC3 parentales (línea negra) y STIM1-KO (línea roja) tras añadir al medio de ensayo EGF 50 ng/ml + CaCl_2 2 mM. Tras 3 min de tratamiento se analizó la caída del influjo de Ca^{2+} tras sustituirse el medio por HBSS libre de Ca^{2+} . Los datos representan la media \pm s.d. (WT $n > 20$ células; STIM1-KO $n > 25$ células).

En el panel A de la figura 24 observamos que tras la adición de Ca^{2+} el ratio F340/F380 registrado en las células STIM1-KO (línea roja) es muy inferior al registrado en la línea PC3 parental (línea negra). Estos resultados indican que la línea PC3 STIM1-KO presenta un alto déficit de SOCE puesto que no se activan los canales SOCs en respuesta al tratamiento con Tg. Del mismo modo, los resultados mostrados en el panel B de la figura 24, en relación al tratamiento con EGF, revelaron que STIM1 es un mediador de la entrada de Ca^{2+} extracelular en respuesta a EGF en células PC3, ya que en células STIM1-KO la entrada de Ca^{2+} extracelular es significativamente inferior. Por lo tanto, las células STIM1-KO son una herramienta adecuada para el estudio del papel

de STIM1 y SOCE sobre la señalización celular, y en particular sobre la posible activación de ERK1/2 dependiente de SOCE.

1.5. La activación de ERK1/2 no requiere del influjo de Ca^{2+} dependiente de STIM1.

Para evaluar si la activación de la ruta de señalización de las quinasas MAPK es dependiente del influjo de Ca^{2+} mediado por STIM1, se evaluó el nivel de fosforilación de ERK1/2 en respuesta al tratamiento con EGF en células PC3 parentales (wild-type) y STIM1-KO (deficientes en SOCE). Además, este ensayo se llevó a cabo en ausencia y presencia de Ca^{2+} extracelular (figura 25). Las células se privaron de suero durante 12 horas y para valorar la activación de las quinasas ERK1/2 se trataron con EGF 50 ng/ml durante 10 min. Para determinar la especificidad de la ruta de señalización se utilizó el inhibidor de MEK1/2, PD0325901 0.1 μM , que se utilizó siguiendo los pasos indicados en experimentos anteriores.

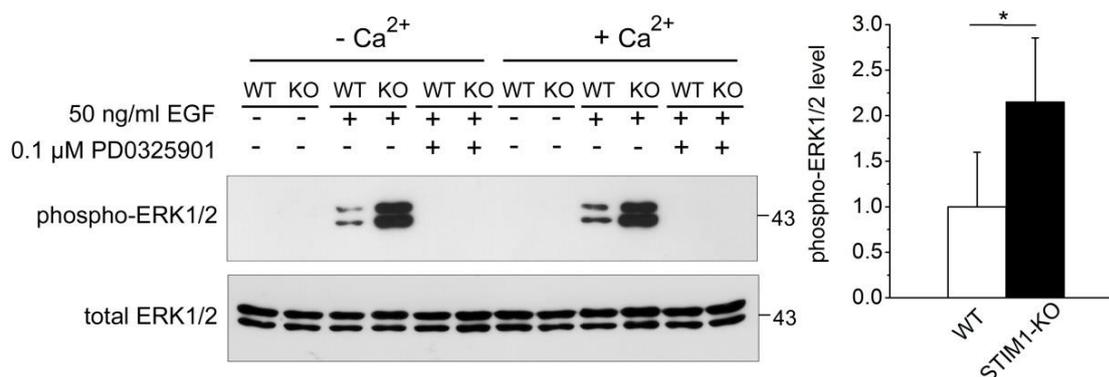


Figura 25. Activación de ERK1/2 en células deficientes en SOCE. Las células PC3 se privaron de suero durante 12 horas y posteriormente se trataron con EGF 50 ng/ml en medio HBSS ($-\text{Ca}^{2+}$) o ($+\text{Ca}^{2+}$). Mediante inmunoblot se evaluó el nivel de fosfo-ERK1/2 y total-ERK1/2, utilizando 20 μg de lisado total. Como inhibidor de la activación de ERK1/2 se utilizó PD0325901 (0.1 μM). A la derecha se representa la cuantificación de la activación de ERK1/2 a partir de los datos de 3 experimentos independientes. Los datos representan la media \pm s.d. (*) $p < 0.05$.

En la figura 25 observamos que la activación de ERK1/2 en respuesta a EGF es incluso mayor en las células STIM1-KO que en las células wild-type. Por otro lado el nivel de activación de ERK1/2 fue el mismo en ausencia o presencia de Ca^{2+} extracelular. Estos resultados indican que la activación de ERK1/2 no aumenta de manera dependiente del influjo de Ca^{2+} extracelular, ya que estas mismas condiciones experimentales muestran en la figura 24 (panel B) un influjo notable de Ca^{2+} . Por lo

tanto, estos resultados indican que ni SOCE, ni el influjo de Ca^{2+} por otros canales es necesario para la activación de ERK1/2 en células PC3 estimuladas con EGF.

Los resultados anteriores sugieren que un mecanismo diferente al influjo de Ca^{2+} está implicado en la activación de la ruta de señalización Raf-MEK-ERK en respuesta al tratamiento con EGF. Debido a que la estimulación con EGF causa la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares y que está descrito que taspigargina activa la quinasa CAMKII (Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II) por este mismo mecanismo, es decir el vaciado de depósitos intracelulares de Ca^{2+} (Zhong et al., 2015), nos propusimos monitorizar la actividad de esta quinasa tras el tratamiento con EGF en ausencia de Ca^{2+} extracelular. Utilizando las condiciones experimentales descritas en los ensayos anteriores, las células PC3 wild-type y STIM1-KO se trataron con EGF (50 ng/ml) en medio HBSS libre de Ca^{2+} suplementado con EGTA 0.1 mM. La activación de la quinasa CAMKII se monitorizó evaluando el nivel de fosforilación en el residuo Thr286, un residuo descrito como responsable de la autofosforilación dependiente de Ca^{2+} en respuesta a cambios transitorios en la concentración intracelular de Ca^{2+} en una gran variedad de células [revisado en (Colbran et al., 1989)]. Como control positivo del ensayo, también se evaluó el nivel de fosforilación de CAMKII en respuesta a Tg y en presencia de Ca^{2+} extracelular, condiciones conocidas que causan la activación de CAMKII. Para valorar la especificidad del inmunoblot las células se trataron con el inhibidor de CAMKII, KN-62 10 μM . En primer lugar las células se pre-incubaron con el inhibidor KN-62 durante 20 min y después se realizó la estimulación con EGF.

En la figura 26 observamos que no se detecta activación de CAMKII tras la estimulación con EGF en ausencia de Ca^{2+} extracelular, descartando así la participación de esta ruta de señalización en la activación de ERK1/2 en estas condiciones experimentales. Como control positivo de nuestro experimento se muestra la activación de CAMKII en presencia de taspigargina y su completa inhibición en presencia del inhibidor KN-62. Además, es importante destacar que la presencia del inhibidor de CAMKII no tuvo ningún efecto sobre la activación de ERK1/2 en respuesta a EGF. Con estos resultados podemos sugerir que la proteína CAMKII no es la responsable de la activación de las quinasas ERK1/2 en ausencia de SOCE y Ca^{2+} extracelular.

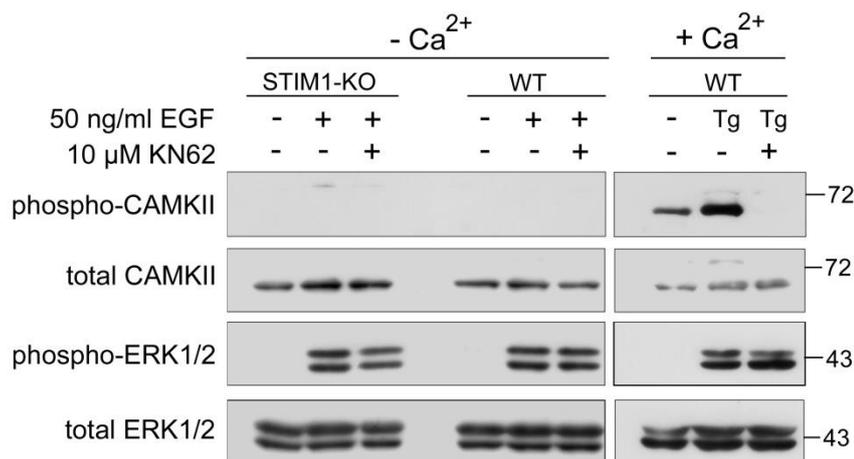


Figura 26. Activación de ERK1/2 independiente de CAMKII. Las células PC3 se privaron de suero durante 12 horas y posteriormente se trataron con EGF en medio HBSS libre de Ca²⁺, o suplementado con +Ca²⁺, en presencia o ausencia del inhibidor de la CAMKII, KN-62 10 μM. El nivel de activación de CAMKII se evaluó mediante la monitorización de fosfo-CAMKII (Thr286). Como control de carga se evaluó el nivel de CAMKII total. En paralelo se evaluó el nivel de fosfo-ERK1/2 y total ERK1/2. En este ensayo se utilizaron 20 μg de lisado total. Como control positivo del inmunoblot las células PC3 se trataron con Tg 1 μM en presencia o ausencia del inhibidor KN-62 (panel derecho). Los inmunoblots son representativos de 3 ensayos independientes.

1.6. La quinasa Src se activa en respuesta a EGF de manera independiente al influjo de Ca²⁺.

En la evaluación de la contribución de quinasas que median la activación de ERK1/2 tras la activación con EGF, se valoró la posible participación de dos quinasas adicionales: (1) PKC (protein kinase C) (Ginnan et al., 2004; Ueda et al., 1996) y (2) la familia de quinasas Src (sarcoma viral oncogene homolog) (Alavi et al., 2003). Llevando a cabo una estrategia similar a la empleada en los experimentos anteriormente descritos, realizamos un ensayo en el que las células PC3 se trataron con EGF en ausencia o presencia del inhibidor específico de PKC (Go6976, que inhibe las isoformas PKCα y PKCβ) y del inhibidor Src11, que inhibe Src, Lck, Csk, y Yes (Bain et al., 2007), todas ellas de la familia de quinasas Src. En la figura 27 se observa que el tratamiento con Go 6976 (1 μM) no tuvo efecto inhibitor sobre la activación de ERK1/2 estimulada por EGF. Sin embargo el tratamiento con el inhibidor Src11 causó una acusada inhibición de ERK1/2, monitorizada mediante el nivel de fosfo-ERK1/2. Para demostrar la especificidad del inhibidor Go 6976 se monitorizaron los niveles de fosfo-c-Jun, un sustrato corriente abajo de PKC, que nos permitió certificar la inhibición de PKC con Go 6976.

En resumen, los resultados de este ensayo muestran que las quinasas PKC α/β no están implicadas en la activación de ERK1/2 tras estimulación con EGF, pero confirman que Src activa la ruta de señalización de Raf-MEK-ERK en estas condiciones experimentales (figura 27).

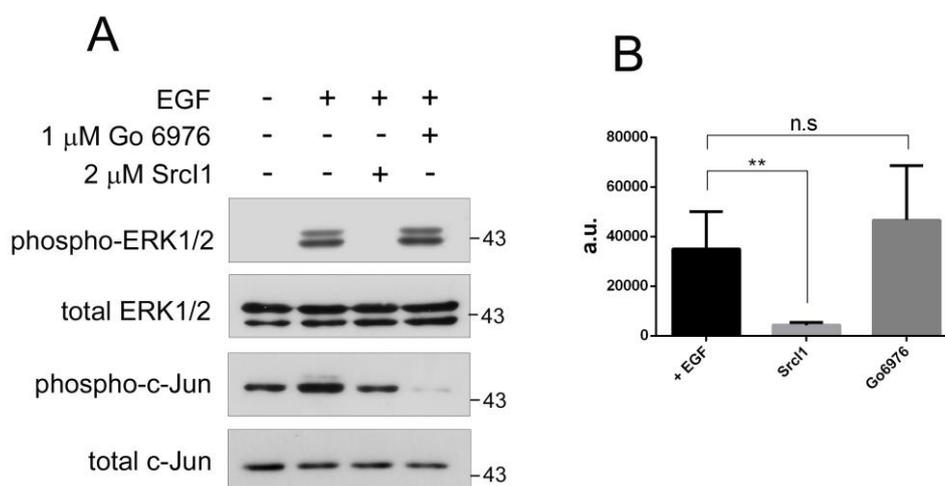


Figura 27. La fosforilación de ERK1/2 es dependiente de la quinasa Src. *Panel A:* Las células PC3 se privaron de suero 12 horas y a continuación se trataron durante 10 min con EGF 50 ng/ml en HBSS libre de Ca²⁺ en ausencia o presencia de los inhibidores Go 6976 y Src1. El tratamiento con los inhibidores se realizó pre-incubando las células durante 20 min con el inhibidor antes de la estimulación con EGF. Los lisados de las muestras (30 μ g proteína) se utilizaron para evaluar el nivel de fosfo-ERK1/2. El nivel de inhibición de fosfo-c-Jun se evaluó como control de la inhibición de PKC. Total ERK y total c-Jun se evaluaron como control de carga. Los inmunoblots son representativos de 3 experimentos independientes. *Panel B:* Los datos del ensayo anterior se analizaron para cuantificar la inhibición de fosfo-ERK en respuesta a los diferentes tratamientos, mediante densitometría utilizando el software ImageJ. En la gráfica se muestra la media \pm s.d. El análisis estadístico se realizó utilizando el test estadístico t-student para muestras independientes (**) $p < 0.01$; (n.s.) no significativo.

Tras determinar que la inhibición de la quinasa Src se encuentra directamente relacionada con la inhibición de fosfo-ERK1/2 nos planteamos determinar la concentración mínima del inhibidor Src1 capaz de inhibir la actividad ERK1/2 con el fin de verificar si nuestros datos se aproximaban a la IC₅₀ de inhibición *in vitro*. Para ello se llevó a cabo un ensayo de titulación del inhibidor Src1, el cual demostró que aunque las concentraciones de Src1 para lograr una completa inhibición estaban comprendidas en el intervalo 1-2 μ M, el efecto de Src1 sobre la inhibición de ERK1/2 es patente con Src1 0.5 μ M (figura 28), una concentración que se ajusta bien a los datos descritos de IC₅₀ en un ensayo quinasa *in vitro* para este compuesto (0.18 μ M, (Bain et al., 2007)).

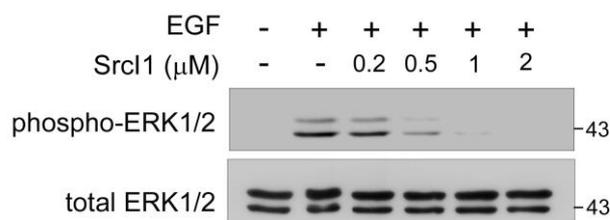


Figura 28. Titulación de la concentración del inhibidor Src11. Las células PC3 deprivadas de suero durante 12 horas se pre-incubaron durante 20 minutos con el inhibidor Src11 a las concentraciones indicadas (0.2-2 μ M) y se estimularon con EGF 50 ng/ml en HBSS libre de Ca^{2+} . Para evaluar el nivel de fosfo-ERK1/2 se utilizaron 20 μ g de proteína. La expresión de total ERK1/2 se evaluó como control de carga. Los inmunoblots son representativos de 2 ensayos independientes.

Utilizando la línea celular PC3 STIM1-KO, obtenida mediante edición genómica, que resultó ser deficiente en SOCE, demostramos aquí que la activación de ERK1/2 es independiente del influjo de Ca^{2+} extracelular a través de canales SOC regulados por STIM1, y que es fuertemente dependiente de la actividad de la quinasa Src. Por lo tanto, nuestros resultados apoyan el modelo descrito anteriormente por Pozo-Guisado y cols. en el que la fosforilación de STIM1 en los residuos diana de ERK1/2 es un evento necesario para la completa activación de SOCE (Pozo-Guisado et al., 2010; Pozo-Guisado et al., 2013), y por lo tanto ERK1/2 es un regulador de STIM1, y no al contrario, como se había sugerido por otros autores. En este sentido, la descripción de esta ruta de señalización nos permite establecer que EGF activa Raf-MEK-ERK-STIM1, un paso previo importante para abordar objetivos enfocados a estudiar la función de SOCE, y más concretamente de STIM1 y ORAI1, en la remodelación del citoesqueleto de células en migración. De esta manera, en el desarrollo de los siguientes objetivos de este trabajo tuvimos en cuenta que el tratamiento con EGF activa ERK1/2 independientemente del influjo de Ca^{2+} extracelular. Al igual que para ERK1/2, existen numerosas dianas de Src en el citoesqueleto. En este sentido, los resultados que sugieren la activación de ERK1/2 dependiente de Src y mediada por EGF suponen un punto de partida a la hora de valorar proteínas del citoesqueleto que pudieran participar junto con STIM1 y ORAI1 en la organización de la señalización celular dependiente de SOCE, lo cual forma parte de los siguientes objetivos de este trabajo.

2. STIM1 Y ORAI1 PROMUEVEN LA REORGANIZACIÓN DEL CITOESQUELETO EN EL FRENTE DE MIGRACIÓN.

La migración celular es un evento complejo que conlleva la reorganización del citoesqueleto celular. Esta reorganización supone la polarización transitoria de la célula para facilitar los ruffles (ondas) en la membrana plasmática, un proceso dinámico de reorganización de la actina cortical requerida para el desarrollo de las protrusiones celulares, incluyendo lamelipodios y filopodios (Ridley et al., 2003). La señalización celular que controla estos eventos es todavía motivo de estudio, aunque se conoce que el influjo extracelular de Ca^{2+} es esencial para la migración celular y para la señalización celular que permite el avance del frente de migración.

En este apartado abordaremos el objetivo del estudio de la participación de SOCE, STIM1 y ORAI1, en la remodelación del citoesqueleto, un proceso en el que, como se ha explicado en la Introducción, el influjo de Ca^{2+} tiene un papel muy relevante.

2.1. Localización polarizada de fosfo-STIM1 en la zona de avance de migración.

En trabajos previos de nuestro grupo de investigación se ha empleado la sobreexpresión de mutantes de STIM1 para emular una desfosforilación constitutiva de la proteína en sitios diana de ERK1/2 (STIM1-S575A/S608A/S621A). Este mutante se empleó para mostrar el papel regulador de STIM1 en la migración celular utilizando células de adenocarcinoma como modelo de estudio (Casas-Rua et al., 2015), sin embargo, la localización de STIM1 fosforilado a niveles endógenos está aún sin describir. Debido a la relevancia de STIM1 como activador de SOCE, y a que su modificación por fosforilación permite regular su actividad, nos planteamos estudiar el efecto de la fosforilación de STIM1 en el establecimiento de la zona de avance de migración. Para ello, estudiamos la localización de fosfo-STIM1 en las líneas celulares de osteosarcoma U2OS y HeLa, para determinar si la localización de esta proteína está polarizada en zonas de avance o de retracción celular durante la migración celular. Ambas líneas celulares, U2OS y HeLa, se cultivaron en medio suplementado con 10% de suero hasta alcanzar una confluencia del 60-70%. En este experimento, para promover la migración celular, ambas líneas celulares U2OS y HeLa se estimularon con EGF (50 ng/ml) tras una deprivación de suero de 8-10 horas. Tras el tratamiento, las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) y se realizó la inmunolocalización de fosfo-STIM1. Para analizar la distribución de fosfo-STIM1 se utilizó un microscopio

invertido de fluorescencia y se tomaron imágenes con un objetivo 100x de inmersión en aceite (figura 29).

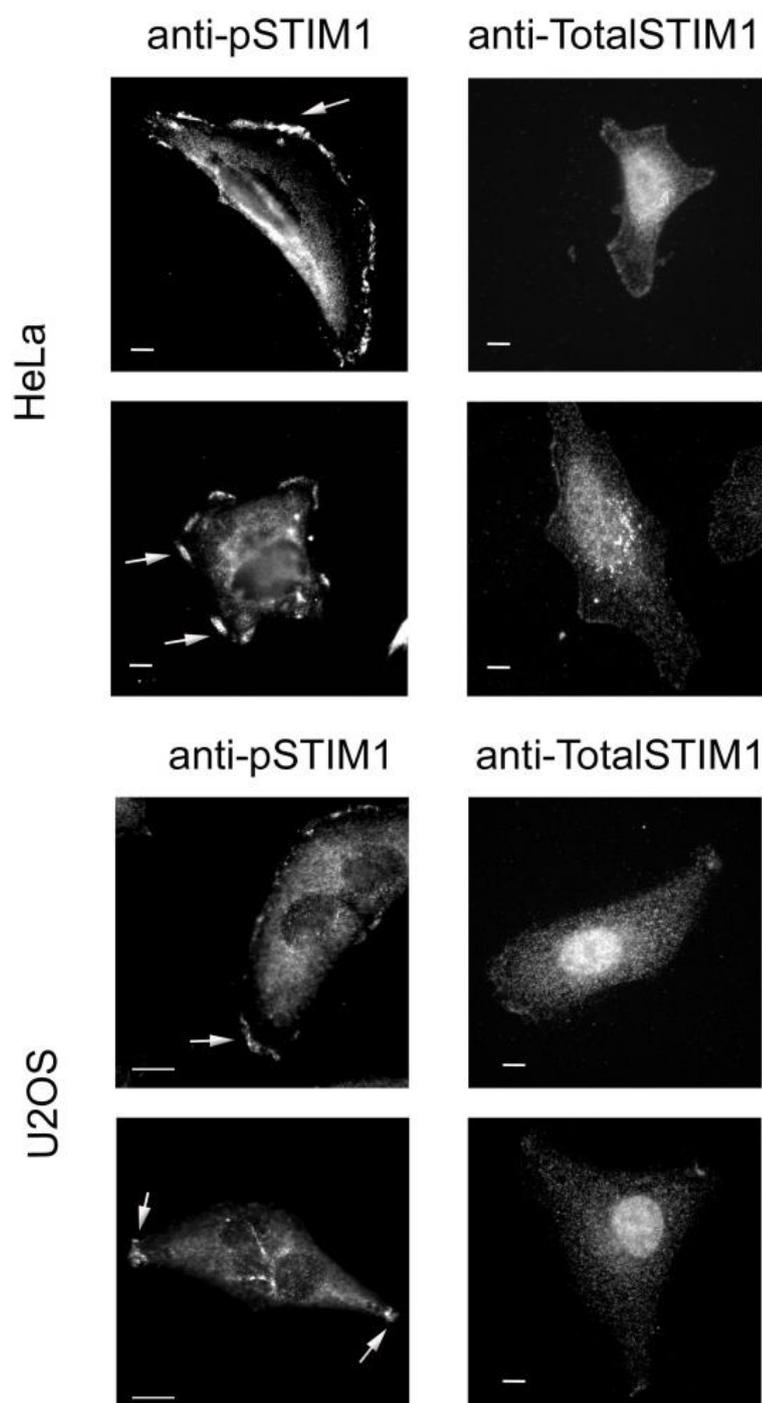


Figura 29. Inmunolocalización de STIM1 fosforilado y STIM1 total en células U2OS y HeLa. Las células U2OS y HeLa se cultivaron en cubreobjetos pre-tratados con colágeno, en medio DMEM suplementado con 10% de suero y durante un mínimo de 48 horas hasta alcanzar una confluencia del 60-70%. Las células se estimularon con EGF 50 ng/ml durante 10 min tras una privación de suero de 8-10 horas en medio RPMI. A continuación, las células se fijaron y se realizó una inmunolocalización para el residuo fosforilado de la Ser575 (anti-pSTIM1) y STIM1 total (anti-total STIM1). Como anticuerpos secundarios se utilizaron anticuerpos marcados con Alexa Flúor 488 (anti-sheep) y con Alexa Flúor 488 (anti-rabbit), para STIM1 fosforilado y STIM1 total respectivamente. Los resultados son representativos de 3 experimentos diferentes. Barra de escala = 10 μ m.

En la figura 29 se observa que la forma fosforilada de STIM1 tiene una distribución cortical observándose en áreas de ruffles de membrana (indicadas por flechas) en ambas líneas celulares. Por el contrario, la localización polarizada es menos evidente en el caso de la proteína total. De esta forma, los resultados indican que tanto en células U2OS como en células HeLa, la mayor parte de fosfo-STIM1 está polarizado en la zona de avance de las células, sugiriendo una posible participación de fosfo-STIM1 en la regulación de la migración celular que evaluaremos más adelante.

2.2. Colocalización de fosfo-STIM1 y cortactina.

Uno de los marcadores más utilizados para identificar áreas de ruffling de membrana en el frente de avance de migración es cortactina (CTTN), una proteína citosólica implicada en la reorganización del citoesqueleto de actina en las zonas de ruffling de membrana (Ammer and Weed, 2008; Weed and Parsons, 2001; Wu and Parsons, 1993). CTTN contribuye a la remodelación celular y a la regulación del ensamblaje de la actina cortical. Por lo tanto, CTTN participa de manera esencial en la formación de protrusiones de membrana y lamelipodios, requeridas para la migración celular. Por ello, nos planteamos estudiar la localización de fosfo-STIM1 y CTTN en células U2OS y HeLa. Las células se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de suero y se dejaron crecer hasta alcanzar una confluencia del 60-70%. Como en el experimento anterior, las células se estimularon con EGF 50 ng/ml, tras una privación de suero de 8-10 horas. Al terminar el tratamiento las células se fijaron con PFA y se llevó a cabo una doble inmunolocalización secuencial para localizar las dos proteínas de estudio (en primer lugar fosfo-STIM1 y a continuación CTTN). En la figura 30 se observan las imágenes obtenidas durante el estudio de la localización de fosfo-STIM1 para el residuo Ser575 (columna izquierda) y CTTN (columna central). Además, en la figura podemos observar la superposición (merge) de las dos proteínas, mostrándose en rojo fosfo-STIM1 y en verde CTTN. Los resultados mostraron que fosfo-STIM1 endógeno presenta un alto nivel de colocalización con cortactina endógena. Puesto que la fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2 ha sido descrita como esencial para la activación de los canales SOC (Casas-Rua et al., 2015; Pozo-Guisado et al., 2010; Pozo-Guisado et al., 2013; Pozo-Guisado and Martin-Romero, 2013; Tomas-Martin et al., 2015), los datos de la figura 30 de nuevo sugieren una posible participación de STIM1 y del influjo de Ca^{2+} dependiente de STIM1 en la remodelación del citoesqueleto cortical requerida para la formación de lamelipodios y filopodios

durante la migración celular. Por ello, se procedió a abordar el estudio de la posible interacción de STIM1 y CTTN mediante co-precipitación.

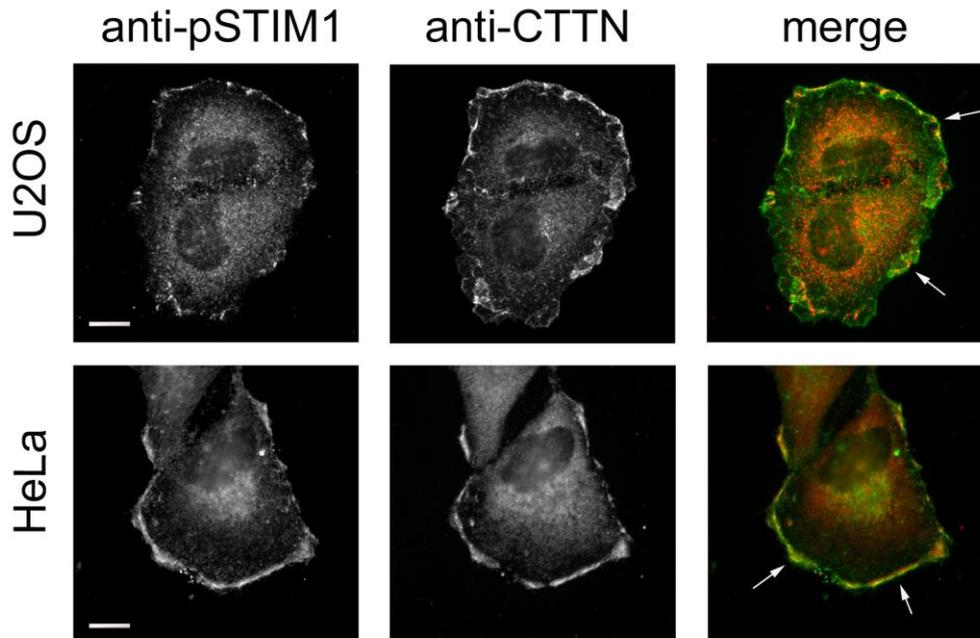


Figura 30. Colocalización de fosfo-STIM1 y cortactina. Las células U2OS y HeLa se cultivaron en cubreobjetos pre-tratados con colágeno, en medio DMEM suplementado con 10% de suero y se dejaron crecer hasta alcanzar una confluencia del 60-70%. Las células se estimularon con EGF 50 ng/ml durante 10 min tras una deprivación de suero de 8-10 horas en medio RPMI. A continuación las células se fijaron y se realizó una inmunolocalización para el residuo Ser575 de fosfo-STIM1 (anti-pSTIM1) y cortactina (anti-CTTN). Como anticuerpos secundarios se utilizaron anti-sheep-AlexaFluor594 y anti-mouse-AlexaFluor488, para fosfo-STIM1 y cortactina respectivamente (las zonas de ruffling se indican con flechas). Estas imágenes son representativas de al menos 10 experimentos independientes. Barra de escala = 10 μ m.

2.3. Interacción de STIM1 y cortactina.

Para profundizar en la posible interacción entre STIM1 y CTTN se llevaron a cabo ensayos de co-precipitación entre ambas proteínas. Para ello se utilizaron células U2OS transfectadas para la expresión transitoria de Flag-STIM1 y GFP-CTTN. Las células se deprivaron de suero durante 8-10 horas y se trataron con EGF 50 ng/ml para determinar la interacción de STIM1 y CTTN. A continuación, se llevó a cabo un ensayo de precipitación de GFP para precipitar CTTN-GFP y se comparó la cantidad de Flag-STIM1 co-precipitada en condición de reposo y en respuesta al tratamiento con EGF. Como control negativo del experimento se utilizaron células transfectadas con el vector GFP-vacío (figura 31).

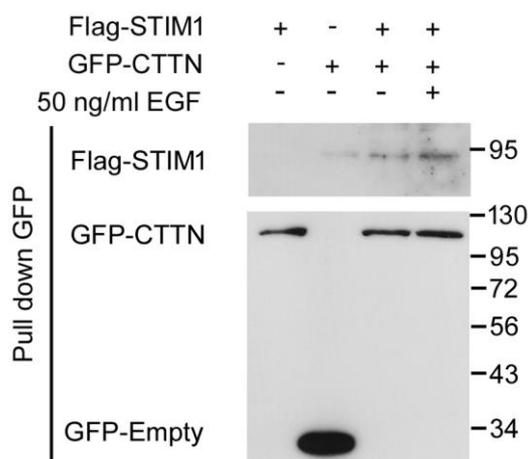


Figura 31. Estudio de la interacción entre Flag-STIM1 y GFP-CTTN en células U2OS. Las células U2OS se transfectaron para la expresión transitoria de Flag-STIM1 y GFP-CTTN y se trataron con EGF 50 ng/ml en HBSS sin Ca^{2+} durante 10 min. GFP-CTTN se precipitó utilizando una resina de agarosa con afinidad por GFP. La cantidad de Flag-STIM1 unida a GFP-CTTN se evaluó mediante inmunoblot utilizando un anticuerpo anti-STIM1 y la cantidad de GFP-CTTN precipitada se evaluó utilizando un anticuerpo anti-GFP. Los inmunoblots son representativos de 3 experimentos diferentes a partir de 3 lisados independientes.

Los resultados muestran que la cantidad de Flag-STIM1 co-precipitada con GFP-CTTN es insuficiente para poder ser detectada mediante inmunoblot. En la figura 31 aparecen bandas inmunoreactivas que podrían corresponder a Flag-STIM1, en las condiciones en las que se sobre-expresan ambas proteínas (calles 3 y 4), pero también en el control negativo en ausencia de GFP-CTTN (calle 2). Estos resultados nos permiten sugerir que, aunque ambas proteínas colocalizan y se encuentran en zonas muy próximas entre sí (ver figura 30), no es patente una interacción directa. Otra posible explicación podría estar basada en que la interacción sólo se produzca entre fosfo-STIM1 y CTTN. Al ser la cantidad de fosfo-STIM1 minoritaria, en comparación con la cantidad de proteína total, la posible interacción entre fosfo-STIM1 y CTTN sería difícil de observar en un ensayo de co-precipitación como el que aquí se muestra. Por ello se realizaron experimentos adicionales para abordar el estudio de la interacción entre STIM1 y CTTN, mediante inmunolocalización y análisis de imágenes en un microscopio de luz estructurada con una resolución de 54 nm.

En la figura 32, las imágenes de microscopía muestran en detalle la localización de STIM1 (verde) y CTTN (rojo). Estas imágenes de alta resolución muestran que aunque las proteínas STIM1 y CTTN están muy próximas, no hay colocalización real entre ambas proteínas, apoyando los resultados obtenidos mediante co-precipitación mostrados en la figura 31, que indican que no existe interacción directa entre ambas proteínas.

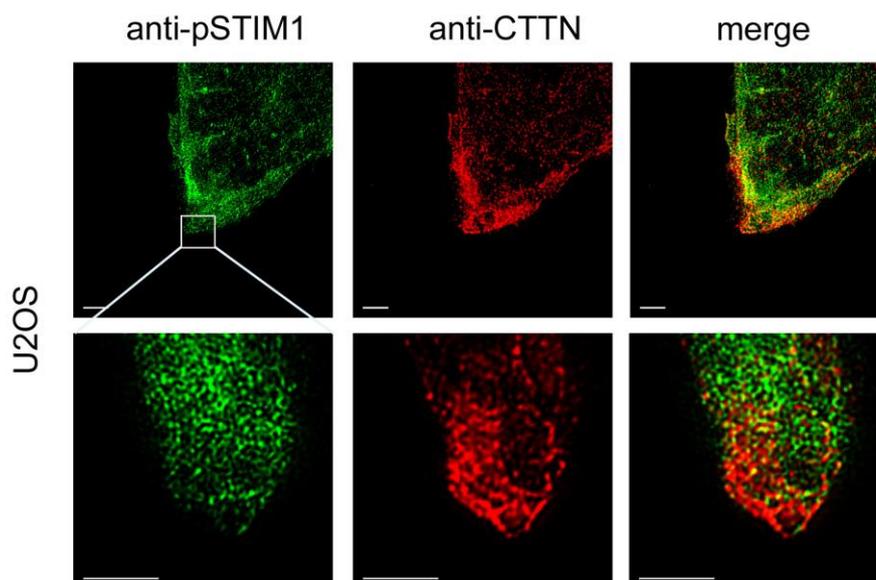


Figura 32. Inmunolocalización de STIM1 y CTTN en microscopio de luz estructurada. Las células U2OS fueron estimuladas con EGF (50 ng/ml) durante 10 min tras una deprivación de suero de 8-10 horas en medio RPMI. A continuación las células se fijaron y se realizó una inmunolocalización de STIM1 (anti-STIM1) y cortactina (anti-CTTN). Como anticuerpos secundarios se utilizaron un anti-rabbit-AlexaFluor488 y anti-mouse-AlexaFluor594, para STIM1 y CTTN respectivamente. El panel inferior muestra un detalle ampliado del frente de migración. Estas imágenes son representativas de al menos 10 experimentos independientes. Barra de escala = 2 μ m.

2.4. Generación de la línea celular U2OS STIM1-KO empleando el sistema CRISPR/Cas9.

Con el objetivo de profundizar en la posible participación de STIM1 en los ruffles de membrana, nos planteamos generar una línea celular U2OS modificada genéticamente para obtener un knock-out (KO) para la expresión de STIM1. Para ello se empleó el sistema de edición genómica CRISPR/Cas9. El protocolo seguido fue el mismo que el descrito en el apartado 1 de los resultados para la generación de la línea PC3 STIM1-KO. Brevemente, las células U2OS se transfectaron con vectores para la expresión de la nucleasa Cas9 con la mutación D10A (Cas9 nickase) para así reducir la posibilidad de cortes inespecíficos en la doble cadena de DNA (Ran et al., 2013). Además, las células se transfectaron con RNAs guías específicos (gRNAs) diseñados específicamente para actuar sobre las 3 variantes transcripcionales conocidas de STIM1 humano (NP_001264890.1, NP_001264891.1 y NP_003147.2) y que ya se ha mostrado en la figura 18.

Tras seguir el protocolo detallado en el capítulo de Materiales y Métodos, se comprobó la eficacia de la técnica analizando el nivel de expresión de la proteína STIM1 mediante inmunoblot. Para ello se compararon dos muestras, una procedente de un lisado de células U2OS wild type (WT), y la otra muestra de células transfectadas con los vectores específicos Cas9 D10A y los RNAs guías. En la figura 33 observamos que el nivel de expresión de STIM1 es muy inferior en el pool de células tratadas para la obtención del knock-out de STIM1 comparado con la línea celular WT. Como control de este experimento se comprobó que la cantidad de proteína GAPDH era similar en ambas muestras.

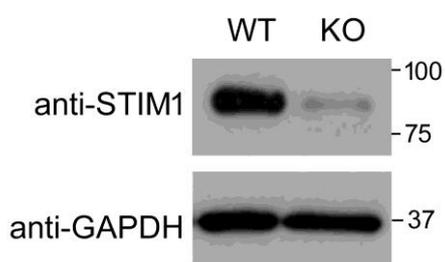


Figura 33. Comprobación inicial de la eficiencia del sistema de edición genómica. Las células U2OS se transfectaron con vectores para la expresión de la nucleasa Cas9 D10A y la expresión de RNAs guías específicos para la obtención de un knock-out para STIM1. Tras la selección con puromicina se obtuvo un lisado celular mixto y se analizó la expresión de STIM1 mediante inmunoblot utilizando 30 μ g de lisado total y un anticuerpo anti-STIM1. Como control de carga de proteína se analizó el nivel de GAPDH.

Puesto que queda demostrado que el cultivo mixto contiene células positivas para el knock-out de STIM1, continuamos con el proceso para la obtención de un clon de células knock-out de STIM1. Para ello se individualizaron las células por citometría de flujo, y se cultivaron dando lugar a cultivos celulares monoclonales de los cuáles se obtuvieron lisados celulares para el análisis de la expresión de STIM1 mediante inmunoblot (Figura 34).

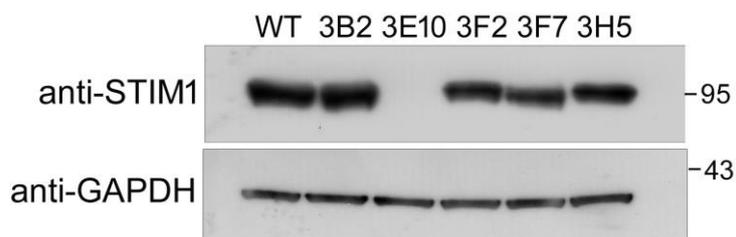


Figura 34. Selección de clones STIM1-KO. Los clones individuales se cultivaron y se obtuvieron lisados para el análisis de la expresión de STIM1 (30 μ g de proteína/calle). En la figura se observa que el clon 3E10 no muestra expresión de STIM1.

El clon de células identificado como 3E10 (figura 34), en el que observamos ausencia total de expresión de STIM1, se seleccionó y se analizó la secuencia de DNA en el locus de *STIM1*. Mediante secuenciación del DNA genómico se detectó una delección de 31 bp (pares de bases) + 17 bp en cada uno de los alelos. Como resultado

Resultados

de esta modificación genética se produce un cambio en la fase de lectura ribosomal y la aparición de un codón de parada prematuro, lo que impide la síntesis de STIM1 (figura 35).

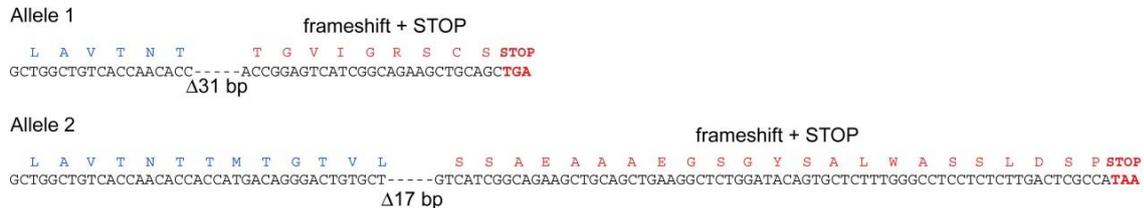


Figura 35. Secuenciación del DNA genómico del clon 3E10. El clon de células STIM1-KO seleccionado (3E10) se analizó mediante secuenciación del DNA genómico para analizar las modificaciones genéticas que presentaba en el locus diana. Mediante esta secuenciación se observaron dos productos génicos (correspondientes a los dos alelos del mismo locus): en uno se observó una delección de 31 bp y en el otro una delección de 17 bp. El cambio en la fase de lectura ribosomal y el codón de parada prematuro se indican en color rojo.

Una vez seleccionado el clon (3E10) analizamos la expresión de la proteína STIM1 empleando dos anticuerpos comerciales que reconocen diferentes epítomos, localizados próximos a las regiones C-terminal y N-terminal de STIM1. En el resultado del inmunoblot (figura 36) observamos que no se detecta expresión de STIM1 con ninguno de los anticuerpos, lo que confirma el knock-out del gen *STIM1* (ENSG00000167323).

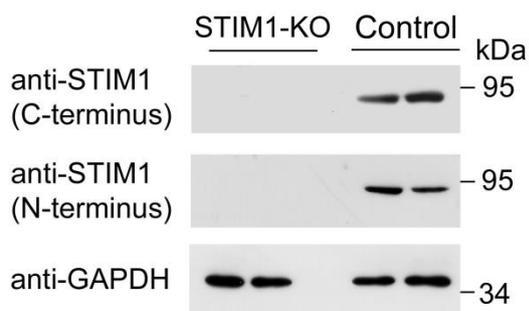


Figura 36. Análisis de la expresión de STIM1 mediante inmunoblot en la línea STIM1-KO. La expresión de STIM1 se analizó mediante inmunoblot utilizando dos anticuerpos comerciales que reconocen la región C-terminal o N-terminal de STIM1. No se detectó expresión de STIM1 en la condición STIM1-KO con ninguno de los anticuerpos. Como control de carga se empleó el nivel de total de GAPDH en ambos lisados. En este ensayo se utilizaron 30 µg de lisado total por calle.

2.5. Caracterización de la línea U2OS STIM1-KO.

La caracterización de la línea celular U2OS STIM1-KO se realizó de manera similar a la caracterización de la línea celular PC3 STIM1-KO: (i) mediante el análisis de la distribución de las células en el ciclo celular y (ii) mediante una medida de SOCE para evaluar el influjo de Ca^{2+} extracelular.

(i) Para estudiar si la modificación genética en el locus de *STIM1* afectaba de algún modo a la distribución de las células U2OS en las distintas fases del ciclo celular así como el nivel de células apoptóticas se realizó un análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo. Para ello, las células *STIM1-KO* se cultivaron durante un mínimo de 48 horas hasta alcanzar una confluencia del 50-60%. Como control del experimento también se analizaron en paralelo células U2OS WT. En los resultados de la figura 37 no se observan diferencias relevantes en la distribución del ciclo celular de U2OS WT y *STIM1-KO* en lo que respecta a las fases S y G0/G1, observándose una acumulación de células en fase G2/M. Estas diferencias no son similares a las observadas en células PC3 *STIM1-KO*, en las que se observaba una acumulación de células en G0/G1 y disminución en fase S. Estas diferencias entre células U2OS y PC3 hace que el estudio del impacto de la pérdida de *STIM1* sobre el ciclo celular quede postergado a futuros trabajos.

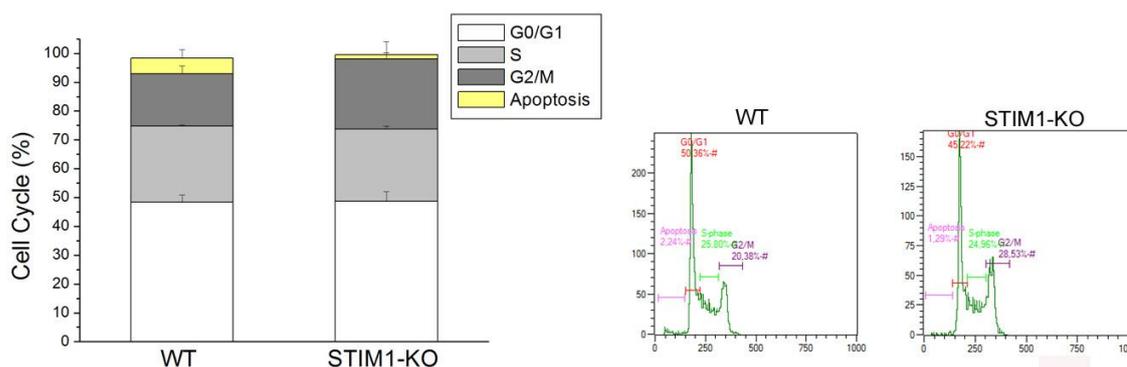


Figura 37. Distribución de ciclo celular de células U2OS wild-type y *STIM1-KO*. Las células se cultivaron durante 48 horas y se fijaron con etanol al 70%. Las distintas fases del ciclo celular y el número de células apoptóticas de cada línea celular se analizó mediante citometría de flujo. *Panel A*: Los datos obtenidos en el análisis se representan en una gráfica de columnas apiladas. *Panel B*: Histogramas representativos de los datos obtenidos del análisis de citometría de flujo con la identificación de las distintas fases del ciclo celular.

(ii) En el siguiente experimento para caracterizar la línea U2OS *STIM1-KO* nos planteamos medir SOCE para comprobar si esta vía de entrada de Ca^{2+} extracelular está alterada. La medida de SOCE se realizó siguiendo el protocolo estándar que se detalla en el apartado de Materiales y Métodos. De manera breve, en medio HBSS libre de Ca^{2+} las células, precargadas con fura 2-AM, se trataron con tapsigargina para provocar el vaciado de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} . Tras 6 minutos se añadió al medio CaCl_2 2 mM y se cuantificó la entrada de Ca^{2+} extracelular, que tiene lugar a través de los canales SOC (figura 38, panel izquierdo).

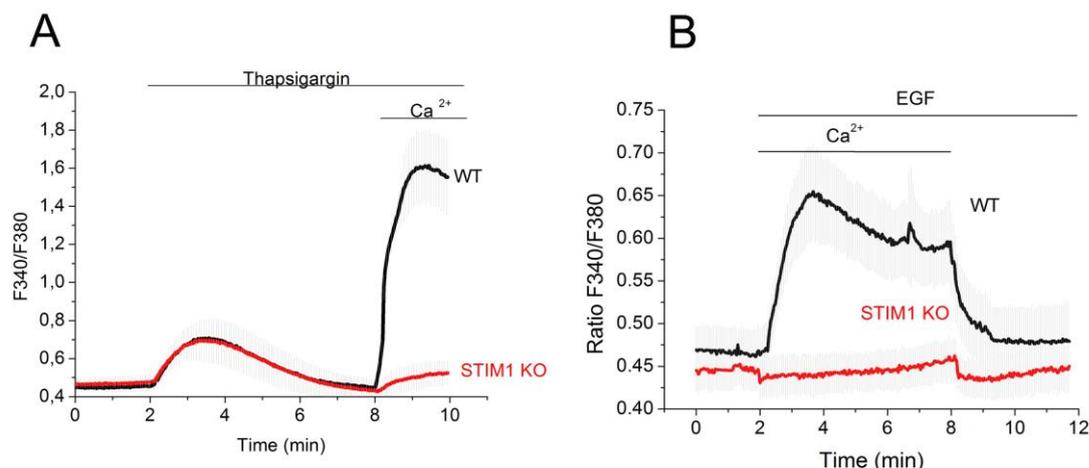


Figura 38. Medida de SOCE en células U2OS WT y STIM1-KO. Panel A: Para evaluar SOCE las células U2OS WT (línea negra) y STIM1-KO (línea roja) se cargaron con fura 2-AM, se les añadió Tg 1 μ M en medio libre de Ca²⁺ y 6 minutos más tarde se añadió CaCl₂ 2 mM al medio extracelular. El ratio F340/F380 se monitorizó por epifluorescencia como se describe en Materiales y Métodos. Los datos representan la media de 3 ensayos independientes (n > 25 células). Panel B: Las células U2OS WT (línea negra) y STIM1-KO (línea roja) se trataron con EGF 50 ng/ml + CaCl₂ 2 mM. Pasados 6 min de tratamiento, el medio de ensayo se reemplazó por HBSS sin Ca²⁺ + EGF 50 ng/ml. En la figura se representa la media de los datos registrados de 3 ensayos independientes (n = 35 células STIM1-KO y n = 40 células WT).

Con respecto al tratamiento con tapsigargina (panel izquierdo), los resultados muestran una acusada disminución en la entrada de Ca²⁺ extracelular (SOCE) en la línea celular STIM1-KO, lo que concuerda con un esperado déficit funcional en la activación de los canales SOC. Además, también medimos la entrada de Ca²⁺ extracelular en respuesta a EGF en ambas líneas celulares (figura 38, panel derecho). En este experimento las células se trataron con EGF 50 ng/ml + CaCl₂ 2 mM. Pasados 6 min de tratamiento, el medio de ensayo se sustituyó por medio HBSS libre de Ca²⁺ y se evaluó la disminución de la entrada de Ca²⁺ tras ser retirado el Ca²⁺ extracelular. Los datos muestran de nuevo, al igual que ya habíamos observado con las células PC3, que STIM1 es un mediador necesario para el influjo de Ca²⁺ estimulado por EGF, ya que este influjo es prácticamente nulo en células U2OS STIM1-KO.

2.6. STIM1 regula la dinámica de los ruffles de membrana.

La línea celular STIM1-KO generada constituye una potente herramienta para el estudio de la posible participación de STIM1 en migración celular y en la generación de ruffles en el frente de migración. En este sentido, y para visualizar la dinámica de los ruffles de membrana, se realizó la transfección para la expresión transitoria de GFP-

CTTN en células USOS parentales (wild-type) y STIM1-KO y se analizó el papel de la entrada de Ca^{2+} mediada por STIM1 en el frente de migración celular. Para evaluar la dinámica de los ruffles de membrana se monitorizó la intensidad de fluorescencia de GFP-CTTN empleando un microscopio de epifluorescencia durante 10 min en medio Leibovitz's L-15 suplementado con 10% de suero. Las células U2OS WT mostraron una dinámica de GFP-CTTN muy intensa y además se apreciaron un gran número de ruffles de membrana (marcados con flecha en la figura 39) (video suplementario 1). Sin embargo, la dinámica de GFP-CTTN es menos intensa en células STIM1-KO (figura 39, panel inferior y video suplementario 2). Para facilitar el análisis de esta dinámica se analizó la variación de la fluorescencia en el tiempo de una zona particular de cada célula, marcada por la flecha en la figura, y esta variación de fluorescencia se representa en las proyecciones ortogonales de ambos paneles (WT y STIM1-KO) (figura 39, paneles de la derecha).

La evolución de la dinámica de GFP-CTTN en las células U2OS WT y STIM1-KO también se llevó a cabo mediante el análisis STICS (spatio-temporal image correlation spectroscopy) para evaluar la dirección y velocidad de los ruffles de membrana, tal y como se describe en (Hartzell et al., 2016) (Figura 40). Con este análisis pudimos corroborar que la velocidad del ruffling de membrana es inferior en ausencia de STIM1, cuando se compara con las células U2OS parentales (wild-type).

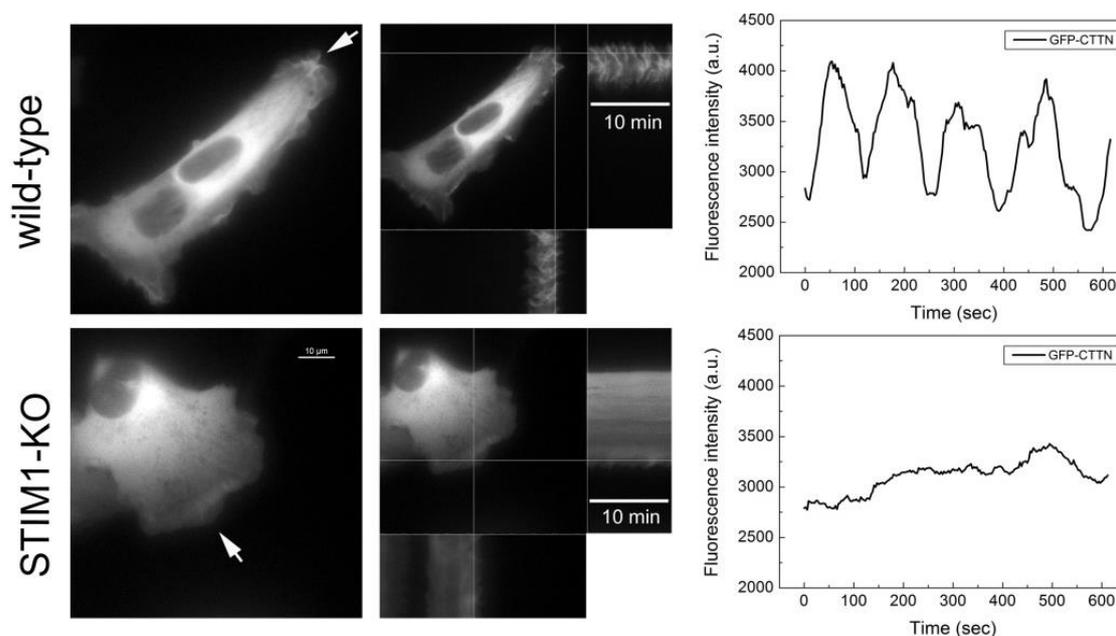


Figura 39. Dinámica de GFP-CTTN en células U2OS WT y STIM1-KO. Las células U2OS WT y STIM1-KO se transfectaron para la expresión transitoria de GFP-CTTN. Pasadas 24 horas se monitorizó la frecuencia de ruffles de membrana mediante el seguimiento de GFP-CTTN en un microscopio de epifluorescencia, con una adquisición de imágenes cada 3 segundos, durante 10 minutos a 37°C. Durante la adquisición, las células se incubaron en un medio libre de bicarbonato, Leibovitz's L-15, suplementado con 10% de suero.

Resultados

En las proyecciones ortogonales (panel central) se muestra la intensidad de fluorescencia en la zona de ruffling durante el desarrollo del ensayo (10 min). En el panel de la derecha se muestra una gráfica de la intensidad de fluorescencia de GFP-CTTN en áreas seleccionadas para evaluar los ruffles de membrana (marcada por la flecha). La figura es representativa de 22 videos procedentes de 3 ensayos independientes. Barra de escala = 10 μm . Los videos de ambos paneles se muestran en los archivos suplementarios 1 (WT) y 2 (STIM1-KO).

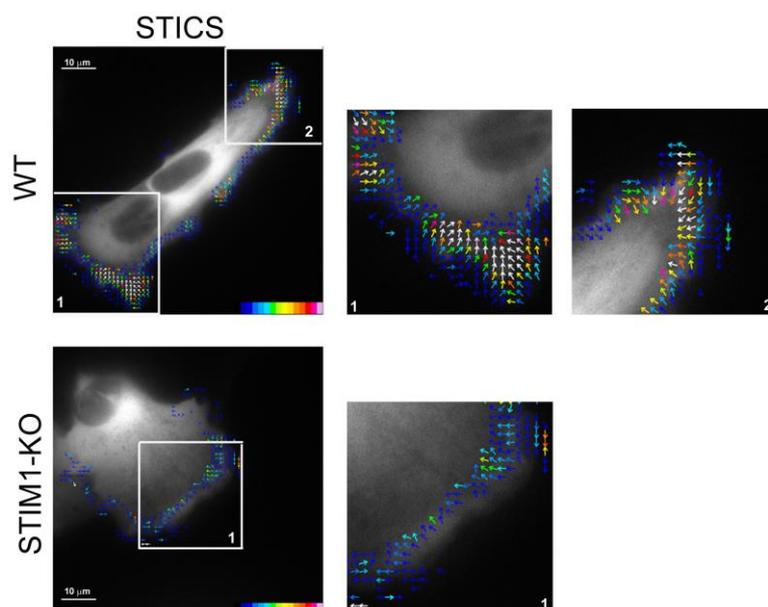


Figura 40. Análisis STICS (spatio-temporal image correlation spectroscopy) de la intensidad de fluorescencia de GFP-CTTN en células U2OS WT y STIM1-KO. Las células U2OS WT y STIM1-KO se transfectaron para la expresión transitoria de GFP-CTTN. Las variaciones en la fluorescencia de GFP-CTTN en regiones corticales se monitorizaron durante 10 min en un microscopio de epifluorescencia. El análisis de STICS se muestra como superposición de vectores en una escala de pseudocolor. A la derecha se muestran regiones ampliadas de la célula previamente analizada (izquierda). La figura es representativa de 22 vídeos a partir de 3 ensayos independientes.

2.7. STIM1 promueve la migración celular en células U2OS.

Una vez descrito el resultado de la disminución de los ruffles de membrana en la línea U2OS STIM1-KO, nos propusimos estudiar cómo se veía afectada la migración en esta línea celular mediante ensayos de cierre de heridas en placa (figura 41). Para ello, se cultivaron células U2OS WT y STIM1-KO en medio DMEM suplementado con 10% de FBS. Pasadas 24 horas en cultivo se hicieron las heridas (ver detalles en el apartado de Métodos) en las monocapas de células cuando presentaban una confluencia del 80-90%. En este momento se capturaron imágenes de la herida (tiempo 0) y se continuó el cultivo durante 14 horas más, momento en el que fueron fijadas y se capturaron las imágenes a tiempo final del ensayo. En la figura 41 se muestra una imagen representativa de las heridas a tiempo inicial y a tiempo final. Las imágenes muestran que la migración de células STIM1-KO es significativamente menor con respecto a la

línea WT, resultados que sugieren que STIM1 es regulador positivo de la migración celular.

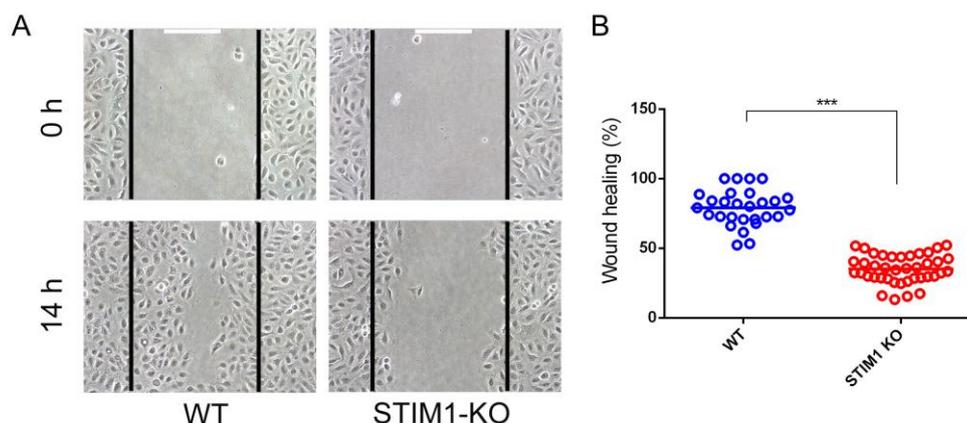


Figura 41. Cierre de herida en placa en células U2OS WT y STIM1-KO. Las células U2OS WT y STIM1-KO se sembraron en placas de cultivo pre-tratadas con colágeno y se cultivaron en DMEM suplementado con FBS 10% durante 24 horas. Posteriormente se realizaron heridas en las placas y se capturaron imágenes en el microscopio óptico con un objetivo 10x. *Panel A:* Imágenes de las heridas a tiempo inicial (0 h) y tiempo final del experimento (14 h). El análisis cuantitativo de las imágenes se realizó con el software ImageJ. Barra de escala = 200 μ m. *Panel B:* Representación de los datos de porcentaje de cierre de herida utilizando al menos 28 imágenes procedentes de 4 ensayos independientes. Las muestras se analizaron con el test estadístico t-student para muestras independientes. (***) $p < 0,001$.

2.8. La sobre-expresión ectópica de STIM1-mCherry permite la recuperación del fenotipo silvestre.

Puesto que los resultados mostrados hasta ahora demuestran que las células STIM1-KO presentan una caída en la entrada extracelular de Ca^{2+} y migración celular, nos planteamos sobre-expresar STIM1 de manera ectópica en la línea STIM1-KO con el fin de demostrar que los resultados obtenidos eran específicos de la pérdida de expresión de STIM1, y no debido a otras modificaciones o alteraciones generadas durante la selección del clon. Con este objetivo transfectamos para la expresión transitoria de STIM1-mCherry en células STIM1-KO y realizamos una medida de SOCE en respuesta a Tg. En la figura 42 se observa una completa recuperación de la entrada extracelular de Ca^{2+} (SOCE), solamente en aquellas células transfectadas con STIM1-mCherry (línea azul). Estos resultados confirman que los valores obtenidos en la medida de SOCE en la línea celular STIM1-KO son específicos, y no se deben a efectos causados de forma inespecífica sobre otras dianas genómicas.

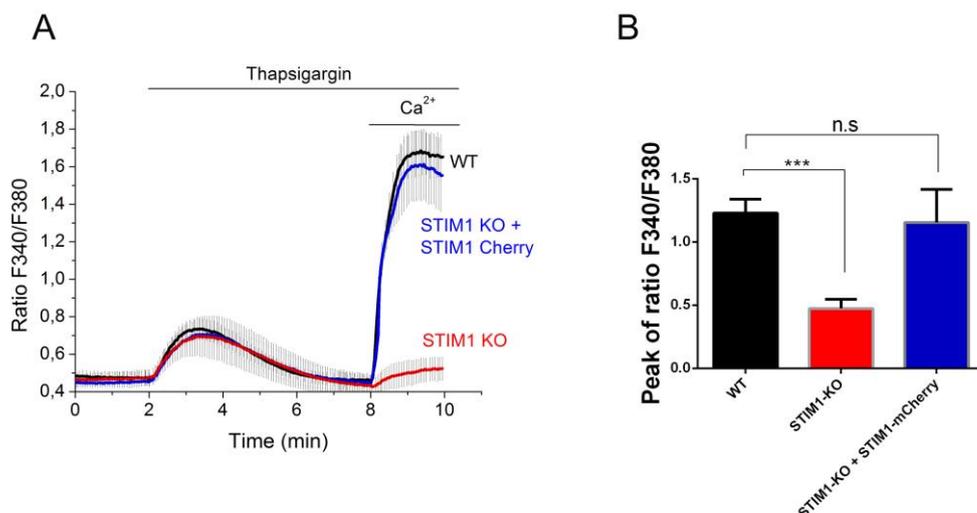


Figura 42. SOCE en células STIM1-KO transfectadas para la expresión transitoria de STIM1-mCherry.

Panel A: Los cultivos celulares se incubaron en medio DMEM y se privaron de suero durante 8 horas. Las células se cargaron con fura 2-AM y se les añadió Tg 1 μ M en medio libre de Ca^{2+} seguido de la adición de Ca^{2+} al medio extracelular. Línea azul: células STIM1-KO transfectadas para la expresión de STIM1-mCherry; línea negra: células wild-type; línea roja: células STIM1-KO. El ratio F340/F380 se monitorizó por epifluorescencia como se describe en Materiales y Métodos. Los datos representan la media de 3 ensayos independientes ($n > 25$ células por cada condición). *Panel B:* A partir de los datos del panel A se representa el ratio F340/380 máximo alcanzado por la línea U2OS wild-type, comparándolo con el ratio alcanzado por las líneas STIM1-KO y STIM1-KO + STIM1mCherry en el mismo momento de la medida. Los datos se analizaron con el test estadístico t-student para muestras independientes (n.s., no significativo).

Para confirmar los resultados obtenidos, analizamos el efecto de la sobre-expresión ectópica de STIM1-mCherry en la línea celular STIM1-KO sobre la dinámica de GFP-CTTN, es decir sobre el ruffling de membrana. Para ello, las células STIM1-KO se transflectaron para la expresión transitoria de STIM1-mCherry y GFP-CTTN. Las células con expresión para ambos marcadores (mCherry y GFP) se seleccionaron para monitorizar la intensidad de fluorescencia de GFP-CTTN, que se realizó en un medio Leibovitz's L-15 + FBS 10%, utilizando un microscopio de epifluorescencia. Como se observa en la figura 43 y en el video suplementario 3, la sobre-expresión de STIM1-mCherry conduce a una recuperación del fenotipo wild-type. Nuestros datos muestran un aumento en la intensidad de los picos de fluorescencia de GFP-CTTN y un aumento en el número de ruffles de membrana (figura 43), confirmando el papel de STIM1 en la formación y dinámica de los ruffles de membrana.

En estos videos en los que se registra la intensidad de fluorescencia de GFP-CTTN en células STIM1-KO transfectadas para la expresión transitoria de STIM1-mCherry también se realizó el análisis STICS (spatio-temporal image correlation spectroscopy) para evaluar la dirección y velocidad de los ruffles de membrana, como se describe en (Hartzell et al., 2016) (Figura 44). Este análisis muestra de forma gráfica

y con claridad la recuperación de la velocidad de ruffling de membrana en aquellas células que sobre-expresan STIM1-mCherry.

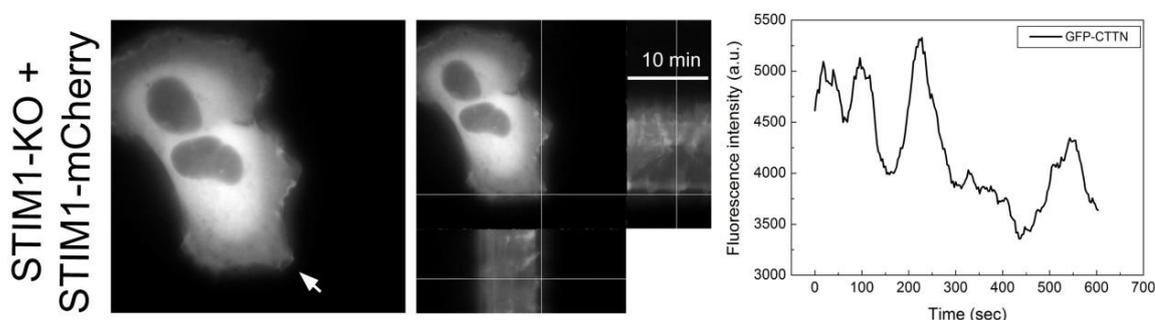


Figura 43. Dinámica de GFP-CTTN en células STIM1-KO transfectadas con STIM1-mCherry. Las células STIM1-KO se transfectaron para la expresión transitoria de STIM1-mCherry y GFP-CTTN. Pasadas 24 horas en cultivo, las células con expresión de mCherry y GFP se seleccionaron para monitorizar la actividad de GFP-CTTN. En el ensayo se utilizó un microscopio de epifluorescencia, con una adquisición de imágenes cada 3 segundos, durante 10 minutos y a 37°C. Durante la adquisición de imágenes, las células se incubaron en un medio libre de bicarbonato, Leibovitz's L-15, suplementado con FBS 10%. Las proyecciones ortogonales muestran la intensidad de fluorescencia en la zona de ruffling durante el desarrollo del experimento (10 min). En el panel de la derecha se muestra una gráfica de la intensidad de fluorescencia de GFP-CTTN, en áreas seleccionadas para evaluar los ruffles de membrana (indicadas por las flechas). La figura es representativa de 21 videos procedentes de 3 ensayos independientes. Barra de escala = 10 μ m. El video completo se muestra en el archivo suplementario 3.

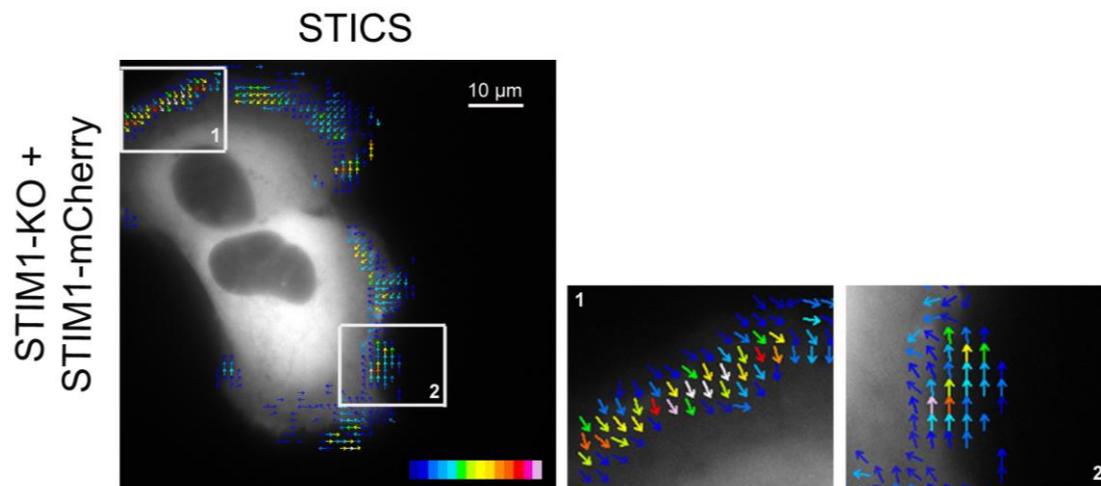


Figura 44. Análisis STICS (spatio-temporal image correlation spectroscopy) de la intensidad de fluorescencia de GFP-CTTN en células U2OS STIM1-KO transfectadas para la expresión de STIM1-mCherry. Las células STIM1-KO se transfectaron para la expresión de STIM1-mCherry y GFP-CTTN. Las células con expresión de ambos marcadores se seleccionaron para monitorizar la intensidad de la actividad del ruffling durante 10 min en un microscopio de epifluorescencia. Los resultados del análisis STICS se muestran como la capa de vectores en una escala de pseudocolor. A la derecha del panel se muestran regiones ampliadas de la célula previamente analizada (izquierda). La figura es representativa de 21 videos generados a partir de 3 ensayos independientes.

De forma consecuente con los datos anteriores, nos propusimos evaluar el efecto de la expresión ectópica de STIM1-mCherry sobre la migración celular. Para ello, las células STIM1-KO se transfectaron para la expresión transitoria de STIM1-mCherry, y como control negativo se emplearon células STIM1-KO transfectadas con el vector mCherry-vacío (empty). En paralelo, se cultivaron células U2OS WT en las mismas condiciones experimentales, y también se transfectaron con el vector mCherry-vacío. Como se observa en la figura 45, las células STIM1-KO que sobre-expresan STIM1-mCherry alcanzan valores de porcentaje de cierre de herida muy similares a las células WT, y en cualquier caso significativamente superiores a los de las células KO. Por lo tanto, nuestros resultados muestran que los resultados observados en la línea celular STIM1-KO son específicos de la pérdida de STIM1, y apoyan la hipótesis de que STIM1 tiene un papel fundamental en la regulación del ruffling de membrana y la migración celular.

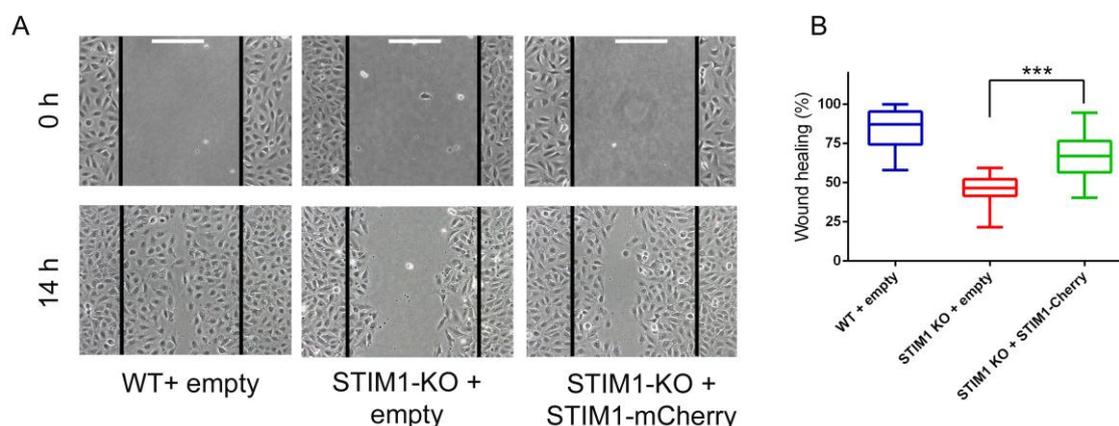


Figura 45. Cierre de herida en placa en células STIM1-KO transfectadas para la expresión de STIM1-mCherry. Las células U2OS STIM1-KO se transfectaron para la expresión transitoria de STIM1-mCherry. Como controles del experimento se utilizaron las líneas WT y STIM1-KO transfectadas con el vector mCherry-vacío (empty). Las células se cultivaron en DMEM suplementado con FBS 10% durante 24 horas. Posteriormente, se realizaron heridas en las placas y se capturaron imágenes con un objetivo 10x. *Panel A:* Imágenes de las heridas a tiempo inicial (0 h) y tiempo final del experimento (14 h). El análisis cuantitativo de las imágenes se realizó con el software ImageJ. Barra de escala = 200 μ m. *Panel B:* Representación gráfica de los datos de porcentaje de cierre de herida procedentes de 3 ensayos independientes (n = 70, WT; n = 60, STIM1-KO; n = 100 STIM1-KO + STIM1-mCherry). Las muestras se analizaron con el test estadístico t-student para muestras independientes. (***) p < 0,001.

2.9. Localización de ORAI1 en el frente de migración.

A partir de los resultados anteriores hemos comprobado que fosfo-STIM1 es un marcador de áreas ricas en cortactina, y en consecuencia un marcador del frente de migración. Por ello, y debido a que STIM1 es el activador más importante del canal de Ca^{2+} de membrana plasmática ORAI1, nos propusimos estudiar si en este frente de migración encontramos también enriquecimiento en ORAI1.

Para ello las células se transfectaron para la expresión transitoria de ORAI1-GFP y se utilizó CTTN endógena o mCherry-CTTN como marcadores del frente de migración. En el panel inferior de la figura 46, se muestra el resultado a partir de células transfectadas con el vector ORAI1-GFP, fijadas con PFA al 4%, y con las que se llevó a cabo una inmunolocalización con anticuerpo anti-CTTN. En el panel superior, las células se transfectaron para la expresión transitoria de ORAI1-GFP y mCherry-CTTN. En las imágenes de microscopía se observa que ORAI1 presenta una localización cortical (columna de la izquierda), siguiendo un patrón de localización similar al que observamos para CTTN (columna central). En la figura 46 ORAI1-GFP se muestra en verde y CTTN en rojo (CTTN endógena en el panel inferior y mCherry-CTTN en el panel superior) lo que permite superponer ambas imágenes (merge) y observar la co-localización de ORAI1-CTTN. Estos resultados sugieren que ORAI1, al igual que STIM1, podría participar en la reorganización del citoesqueleto requerida para la migración y formación de ruffles de membrana.

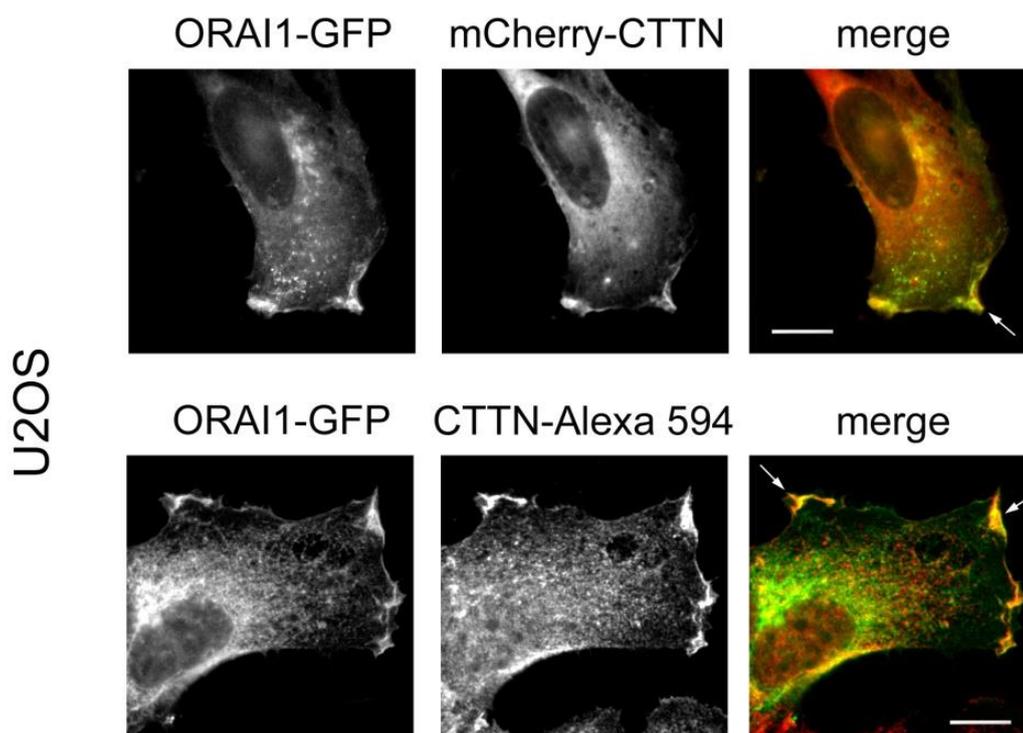


Figura 46. Co-localización de ORAI1-GFP y cortactina. *Panel superior:* Las células se transfectaron para la expresión de ORAI1-GFP y mCherry-CTTN. *Panel inferior:* Las células transfectadas para la expresión de ORAI1-GFP se fijaron y se realizó una inmunolocalización con un anticuerpo anti-CTTN para evaluar la localización de CTTN endógena. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo anti-mouse IgG-AlexaFluor594. En la figura, ORAI1-GFP se muestra en verde (columna izquierda), cortactina se muestra en rojo (columna central) y en el panel de la derecha se muestra la superposición de ambos marcadores (merge). Estas imágenes son representativas de al menos 10 experimentos independientes. Barra de escala = 10 μ m.

2.10. Generación de la línea ORAI1-KO mediante el sistema CRISPR/Cas9.

Los resultados anteriores sugieren que ORAI1 es regulador del ruffling de membrana puesto que: (i) Fosfo-STIM1 y ORAI1 muestran una localización restringida a la zona de avance de migración (figuras 29, 30 y 46) y (ii), las células STIM1-KO muestran una disminución en el ruffling de membrana y la migración celular (figuras 39-41). Por ello, y puesto que la línea STIM1-KO nos ha permitido obtener resultados decisivos para determinar la participación de STIM1 en migración y en la formación de ruffles de membrana, nos planteamos generar una línea celular ORAI1-KO con el objetivo de estudiar el papel del canal de Ca^{2+} en la reorganización cortical del citoesqueleto.

Para la obtención de una línea celular U2OS ORAI1-KO, se utilizó de nuevo el sistema de edición genómica CRISPR/Cas9 utilizado anteriormente para la generación de las líneas PC3 STIM1-KO y U2OS STIM1-KO. Las células U2OS se transfectaron con vectores para la expresión de la nucleasa Cas9 D10A (Cas9 nickase) y RNAs guías específicos (gRNAs) diseñados para actuar sobre dianas genómicas que afectaron a las dos variantes transcripcionales conocidas de ORAI1 humano (proteín NP_116179.2 y una variante más corta con número de acceso de Uniprot A0A087WTK9) (figura 47).

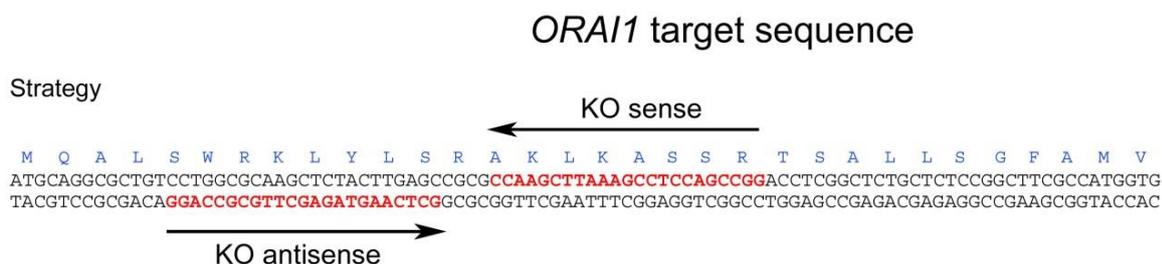


Figura 47. Knock-out de la expresión de ORAI1 mediante el sistema de edición genómica CRISPR/Cas9. En la figura se observa la región diana para los RNAs guías (indicados por el tipo de fuente en color rojo) empleada para causar un doble corte en el DNA del exón 1 del locus de *ORAI1*.

Tal y como se ha explicado para la línea celular STIM1-KO en PC3 y U2OS (ver Materiales y Métodos), tras dos días en medio de selección con puromicina, las células se cultivaron hasta obtener una monocapa. En ese momento el cultivo celular era mixto, es decir, que contenía células con diferentes modificaciones genéticas en el locus de *ORAI1*. Las células de este cultivo mixto se individualizaron mediante citometría de flujo, para así obtener células individuales que se cultivaron hasta alcanzar cultivos

expandidos de los que se purificó el DNA genómico para su posterior secuenciación. El análisis de secuenciación genómica permitió aislar un clon de células que contiene una deleción de 16 bp + 14 bp en el locus de *ORAI1*. Esta modificación genética provoca un cambio en la fase de lectura ribosomal y la aparición de un codón de parada prematuro en ambos alelos, lo que impide la síntesis de ORAI1 (figura 48).

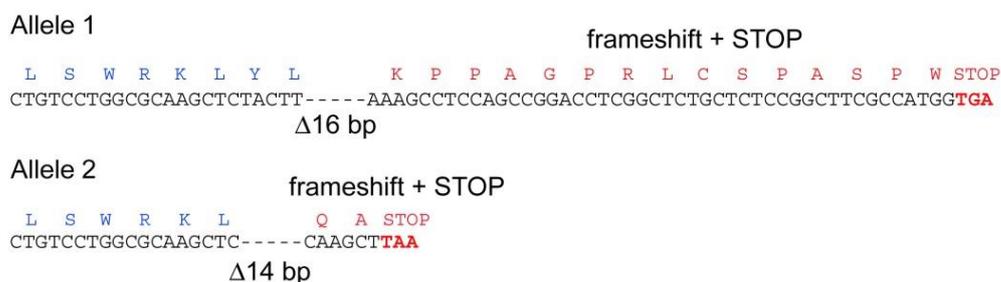


Figura 48. Secuencia parcial del DNA genómico en el clon ORAI1-KO seleccionado. El clon de células seleccionado como knock-out de ORAI1 contiene una deleción de 16 + 14 bp. Como resultado, se produce un cambio en la fase de lectura ribosomal y la aparición de un codón de parada prematuro (indicados en el texto en rojo).

La expresión de ORAI1 se comprobó mediante inmunoblot, empleando para ello un anticuerpo anti-ORAI1. Como observamos en la figura 49, cargando la misma cantidad de proteína (control de carga GAPDH) no se observa expresión de la proteína ORAI1 en el lisado de células tratadas para la obtención del knock-out de ORAI1, mientras que sí es detectable en el lisado celular WT. Este resultado validó la especificidad del anticuerpo y confirmó el knock-out para el gen (*ORAI1*).

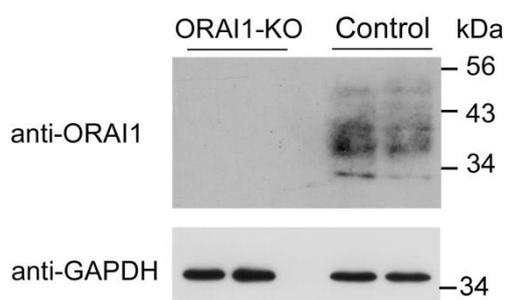


Figura 49. Análisis de la expresión de ORAI1 mediante inmunoblot. La expresión de ORAI1 se analizó mediante inmunoblot utilizando un anticuerpo anti-ORAI1. No se detectó expresión de ORAI1 en la condición ORAI1-KO, mientras que sí se detectó la proteína endógena en células sin modificar (Control). Como control de carga se utilizó el nivel de GAPDH total. En este ensayo se utilizaron 40 µg de lisado total.

2.11. Caracterización de la línea U2OS ORAI1-KO.

Siguiendo el esquema de trabajo empleado para la caracterización de las líneas PC3 STIM1-KO y U2OS STIM1-KO, la línea celular U2OS ORAI1-KO se caracterizó

Resultados

mediante: (i) el análisis del ciclo celular y (ii) la evaluación del influjo de Ca^{2+} extracelular mediante una medida de SOCE.

(i) La distribución de las células U2OS ORAI1-KO en las distintas fases del ciclo celular así como el nivel de células apoptóticas se analizó mediante citometría de flujo. Para ello, las células U2OS WT y ORAI1-KO se cultivaron durante 48 horas hasta alcanzar una confluencia del 50-60%. Los resultados de la figura 50 no son concluyentes, ya que la supresión de la expresión de ORAI1 condujo a un leve aumento de células en G0/G1 y una leve disminución de G2/M, de forma similar a lo observado en células PC3 STIM1-KO, pero con diferencias con respecto a lo observado en células U2OS STIM1-KO, lo que hace suponer que este estudio necesite de un trabajo más detallado en el que se valore el impacto sobre el ciclo celular de las distintas isoformas de proteínas STIM (STIM1 y STIM2), y de proteínas ORAI (ORAI1, ORAI2 y ORAI3).

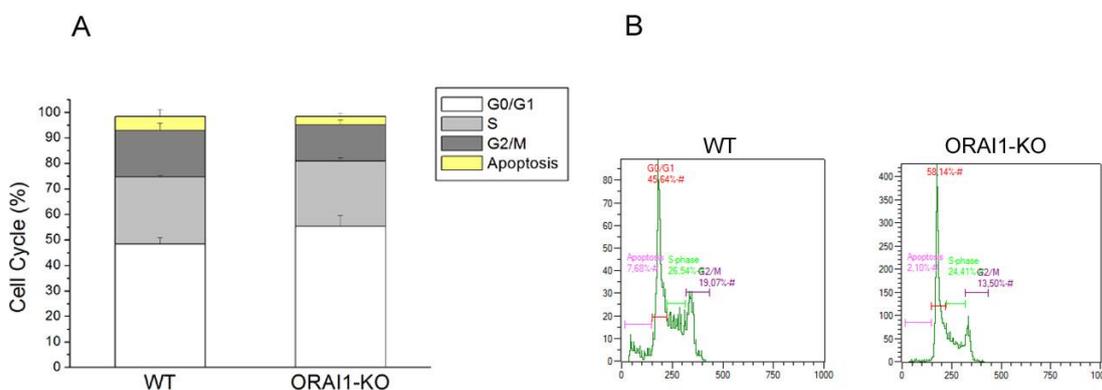


Figura 50. Distribución de ciclo celular de células U2OS wild-type y ORAI1-KO. Las células se cultivaron durante 48 horas y se fijaron con etanol al 70%. Las distintas fases del ciclo celular y el número de células apoptóticas de cada línea celular se analizó mediante citometría de flujo. *Panel A:* Los datos obtenidos en el análisis se representan en una gráfica de columnas apiladas. *Panel B:* Histogramas representativos de los datos obtenidos del análisis de citometría de flujo con la identificación de las distintas fases del ciclo celular.

(ii) Como ya se ha descrito en esta memoria, el nivel total de ORAI1 y STIM1 es crítico para una óptima activación de SOCE. Por ello, medimos la entrada de Ca^{2+} en respuesta a taspigargina para determinar el efecto de la ausencia de expresión de ORAI1 en esta ruta de entrada de Ca^{2+} . La medida de SOCE se llevó a cabo siguiendo el protocolo estándar que se detalla en el apartado de Materiales y Métodos. En la figura 51 (panel A), se muestran los datos obtenidos tras inducir el vaciado de depósitos con Tg 1 μM y añadir CaCl_2 2 mM al medio extracelular. El incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que se observa tras 6 min de tratamiento con Tg corresponde principalmente a la apertura de los canales SOCs. En la medida de SOCE de la línea celular U2OS ORAI1-KO se observó una acusada disminución en el ratio F340/F380 (línea roja) frente a las células

U2OS WT (línea negra), un resultado que demuestra que el clon de células seleccionado como ORAI1-KO presenta un notable déficit de SOCE, confirmándose así el knock-out funcional en esta línea celular.

En el panel A de la figura 51 las células cargadas con fura 2-AM se trataron con EGF 50 ng/ml + CaCl_2 2 mM para evaluar la entrada de Ca^{2+} . Pasados 6 min de tratamiento, el medio de ensayo fue reemplazado por HBSS libre de Ca^{2+} + EGF 50 ng/ml para evaluar la disminución en la entrada de Ca^{2+} . En el panel B se representa la media de los datos registrados en este ensayo para 38 células ORAI1-KO y 42 células WT. En los resultados observamos que la entrada de Ca^{2+} en la línea U2OS ORAI1-KO, al igual que sucedía con el estímulo de Tg, es muy inferior frente a la entrada de Ca^{2+} en las células U2OS WT en respuesta a EGF. Estos resultados muestran que ORAI1 es el principal miembro de la familia ORAI en el control de SOCE en la línea U2OS y que EGF activa SOCE de forma dependiente de ORAI1 en este tipo celular.

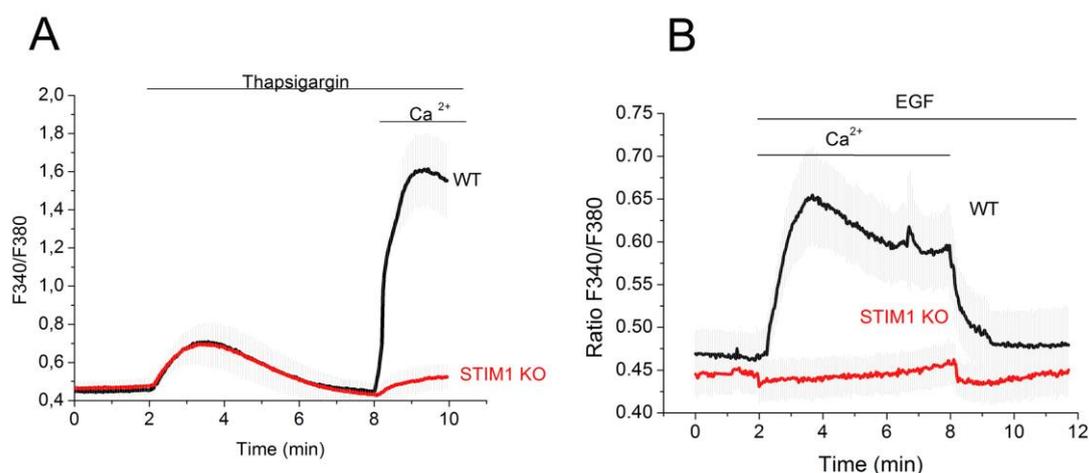


Figura 51. Medida de SOCE en células U2OS WT y ORAI1-KO. *Panel A:* las células U2OS wild-type (línea negra) y ORAI1-KO (línea roja) se cargaron con fura 2-AM y se les añadió Tg 1 μM en medio libre de Ca^{2+} . Transcurridos 6 min se añadió CaCl_2 2 mM al medio extracelular. El ratio F340/F380 se monitorizó por epifluorescencia como se describe en Materiales y Métodos. Los datos representan la media de 3 ensayos independientes ($n > 30$ células por condición). *Panel B:* Las células cargadas con fura 2-AM se trataron con EGF 50 ng/ml + CaCl_2 2 mM. Pasados 6 min de tratamiento, el medio de ensayo se reemplazó por HBSS sin Ca^{2+} ni EGF 50 ng/ml. Los datos representan la media de los valores registrados a partir de 3 ensayos independientes ($n = 38$ células ORAI1-KO y $n = 42$ células WT).

2.12. ORAI1 regula la dinámica de los ruffles de membrana en U2OS.

La localización en áreas corticales de membrana de ORAI1 y la co-localización de ORAI1 y CTTN son resultados que han dirigido nuestra atención hacia el estudio del papel de ORAI1 en la reorganización del citoesqueleto en la zona del frente de migración. En este sentido, nos propusimos monitorizar la expresión de GFP-CTTN en células U2OS ORAI1-KO para evaluar el ruffling de membrana en estas zonas de formación de lamelipodios. Para ello, las células U2OS WT y ORAI1-KO se cultivaron en DMEM suplementado con 10% de suero, en cubreobjetos pre-tratados con colágeno y se transfectaron para la expresión transitoria de GFP-CTTN. Para evaluar la dinámica de los ruffles de membrana se monitorizó la intensidad de fluorescencia de GFP-CTTN en un microscopio de epifluorescencia durante 10 minutos en un medio libre de bicarbonato (Leibovitz's L-15 + 10% de suero). Los resultados mostraron un menor número de ruffles y de protrusiones en la membrana de las células ORAI1-KO, comparadas con las células WT (indicado por las flechas en las figuras 39 y 52 para WT y ORAI1-KO respectivamente). En la figura 52 los ruffles de membrana se analizaron con las proyecciones ortogonales de la imagen de una célula ORAI1-KO y también mediante una gráfica de los datos de fluorescencia registrados en estas áreas.

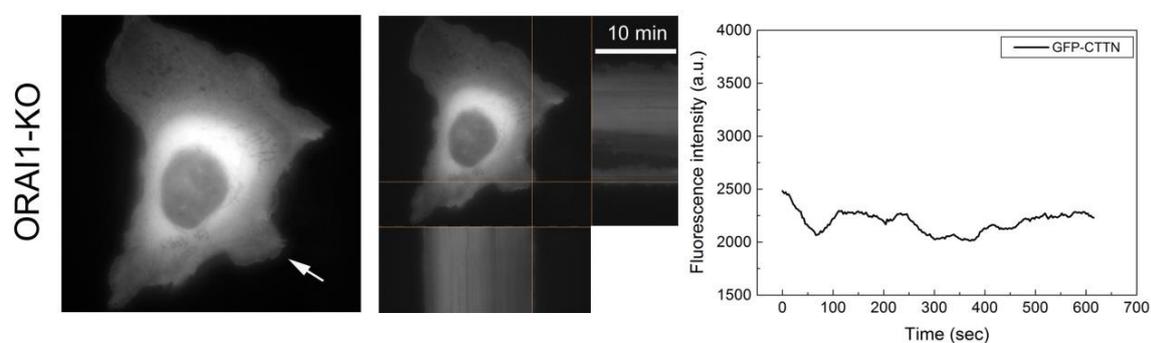


Figura 52. Dinámica de GFP-CTTN en células U2OS WT y ORAI1-KO. Las células U2OS ORAI1-KO se transfectaron para la expresión transitoria de GFP-CTTN. Pasadas 24 horas en cultivo se monitorizó la actividad de GFP-CTTN con una adquisición de imágenes cada 3 segundos, durante 10 minutos, a 37°C. Durante la adquisición, las células se incubaron en un medio libre de bicarbonato, Leibovitz's L-15, suplementado con 10% de suero. Las proyecciones ortogonales de las áreas marcadas muestran la intensidad de fluorescencia durante el ensayo (10 min). En el panel de la derecha se muestra una gráfica de la intensidad de fluorescencia de GFP-CTTN en el área seleccionada para evaluar los ruffles de membrana. La figura es representativa de 20 videos procedentes de 3 ensayos independientes. Barra de escala = 10 μ m. El video completo se muestra en el archivo suplementario 4.

Además, se realizó el análisis STICS de los videos registrados en células ORAI1-KO, que indican la dirección y velocidad de los ruffles de membrana, y que se muestran

en una escala de pseudocolor. Estos valores indican de modo gráfico que existe una fuerte reducción del ruffling en células ORAI1-KO (figura 53).

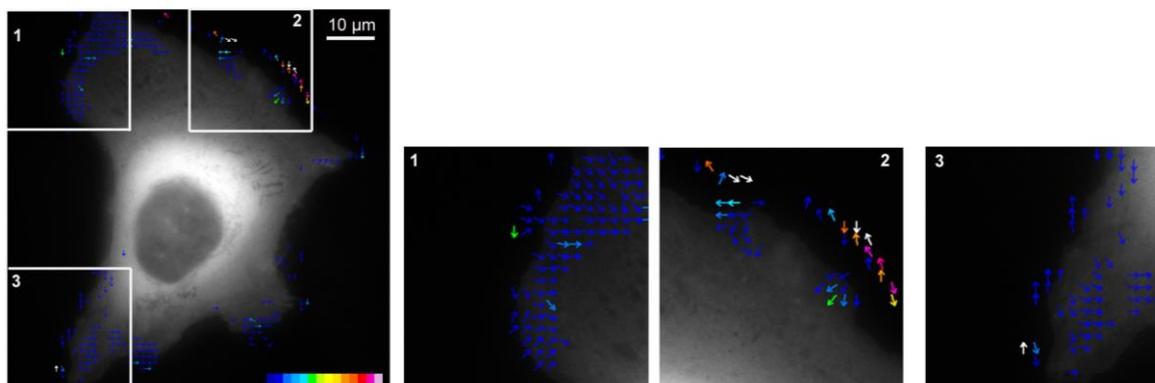


Figura 53. Análisis STICS (spatio-temporal image correlation spectroscopy) de la intensidad de fluorescencia de GFP-CTTN en células U2OS ORAI1-KO. Las células U2OS ORAI1-KO se transfectaron para la expresión transitoria de GFP-CTTN. La actividad de GFP-CTTN se monitorizó durante 10 minutos en un microscopio de epifluorescencia. Los resultados del análisis STICS se muestran como la capa de vectores en una escala de pseudocolor. A la derecha se muestran regiones ampliadas de la célula previamente analizada.

2.13. ORAI1 es un regulador positivo de la migración celular.

La línea celular ORAI1-KO generada nos permite obtener resultados consistentes sobre la realidad fisiológica de la participación del influjo de Ca^{2+} en la reorganización del citoesqueleto cortical y formación de ruffles de membrana, por lo que nos planteamos estudiar la participación de ORAI1 en la migración celular. Con este objetivo se realizaron ensayos de sellamiento de heridas en la línea ORAI1-KO, utilizando la línea WT como control del experimento. Para ello, se cultivaron células U2OS WT y ORAI1-KO en medio DMEM suplementado con 10% de suero. Pasadas 24 horas en cultivo se hicieron las heridas en las monocapas de células (ver Métodos) cuando se había alcanzado una confluencia del 80-90%. En este momento se capturaron imágenes de la herida (tiempo 0), y se continuó el cultivo durante 14 horas adicionales, momento en el que las células fueron fijadas y se capturaron las imágenes a tiempo final del ensayo. El porcentaje de cierre de herida se calculó utilizando el software ImageJ.

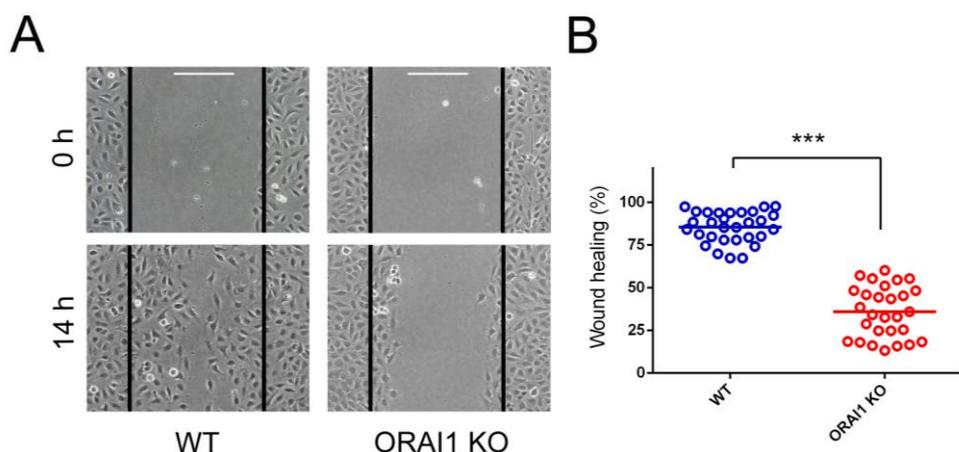


Figura 54. Cierre de heridas en placa en células U2OS WT y ORAI1-KO. Las células U2OS WT y ORAI1-KO se sembraron en placas de cultivo pre-tratadas con colágeno al 0,01% y se cultivaron en DMEM suplementado con suero al 10% durante 24 horas. Posteriormente se realizaron heridas en las placas y se capturaron imágenes en el microscopio óptico con un objetivo 10x. *Panel A:* Imágenes de las heridas a tiempo inicial (0 h) y tiempo final del experimento (14 h). El análisis cuantitativo de las imágenes se realizó con el software ImageJ. Barra de escala = 200 μ m. *Panel B:* Representación de los datos de porcentaje de sellamiento de herida utilizando al menos 28 imágenes procedentes de 4 ensayos independientes. Las muestras se analizaron con el test estadístico t-student para muestras independientes. (***) $p < 0,001$.

En la figura 54 podemos observar imágenes representativas de las heridas a tiempo inicial y a tiempo final, observándose que la migración de células ORAI1-KO es significativamente menor con respecto a la línea WT. Estos resultados confirman al eje STIM1-ORAI1 como la principal ruta de señalización de entrada de Ca^{2+} extracelular que participa en la regulación de la reorganización del citoesqueleto cortical y la generación de protrusiones y lamelipodios que permiten el avance durante la migración celular.

2.14. La sobre-expresión ectópica de ORAI1-mCherry permite la recuperación del fenotipo silvestre.

Al igual que con la línea celular STIM1-KO, nos planteamos comprobar si la sobre-expresión ectópica de ORAI1 permitía la recuperación del fenotipo WT en la línea celular ORAI1-KO. Con este objetivo, las células ORAI1-KO se transfectaron para la expresión transitoria de ORAI1-mCherry y se realizó una medida de SOCE, siguiendo el protocolo detallado en el apartado de Materiales y Métodos. Como resultado, observamos una completa recuperación de SOCE en aquellas células transfectadas con ORAI1-mCherry (línea azul) (figura 55). Como control de este experimento se utilizaron aquellas células que no fueron transfectadas con ORAI1-mCherry, observándose una fuerte disminución en la entrada de Ca^{2+} extracelular (línea roja). Además, en la gráfica

se muestra el nivel de SOCE en la línea celular U2OS WT (línea negra). Estos resultados confirmaron que los valores obtenidos en la medida de SOCE en la línea celular ORAI1-KO eran específicos de la pérdida de expresión de ORAI1.

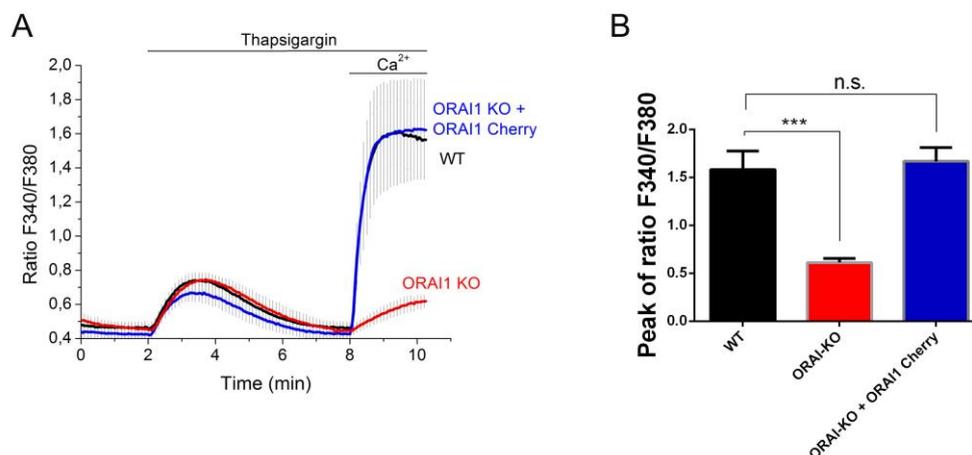


Figura 55. SOCE en células ORAI1-KO expresando ORAI1-mCherry. *Panel A:* Los cultivos celulares se privaron de suero durante 12-16 horas. Las células ORAI1-KO se transfectoron para la expresión de ORAI1-mCherry, y las células con expresión de mCherry se seleccionaron para evaluar SOCE (línea azul). En la gráfica se representan los datos de SOCE de U2OS WT (línea negra) y ORAI1-KO (línea roja). El ratio F340/F380 se monitorizó por epifluorescencia como se describe en Materiales y Métodos. Los datos representan la media de 3 ensayos independientes ($n > 30$ células por condición). *Panel B:* A partir de los datos del panel A se representa la $[Ca^{2+}]_i$ máxima alcanzada por la línea WT, comparándola con la $[Ca^{2+}]_i$ alcanzada por las líneas ORAI1-KO y ORAI1-KO + ORAI1mCherry, en el mismo momento de la medida. Los datos se analizaron con el test estadístico t-student para muestras independientes (n.s., no significativo).

Para demostrar la especificidad de los resultados de la línea celular ORAI1-KO se comprobó el efecto de la sobre-expresión ectópica de ORAI1-mCherry sobre la dinámica de GFP-CTTN. Para ello, las células ORAI1-KO se transfectoron para la expresión de ORAI1-mCherry y GFP-CTTN. Las células que presentaron expresión de ambos marcadores (mCherry y GFP) se seleccionaron para monitorizar la intensidad de fluorescencia de GFP-CTTN, que se realizó en un medio Leibovitz's L-15 + 10% de suero, utilizando un microscopio de epifluorescencia. En la figura 56 y en el video suplementario 5 observamos que los picos de intensidad de fluorescencia de GFP-CTTN y el número de ruffles de membrana son muy similares en la línea ORAI1-KO transfectada para la expresión de ORAI1-mCherry y en la línea celular WT (mostrada en la figura 40 y el archivo suplementario 1).

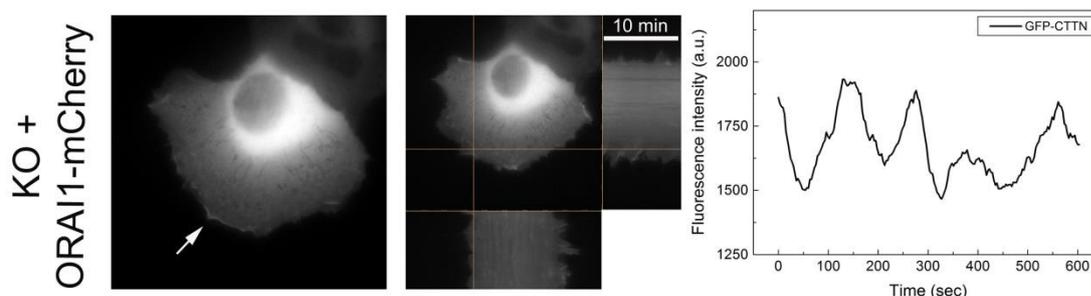


Figura 56. Dinámica de GFP-CTTN en células ORAI1-KO transfectadas con ORAI1-mCherry. Las células ORAI1-KO se transfecaron para la expresión transitoria de ORAI1-mCherry y GFP-CTTN. Pasadas 24 horas las células con expresión de mCherry y GFP se seleccionaron para monitorizar las variaciones de fluorescencia de GFP-CTTN. En el ensayo se utilizó un microscopio de epifluorescencia, con una adquisición de imágenes cada 3 segundos, durante 10 minutos y a 37°C. Durante la adquisición, las células se incubaron en un medio libre de bicarbonato, Leibovitz's L-15, suplementado con 10% de suero. Las proyecciones ortogonales de las áreas marcadas muestran la intensidad de fluorescencia durante el desarrollo del ensayo (10 min). En el panel de la derecha se muestra una gráfica de la intensidad de fluorescencia de GFP-CTTN en áreas seleccionadas para evaluar los ruffles de membrana. La figura es representativa de 19 vídeos procedentes de 3 ensayos independientes. Barra de escala = 10 μ m. El video completo se muestra en el archivo suplementario 5.

Para evaluar la dirección y velocidad de los ruffles de membrana se realizó un análisis STICS de los videos, en los que se registra la intensidad de fluorescencia de GFP-CTTN en células ORAI1-KO transfecadas transitoriamente para la expresión de ORAI1-mCherry (figura 57). En la gráfica se observa que la velocidad de los ruffles de membrana en células ORAI1-KO transfecadas con ORAI1-mCherry es muy similar a la observada en la línea celular WT (figura 40). Estos resultados sugieren de nuevo que ORAI1 tiene un papel directo en la formación y dinámica de los ruffles de membrana.

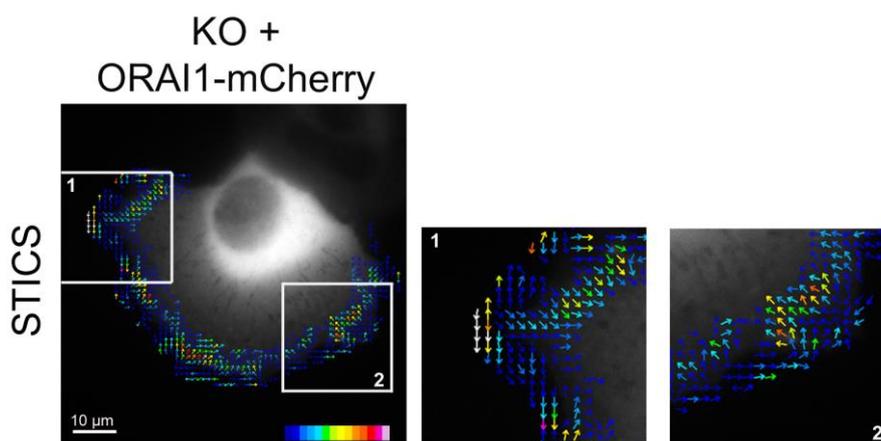


Figura 57. Análisis STICS (spatio-temporal image correlation spectroscopy) de la intensidad de fluorescencia de GFP-CTTN en células U2OS ORAI1-KO transfecadas con ORAI1-mCherry. Las células ORAI1-KO se transfecaron para la expresión transitoria de ORAI1-mCherry y GFP-CTTN. Las células positivas para la expresión de los marcadores mCherry y GFP se seleccionaron para monitorizar la intensidad de fluorescencia de GFP-CTTN durante 10 min en un microscopio de epifluorescencia. El análisis STICS se muestra como una superposición de vectores en una escala de pseudocolor. A la derecha se muestra imágenes ampliadas de la célula previamente analizada (izquierda). La figura es representativa de 19 vídeos de 3 ensayos independientes.

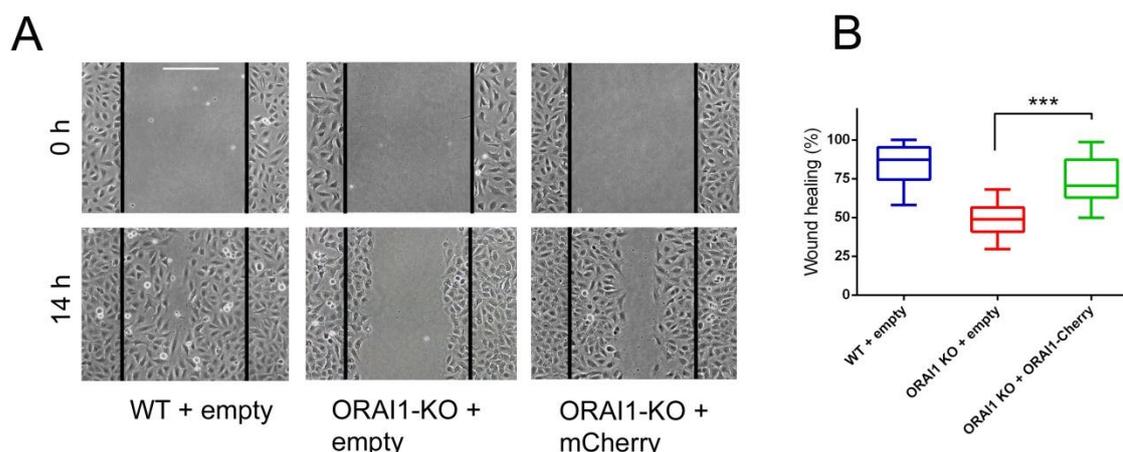


Figura 58. Cierre de heridas en células ORAI1-KO transfectadas con ORAI1-mCherry. Las células U2OS ORAI1-KO se transfectaron con ORAI1-mCherry. Como controles las líneas WT y ORAI1-KO se transfectaron con el vector mCherry-vacío (empty). Las células se cultivaron en DMEM suplementado con suero al 10% durante 24 horas. Posteriormente se realizaron heridas en las placas y se capturaron imágenes con un objetivo 10x. *Panel A:* Imágenes de las heridas a tiempo inicial (0 h) y tiempo final del experimento (14 h). El análisis cuantitativo de las imágenes se realizó con el software ImageJ. Barra de escala = 200 μ m. *Panel B:* Representación gráfica de los datos de porcentaje de cierre de herida procedentes de 3 ensayos independientes (n = 70 muestras WT; n = 59 muestras STIM1-KO; n = 100 muestras para ORAI1-KO + ORAI1-mCherry). Las muestras se analizaron con el test estadístico t-student para muestras independientes (***) $p < 0,001$.

Finalmente estudiamos el efecto de la expresión ectópica de ORAI1-mCherry sobre la migración celular. Para ello, las células ORAI1-KO se transfectaron para la expresión transitoria de ORAI1-mCherry y como control negativo se compararon con las células ORAI1-KO transfectadas con el vector mCherry-vacío (empty). En paralelo se cultivaron, en las mismas condiciones experimentales, células U2OS WT que también se transfectaron con el vector mCherry-vacío. Como se observa en la figura 58 las células que sobre-expresan ORAI1-mCherry alcanzan valores de cierre de herida en placa muy similares a las células WT, confirmando la recuperación de la motilidad celular y la hipótesis de que STIM1 y ORAI1 promueven el ruffling y regulan positivamente la migración celular.

2.15. Interacción de ORAI1 y cortactina en células U2OS.

Puesto que los resultados anteriores muestran una intensa actividad de ORAI1 y CTTN en áreas de ruffling de membrana, nos propusimos evaluar simultáneamente a ORAI1-CTTN en estas áreas. Para ello, se realizó una doble transfección para la expresión transitoria de ORAI1-GFP y mCherry-CTTN, y la expresión de ambos marcadores se monitorizó con objeto de observar si las dos proteínas mostraban un

movimiento paralelo y/o dependiente entre sí. El video suplementario 6 muestra durante 10 minutos la dinámica de ambas proteínas en U2OS. La figura 59 (panel izquierdo), muestra una imagen representativa del video, en la que se observan los diferentes canales de fluorescencia analizados, GFP, mCherry, y la combinación de ambos. También se observa el cálculo del ratio GFP/mCherry (llevado a cabo con el software NIS Elements AR) en una escala de pseudocolor con escala de ratio 0-2. El análisis del ratio de la fluorescencia GFP/mCherry (figura 59, panel derecho) indica que el perfil de los picos de fluorescencia es idéntico para ambas proteínas en las zonas de ruffling de membrana, lo que sugiere una probable interacción (al menos funcional e incluso física) de ORAI1-CTTN, por lo que decidimos profundizar en esta posibilidad realizando un ensayo de co-precipitación entre ambas proteínas.

En la figura 60 (panel A), se evaluó la posible interacción entre ambas proteínas a nivel endógeno. Para ello, el lisado celular, obtenido a partir de células U2OS sin estimulación alguna, se incubó con una resina de agarosa unida al anticuerpo anti-ORAI1. A continuación, se precipitó la fracción de resina-anti-ORAI1 y se analizó la cantidad de CTTN endógena co-inmunoprecipitada mediante inmunoblot y utilizando un anticuerpo específico anti-CTTN. Como control, una muestra del lisado celular se incubó con resina de agarosa sin anticuerpo. El resultado muestra una co-precipitación específica entre ambas proteínas en estas condiciones experimentales (figura 60).

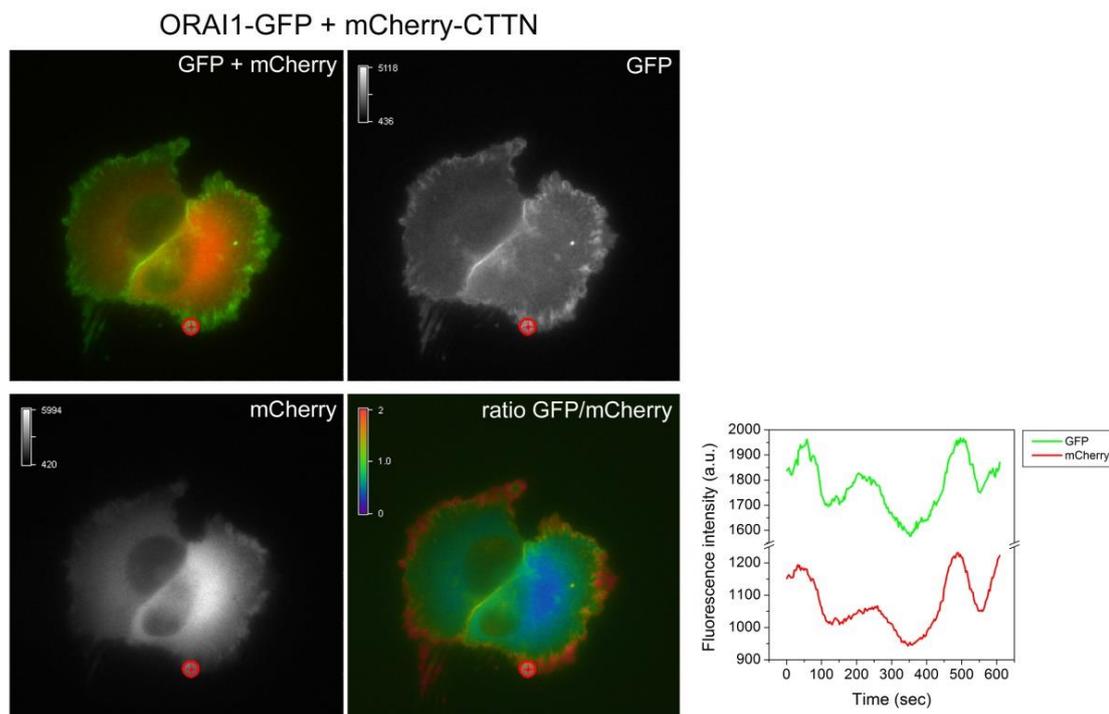


Figura 59. Interacción de ORAI1-CTTN en células U2OS. Células U2OS WT se transfectaron para la expresión transitoria de ORAI1-GFP/mCherry-CTTN y se monitorizó la fluorescencia de ambos marcadores en medio Leibovitz's L-15 suplementado con 10% de suero. La adquisición de la fluorescencia se registró cada 3 segundos durante 10 minutos y las imágenes se analizaron separando ambos canales (GFP y mCherry). El ratio GFP/mCherry se calculó desde los canales individuales y se muestra en una escala de pseudocolor (escala de ratio 0-2). El panel de la derecha muestra una representación de la variación de la intensidad de fluorescencia de los marcadores en un área seleccionada. El video completo se muestra en el archivo suplementario 6.

Este resultado fue corroborado al sobre-exresar ORAI1-GFP y llevar a cabo una precipitación de GFP con la resina GFP-Trap (figura 60, panel B). Tras esta precipitación se analizó la cantidad de CTTN endógena co-precipitada. Como control negativo del experimento se transfectaron células U2OS con el vector GFP-vacío (empty). En los resultados observamos una co-precipitación específica de CTTN endógena, ya que sólo se observa esta banda inmunoreactiva cuando se precipita ORAI1-GFP, y no en el control negativo. El resultado de la co-precipitación de ORAI1-CTTN sugiere que ambas proteínas forman parte del mismo complejo macromolecular. Estos resultados dirigen nuestra atención hacia nuevos objetivos de estudio como son el mecanismo y la regulación de la interacción entre ORAI1 y CTTN, objetivos que se abordaran en la parte final de este trabajo de investigación. Además, los resultados mostrados en este capítulo también sugieren que las proteínas ORAI1 y STIM1 actúan cooperando con el regulador del citoesqueleto CTTN, y posiblemente con otros

reguladores de la motilidad celular, como la GTPasa Rac1, un activador conocido de CTTN, una hipótesis que necesita ser estudiada en el futuro.

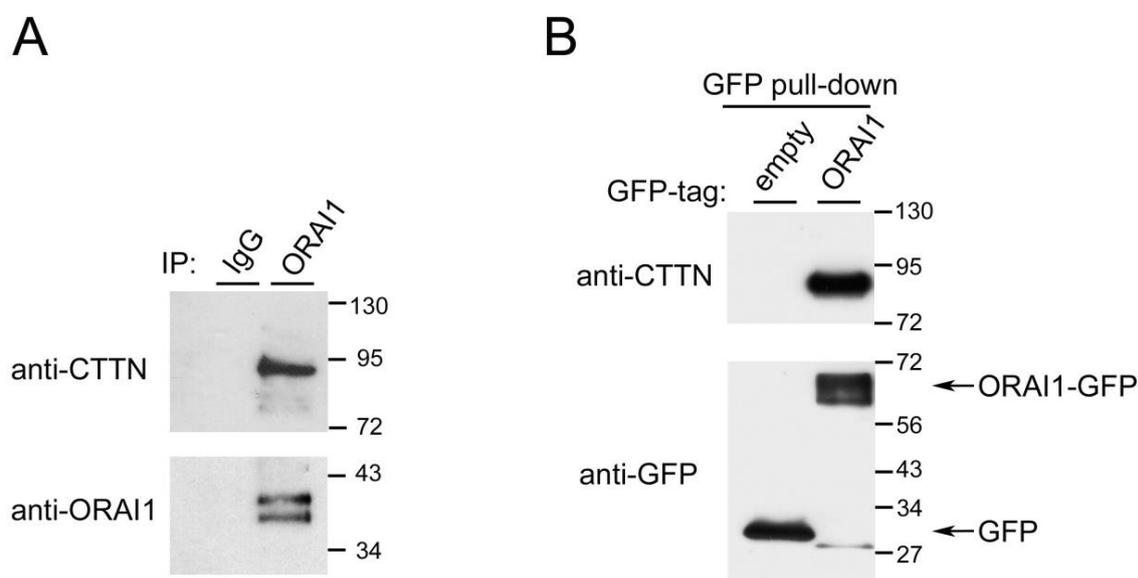


Figura 60. Co-precipitación de ORAI1-CTTN en células U2OS. (A) ORAI1 endógeno se inmunoprecipitó con un anticuerpo anti-ORAI1 conjugado a una resina de agarosa (beads) (calle 2). La cantidad de ORAI1 inmunoprecipitado se detectó mediante inmunoblot utilizando un anticuerpo anti-ORAI1 (panel inferior), y el nivel de CTTN co-inmunoprecipitado se detectó utilizando un anticuerpo anti-CTTN (panel superior). Como control negativo, un lisado celular en las mismas condiciones experimentales se incubó con resina de agarosa con suero pre-inmune (calle 1). La imagen es representativa de 3 experimentos independientes procedentes de 3 cultivos celulares. (B) Células U2OS se transfectaron para la expresión transitoria de GFP (calle 1) u ORAI1-GFP (calle 2). Los lisados se precipitaron con una resina de agarosa con afinidad por GFP (GFP-Trap, ChromoTek). La cantidad de CTTN endógena unida a ORAI1-GFP se evaluó mediante inmunoblot utilizando un anticuerpo anti-CTTN (panel superior), y la cantidad de GFP u ORAI1-GFP precipitado se cuantificó utilizando un anticuerpo anti-GFP. Los resultados mostrados son representativos de 4 experimentos independientes procedentes de 4 cultivos celulares diferentes.

3. EL RECLUTAMIENTO DE ORAI1 EN RUFFLES DE MEMBRANA ESTÁ MEDIADO POR CTTN.

Los resultados mostrados anteriormente confirmaron la participación de ORAI1 y STIM1 en la regulación del ruffling de membrana, cuya actividad resulta ser dependiente del influjo de Ca^{2+} extracelular. La localización polarizada de fosfo-STIM1 y ORAI1 en el frente de migración, utilizando CTTN como marcador de ruffles de membrana, sugiere la participación de los componentes principales de SOCE en la remodelación del citoesqueleto necesaria para la migración. Por otra parte, la co-precipitación de ORAI1-CTTN sugiere un papel relevante de este complejo macromolecular en la regulación del citoesqueleto mediada por SOCE. Por lo tanto, los próximos experimentos tuvieron como objetivo estudiar el papel de CTTN en la localización de ORAI1 en estas regiones específicas de la membrana plasmática.

3.1. Regulación de la interacción ORAI1-CTTN por EGF.

Puesto que está descrita la participación del factor de crecimiento epidérmico (EGF) en proliferación y migración (Al Moustafa et al., 2012; Hardy and May, 2002) nos propusimos estudiar la interacción de ORAI1-CTTN en respuesta al tratamiento con EGF y así determinar si existe una alteración del complejo ORAI1-CTTN. Para ello, las células U2OS se sembraron y transfectaron para la expresión transitoria de ORAI1-GFP. Tras 8 horas de privación de suero en medio RPMI las células se estimularon con 50 ng/ml de EGF en un medio HBSS libre de Ca^{2+} durante 10 min o se dejaron en reposo, sin tratar (medio RPMI). El lisado total de cada condición se incubó con la resina GFP-Trap con afinidad por GFP para precipitar ORAI1-GFP, y se analizó la cantidad de CTTN endógena co-precipitada, utilizando un anticuerpo anti-CTTN. Como control negativo del experimento se utilizaron células transfectadas con el vector GFP-vacío (empty). En los resultados mostrados de la figura 61 observamos una co-precipitación específica de ORAI1-GFP y CTTN endógena que disminuye notablemente en respuesta al tratamiento con EGF. Hay que señalar aquí que estas condiciones representan una situación extrema que conduce al vaciado de depósitos intracelulares (EGF, que estimula vaciado de depósitos, en un medio libre de Ca^{2+} que no permite su llenado). Estos resultados se analizaron estadísticamente confirmando que la diferencia entre ambas condiciones de estudio (en presencia o ausencia de EGF) es significativa.

En resultados anteriores de inmunolocalización hemos observado una notable co-localización de ORAI1-CTTN en zonas de ruffling de membrana tras tratar las células con EGF, por lo que el resultado esperado inicialmente sería una mayor co-inmunoprecipitación en presencia de EGF. Sin embargo, en los experimentos de inmunolocalización no tenemos una resolución espacial suficiente como para determinar si existe interacción directa (resolución espacial de 80 nm), por lo que esta co-localización solo muestra que ambas proteínas están concentradas en regiones muy concretas de la célula. Por el contrario, en el experimento de co-inmunoprecipitación se observa la interacción ORAI1-CTTN (ya sea directa o indirecta) y se puede determinar que en células en reposo esta interacción es mayor, mientras que en células estimuladas con EGF la interacción disminuye, o lo que es lo mismo el complejo se disocia. Puesto que las condiciones de estimulación con EGF en medio libre de Ca^{2+} por un lado y la condición de reposo tras deprivación de suero son situaciones extremas y opuestas, los resultados sugieren que la interacción de ORAI1-CTTN es dinámica, y podría variar continuamente de un estado a otro. En otras palabras, la estabilidad del complejo macromolecular ORAI1-CTTN podría responder a estímulos celulares puntuales, como EGF, y toma su importancia dependiendo de la zona dónde co-localicen (frente de migración o resto de la periferia celular).

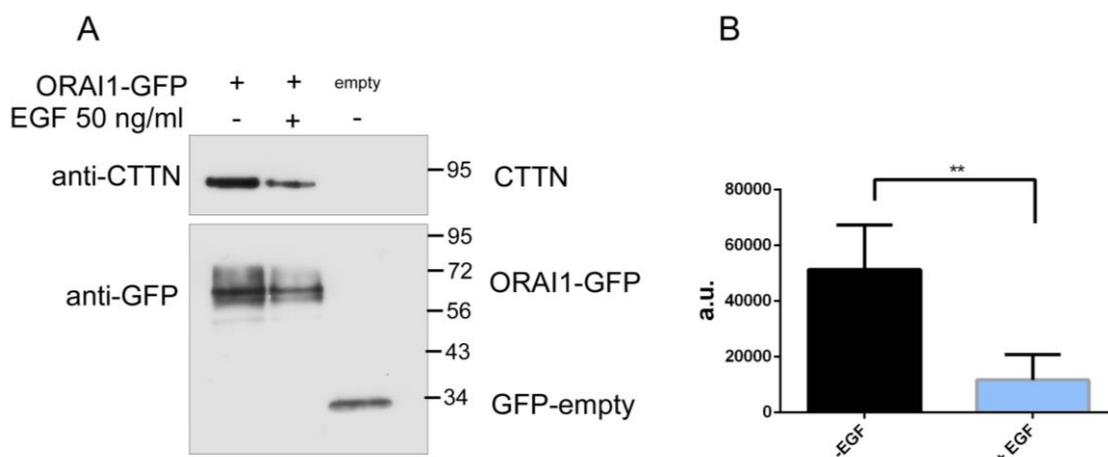


Figura 61. Co-inmunoprecipitación de ORAI1-GFP y CTTN endógeno en células U2OS tratadas con EGF. *Panel A:* Las células U2OS se transfectaron para la expresión transitoria de ORAI1-GFP (calles 1 y 2) o GFP-vacío (calle 3). Los lisados se incubaron con la resina GFPTrap (ChromoTek), la cantidad de CTTN endógena unida a ORAI1-GFP se evaluó mediante inmunoblot utilizando un anticuerpo anti-CTTN (panel superior), y la cantidad de ORAI1-GFP o GFP precipitado se cuantificó utilizando un anticuerpo anti-GFP (panel inferior). Los inmunoblots son representativos de 4 ensayos independientes. *Panel B:* Las bandas inmunoreactivas de CTTN endógena en las condiciones (-EGF,+EGF) se cuantificaron utilizando el software imageJ y las diferencias se analizaron con el test estadístico t-student para muestras independientes (**) p < 0,01.

3.2. Generación de la línea U2OS CTTN-KO empleando el sistema CRISPR/Cas9.

Puesto que en nuestro laboratorio hemos optimizado el protocolo para la edición génica mediante el sistema CRISPR/Cas9, nos propusimos generar una línea U2OS CTTN-KO utilizando dicho método, y así valorar los efectos del déficit de CTTN en la localización y función de ORAI1 en el frente de migración. Las células U2OS se transfectaron con vectores para la expresión de la nucleasa Cas9D10A y los RNAs guías específicos (gRNAs) diseñados para actuar de manera específica sobre las tres variantes transcripcionales conocidas de CTTN humana (NP_001171669.1, NP_005222.2, NP_612632.1).

Tras confirmar que la expresión de CTTN es menor en el lisado de células transfectadas con la nucleasa Cas9D10A y los RNAs guías, las células se individualizaron con citometría de flujo mediante para la selección de un clon CTTN-KO. Los clones individuales se cultivaron hasta obtener monocapas de células a partir de las cuales se extrajo el DNA genómico para su posterior secuenciación. El análisis de uno de los clones mostró una alteración en el locus de *CTTN* que suponía un KO para su expresión: una deleción de 23 + 20 pb, determinados a partir de la secuenciación de 12 fragmentos de PCR subclonados. Como resultado de esta modificación genética se generó un cambio en el marco de lectura y la aparición de un codón de parada prematuro que impide la síntesis de CTTN (figura 62).

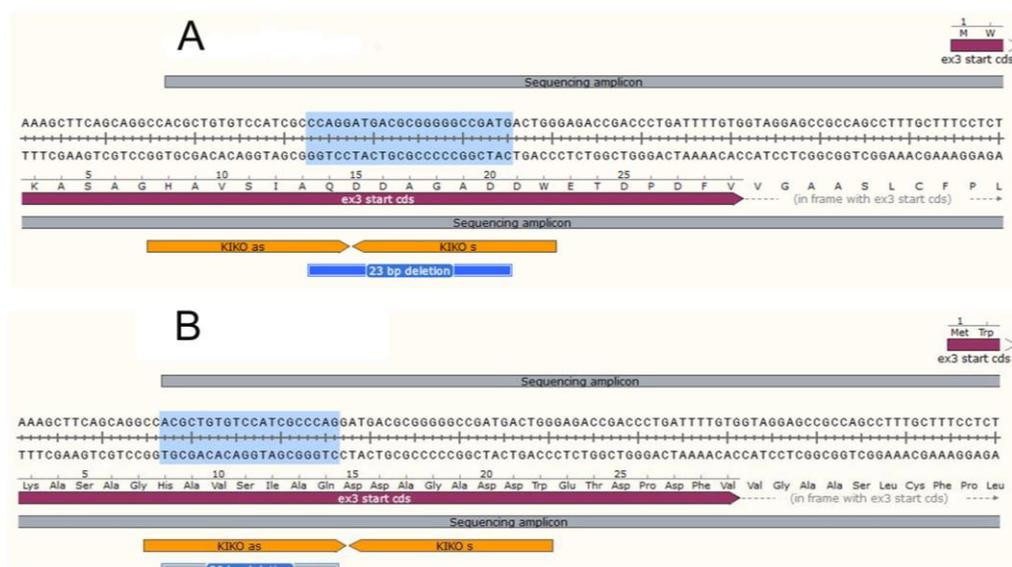


Figura 62. Estrategia para la obtención de CTTN-KO y secuenciación del DNA en el clon seleccionado. En el esquema se muestran los RNAs guías empleados para causar un doble corte en la cadena de DNA en el exón 3 del locus de *CTTN* (marcados en naranja, como KIKOas y KIKOs, siendo KIKO el acrónimo de knockin-knockout). El análisis de secuenciación del DNA del clon seleccionado reveló

Resultados

una modificación en el genoma, una deleción de 23 + 20 pb (marcado en color azul claro en el panel A y B respectivamente). Como resultado se produce un cambio en el marco de lectura y la aparición de un codón de parada prematuro.

Una vez determinada la modificación genética que impide la síntesis de CTTN en el clon seleccionado, analizamos la expresión de CTTN mediante inmunoblot empleando un anticuerpo anti-CTTN. En la figura 63 observamos que no se detecta expresión de CTTN en las muestras KO lo que confirma la generación de una línea de células U2OS CTTN-KO.

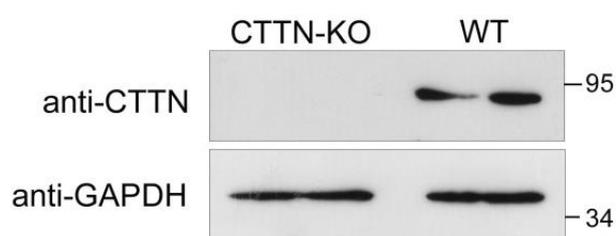


Figura 63. Análisis de la expresión de CTTN mediante inmunoblot en la línea U2OS CTTN-KO. La expresión de CTTN se analizó mediante inmunoblot en lisados totales (20 µg) de muestras CTTN-KO y U2OS WT (control) utilizando un anticuerpo anti-CTTN. El nivel de expresión de GAPDH se evaluó como control de carga de las muestras.

3.3. Caracterización de la línea U2OS CTTN-KO.

La caracterización de la línea celular U2OS CTTN-KO se realizó siguiendo el mismo esquema de trabajo que en la caracterización de PC3 STIM1-KO, U2OS STIM1-KO y U2OS ORA11-KO, que consistió en: (i) el análisis del ciclo celular, (ii) una medida de la entrada de Ca^{2+} extracelular inducida por Tg y además, (iii) puesto que cortactina participa directamente en el control del frente de migración y por tanto en la migración celular, en este caso también se analizó el efecto del déficit de CTTN en la migración de la línea KO generada.

3.3.1. Análisis del ciclo celular.

Para la caracterización de la línea celular knock-out de CTTN en primer lugar se analizó si esta modificación afectaba a la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular. Para ello, las células CTTN-KO se sembraron y se cultivaron hasta alcanzar una confluencia 50-60% y se realizó el análisis por citometría de flujo para determinar el porcentaje de células que se encontraban en las distintas fases del ciclo celular. Como control del experimento también se analizaron en paralelo células U2OS WT. Los resultados de la figura 64 muestran que hay diferencias significativas en la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular entre la línea CTTN-

KO y WT, ya que existe un incremento de células en fase G0/G1 y una disminución de células en fase S, lo que indica un enlentecimiento en la transición G1/S, tal y como habíamos observado para las células PC3 STIM1-KO y en células U2OS ORAI1-KO. Es posible por tanto que este efecto de CTTN sobre el ciclo celular sea indirecto, y sea debido precisamente a la pérdida de función de ORAI1 que provoca la ausencia de CTTN (como se verá más adelante). Finalmente, y según los datos mostrados en la figura 64, no existen diferencias significativas en el nivel de apoptosis en ambas líneas celulares.

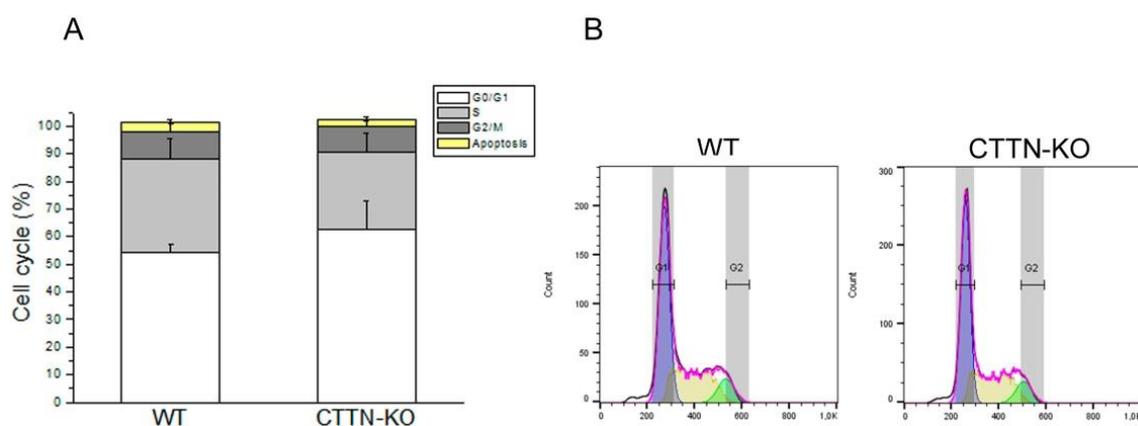


Figura 64: Distribución de ciclo celular en las líneas U2OS WT y CTTN-KO. Las células U2OS WT y CTTN-KO se sembraron y cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de suero durante 48 horas. El análisis de la distribución en las distintas fases del ciclo celular, así como el número de células apoptóticas se realizó por citometría de flujo. *Panel A:* Los datos obtenidos en el análisis se representan en una gráfica de columnas apiladas. *Panel B:* Histogramas representativos de los datos obtenidos del análisis de citometría de flujo con la identificación de fases G1 y G2.

3.3.2. Análisis de la entrada de Ca^{2+} extracelular inducida por Tg.

Puesto que estamos valorando la participación de CTTN en el reclutamiento de ORAI1 en zonas de ruffling de membrana, nos propusimos medir SOCE en la línea CTTN-KO y ver si el déficit de CTTN suponía alguna alteración en el influjo de Ca^{2+} extracelular. La medida de SOCE se realizó siguiendo el protocolo estándar que se detalla en el apartado de Materiales y Métodos. Las células U2OS WT y CTTN-KO precargadas con fura 2-AM se trataron con Tg en medio HBSS libre de Ca^{2+} para inducir el vaciado de depósitos intracelulares de Ca^{2+} . Pasados 6 min de tratamiento con Tg se añadió al medio CaCl_2 2 mM y se cuantificó la entrada de Ca^{2+} extracelular que tiene lugar a través de los canales SOC. En la figura 65 se representa el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de la línea WT y CTTN-KO tras la adición de Ca^{2+} al medio extracelular. Los resultados muestran que SOCE es muy similar en ambas líneas celulares. En el panel de la

derecha se muestran los datos del ratio F340/F380 máximo alcanzado en células WT y CTTN-KO. El análisis estadístico de los datos muestra que no hay diferencias significativas. Estos resultados pueden ser explicados desde varios puntos de vista. Por un lado, desde un aspecto metodológico, la activación de la entrada de Ca^{2+} con tapsigargina es un estímulo global, sin localización subcelular preferente, por lo que es posible que cortactina no sea necesario para activar SOCE en respuesta a Tg, y que por ello pequeños cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ circunscritos a regiones concretas de ruffling de membrana puedan pasar desapercibidos en esta medida. Otra explicación, compatible con la anterior, es que realmente cortactina sea necesario para secuestrar a ORAI1 en reposo, tal y como hemos observado a partir de los datos de co-precipitación, de modo que la activación de SOCE suponga la liberación del complejo ORAI1-CTTN. Por ello, en ausencia de CTTN, ORAI1 seguiría estando disponible para ser activado por STIM1. En cualquier caso, esta medida no aporta información sobre el efecto del déficit de CTTN sobre la entrada de Ca^{2+} en el ruffling de membrana, donde encontramos enriquecimiento de fosfo-STIM1 y ORAI1. Por lo tanto serían necesarios otros tipos de medidas para determinar si el déficit de CTTN produce una alteración de la entrada de Ca^{2+} extracelular mediada por los canales SOC en el frente de migración.

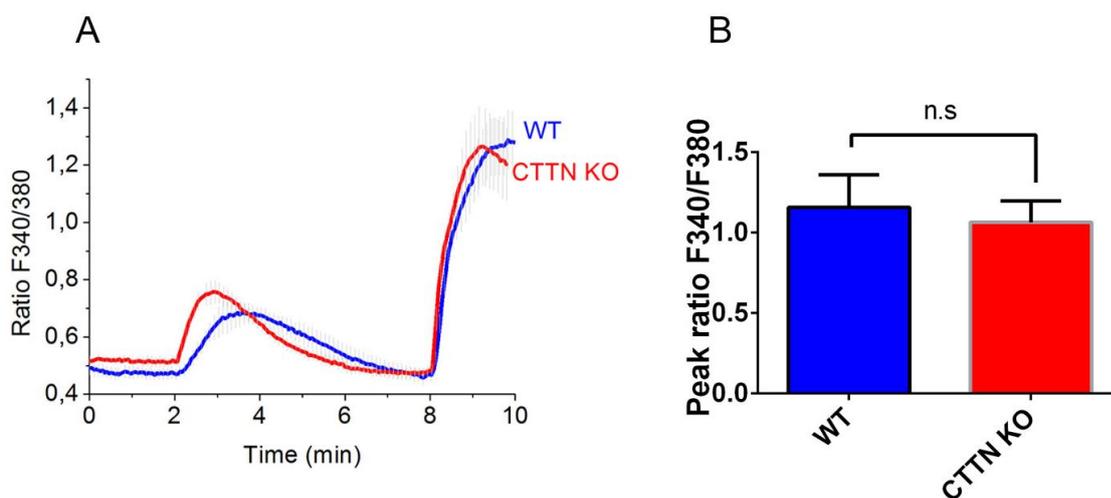


Figura 65. Medida de SOCE en células U2OS WT y CTTN-KO. *Panel A:* los cultivos celulares se privaron de suero durante 12 horas. Las células U2OS WT (color azul) y CTTN-KO (color rojo), precargadas con fura 2-AM, se trataron con Tg 1 μM en medio HBSS libre de Ca^{2+} seguido de la adición de Ca^{2+} 2 mM. El ratio F340/F380 se monitorizó por epifluorescencia como se describe en Materiales y Métodos. Los datos representan la media de 3 ensayos independientes ($n > 20$ células por condición). *Panel B:* A partir de los datos del panel A se representa el ratio F340/F380 máximo alcanzado por ambas líneas. Las muestras se analizaron con el test estadístico t-student para muestras independientes (n.s., no significativo).

3.3.3. Análisis de la migración celular.

Puesto que CTTN es una proteína clave en la remodelación del citoesqueleto cortical de actina, y está descrita en bibliografía su participación en migración celular (Sung et al., 2011) nos propusimos analizar el efecto del déficit de CTTN sobre la migración en la línea CTTN-KO. Para estudiar la migración celular se realizaron ensayos de cierre de herida en la línea CTTN-KO, empleando como control del experimento la línea U2OS wild-type. Las células se sembraron y se dejaron crecer hasta alcanzar una confluencia del 80-90%, momento en el que se hicieron las heridas en la monocapa de células (ver Métodos). A continuación, se capturaron imágenes de la herida y las células continuaron en cultivo durante 14 horas adicionales. Concluido este tiempo, las células se fijaron y se capturaron imágenes de la zona de la herida. El porcentaje de cierre de herida se calculó utilizando el software imageJ. En la figura 66 se muestran imágenes representativas de las heridas a tiempo inicial (0 horas) y a tiempo final (14 horas), observándose que la migración de la línea CTTN-KO es significativamente menor con respecto a la línea WT. Estos resultados apoyan la idea, ya recogida en la bibliografía, de que CTTN es una proteína importante en la migración celular.

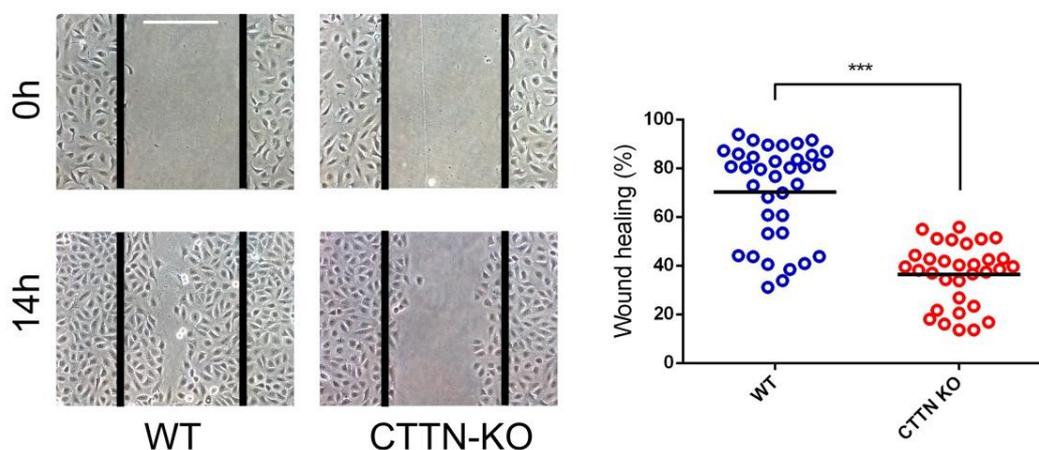


Figura 66. Cierre de herida en placa en células CTTN-KO. Las células U2OS WT y CTTN-KO se sembraron en placas pre-tratadas con colágeno al 0.01% y se cultivaron en DMEM suplementado con 10% de suero durante 24 horas. El panel de la izquierda muestra imágenes representativas de las heridas a tiempo inicial (0 horas) y a tiempo final del experimento (14 horas). Las imágenes son representativas de 3 ensayos independientes. El análisis cuantitativo de las imágenes se realizó con el software ImageJ. Barra de escala = 200 μ m. El panel de la derecha muestra una representación de los datos de porcentaje de cierre de herida (n = 36 muestras WT; n=32 muestras CTTN-KO). Las muestras se analizaron con el test estadístico t-student para muestras independientes. (***) $p < 0.001$.

3.4. Localización de ORAI1-GFP en células U2OS CTTN-KO fijadas.

Como hemos mencionado antes, ORAI1-GFP se localiza en áreas ricas en CTTN, áreas que marcan el frente de células en migración, y los experimentos de co-inmunoprecipitación revelaron que ORAI1 y CTTN forman parte de un mismo complejo proteico, resultados que sugieren la interacción de ambas proteínas en la regulación del citoesqueleto en áreas de ruffling de membrana. Por ello, se empleó la línea CTTN-KO para analizar si la localización de ORAI1-GFP en el frente de migración se veía afectada por la ausencia de CTTN.

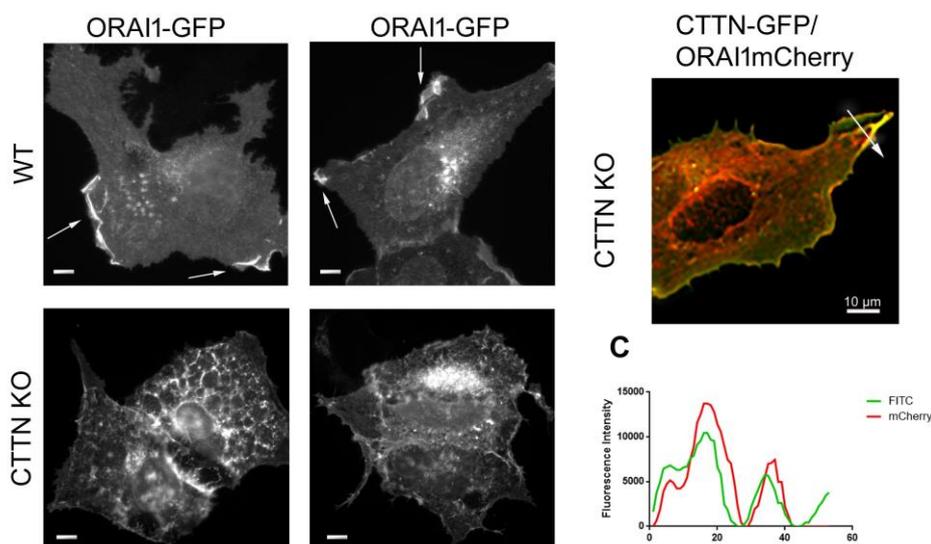


Figura 67. Localización de ORAI1-GFP en células CTTN-KO. Las células U2OS WT y CTTN-KO se transfectaron para la expresión transitoria de ORAI1-GFP y se cultivaron durante 24 horas. Tras ser deprivadas de suero durante 8-10 horas en medio RPMI, las células se estimularon con EGF 50 ng/ml durante 10 min y se fijaron. *Panel A:* La fluorescencia del marcador GFP se registró con un microscopio de epifluorescencia utilizando un objetivo 100x de inmersión en aceite. Estas imágenes son representativas de 3 ensayos independientes. Barra de escala = 10 μ m. *Panel B:* Las células CTTN-KO se transfectaron para la expresión transitoria de CTTN-GFP y ORAI1-mCherry y se trataron del mismo modo que en el panel A. La fluorescencia de los marcadores GFP y mCherry se monitorizó por epifluorescencia. Está imagen es representativa de 3 ensayos independientes. Barra de escala = 10 μ m. *Panel C:* representación de la variación de la intensidad de fluorescencia de los marcadores GFP y mCherry de la zona indicada por una flecha (linescan).

Las células U2OS WT y CTTN-KO se transfectaron para la expresión transitoria de ORAI1-GFP y se dejaron crecer durante 24 horas en cultivo. Tras una deprivación de suero de 8-10 horas, las células se estimularon con EGF 50 ng/ml durante 10 min y posteriormente se fijaron para su análisis en un microscopio de epifluorescencia. Como podemos observar en las imágenes de microscopía, mientras que en las células WT observamos un enriquecimiento de ORAI-GFP en áreas de ruffling de membrana, en

células CTTN-KO observamos a ORAI1-GFP localizado en la región ventral de la célula (figura 67). Estos resultados concuerdan con la hipótesis de que CTTN es necesaria para la localización de ORAI1 en el frente de avance de células en migración.

Para confirmar que la localización no polarizada de ORAI1-GFP observada en la figura 67 (panel A) era una consecuencia específica del déficit de CTTN, nos propusimos comprobar si tras sobre-expresar CTTN-GFP en células CTTN-KO las células recuperaban el fenotipo WT, es decir si ORAI1-GFP de nuevo se encontraba localizado en la zona del frente de migración. Para ello, las células CTTN-KO se sembraron y se transfectaron para la expresión transitoria de CTTN-GFP y ORAI1-mCherry. Del mismo modo que en el ensayo anterior las células se estimularon con EGF 50 ng/ml y se fijaron para su posterior observación en un microscopio de epifluorescencia. Como podemos observar en la imagen de microscopía de la figura 67 (panel B), ORAI1-mCherry se localiza en regiones que solapan con CTTN-GFP, en zonas de ruffling de membrana plasmática. En el panel C de la figura, se representan los datos de intensidad de fluorescencia de ambos marcadores (GFP y mCherry) de la región marcada por una flecha (linescan), que indican que el patrón de distribución de la intensidad de fluorescencia es el mismo para ambos marcadores. Estos datos confirman que la localización no polarizada de ORAI1-GFP en células CTTN-KO es debida a la pérdida de CTTN, ya que puede ser revertida por la sobre-expresión ectópica de CTTN-GFP.

3.5. Monitorización de ORAI1-mCherry en células CTTN-KO.

Los resultados mostrados hasta ahora indican que la entrada de Ca^{2+} extracelular tras el vaciado de depósitos no se ve alterada en células CTTN-KO. Por otro lado, la localización de ORAI1-GFP en estas células, si aparece alterada, presentando principalmente una localización más difusa por regiones corticales (ventrales y dorsales), a diferencia de las células U2OS WT que presentan una localización polarizada de ORAI1-GFP en zonas de ruffling de membrana. Para estudiar con más detalle estos resultados analizamos la dinámica y localización de ORAI1-mCherry en células vivas. Para ello, las células CTTN-KO se cultivaron en DMEM suplementado con 10% de suero y se transfectaron para la expresión transitoria de ORAI1-mCherry. La intensidad de fluorescencia del marcador mCherry se monitorizó en un microscopio de epifluorescencia durante 10 min en medio Leibovitz's suplementado con 10% de suero. Como se observa en el video suplementario 7 y la figura 68, la dinámica y el número de

ruffles se ven claramente alterados en la línea celular CTTN-KO, de modo que la intensidad del ruffling es mucho menor, y ORAI1-GFP no se encuentra especialmente enriquecido en regiones corticales. Estos resultados concuerdan plenamente con los resultados obtenidos en células fijadas, y confirman que CTTN tiene un papel importante en la dinámica de los ruffles de membrana y en el secuestro de ORAI1 en estas regiones.

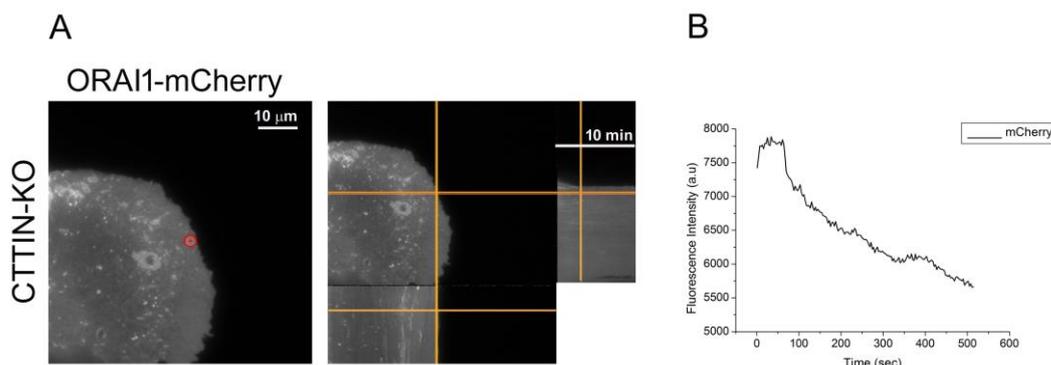


Figura 68. Dinámica de ORAI1-mCherry en células CTTN-KO. *Panel A:* Las células U2OS CTTN-KO se transfectaron para la expresión transitoria de ORAI1-mCherry y tras 24 horas se monitorizó la actividad de ORAI1-mCherry en un microscopio de epifluorescencia, con una adquisición de imágenes cada 3 segundos, durante 10 minutos, a 37°C. Durante la adquisición, las células se incubaron en un medio libre de bicarbonato, Leibovitz's L-15, suplementado con 10% de suero. Las proyecciones ortogonales de las áreas marcadas muestran la intensidad de fluorescencia durante el desarrollo del ensayo (10 min). En el *panel B* se muestra una gráfica de la intensidad de fluorescencia de ORAI1-mCherry en el área seleccionada (indicada con un círculo rojo). La figura es representativa de 10 videos procedentes de 3 ensayos independientes. Barra de escala = 10 μ m. El video completo se muestra en el archivo suplementario 7.

Para demostrar que la alteración en la dinámica del ruffling de membrana es una consecuencia específica del déficit de expresión de CTTN, sobre-expresamos de nuevo de manera ectópica CTTN-GFP en células CTTN-KO. Para analizar la intensidad de fluorescencia en la dinámica de los ruffles de membrana sobre-expresamos en paralelo ORAI1-mCherry. La expresión de ambos marcadores, ORAI1-mCherry y CTTN-GFP, se monitorizó en células vivas con objeto de observar si las dos proteínas mostraban un movimiento paralelo y dependiente, al igual que el observado en células U2OS WT (figura 59). En el video suplementario 8 se muestra la dinámica de la región de ruffling en células U2OS CTTN-KO transfectadas con ORAI1-mCherry y CTTN-GFP. La figura 69 (panel A) muestra una imagen representativa del video en la que se observan los diferentes canales de fluorescencia analizados, mCherry, GFP y la combinación de ambos. Además, también se observa el cálculo del ratio mCherry/GFP (llevado a cabo con el software Nis Elements AR) en una escala de pseudocolor (en escala 0.1-1.4). El

análisis del ratio de la fluorescencia mCherry/GFP (figura 69) indica que el perfil de las variaciones de fluorescencia es el mismo para ambas proteínas, es decir se sigue el mismo patrón que en células U2OS WT (figura 59). Así, estos resultados sugieren que es necesaria la expresión de ambas proteínas (ORAI1 y CTTN) para que las células muestren una alta intensidad en la dinámica de los ruffles de membrana, y que CTTN, de forma directa o indirecta, participa en la localización polarizada de ORAI1.

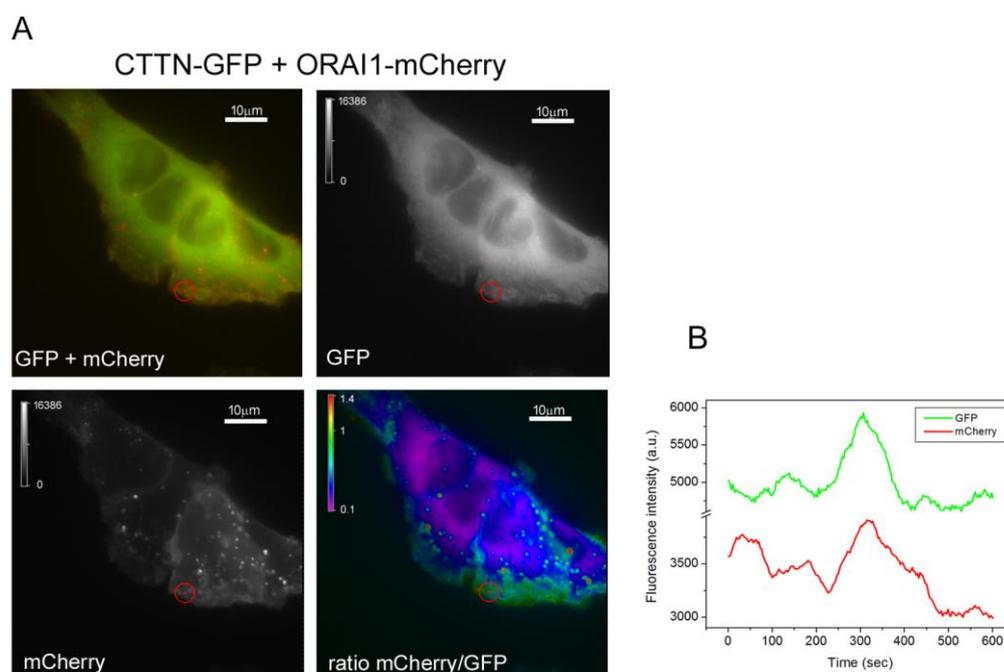
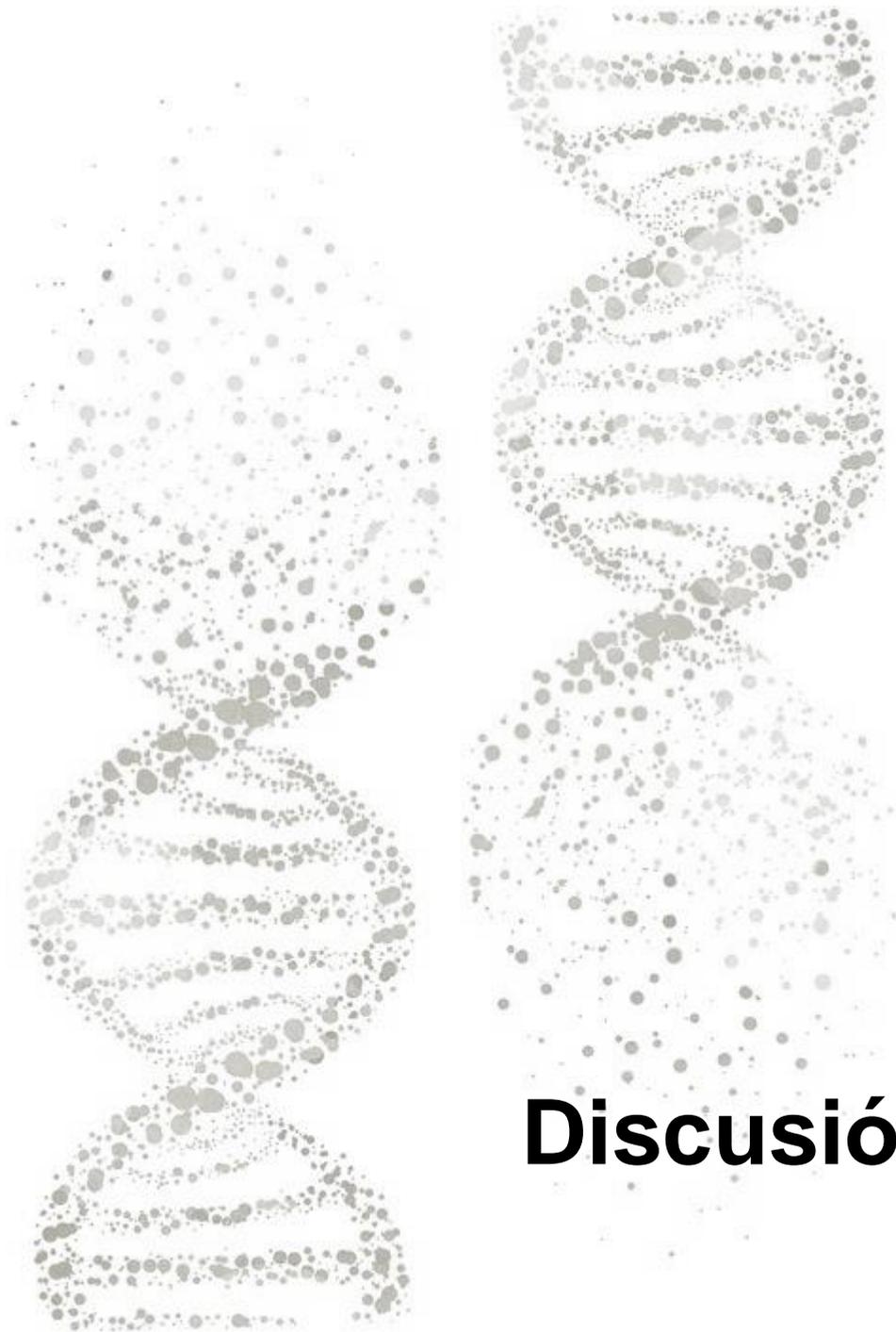


Figura 69. Dinámica de ruffling de membrana en células CTTN-KO que sobre-expresan ORAI1-mCherry y CTTN-GFP. *Panel A:* Células U2OS CTTN-KO se transfectaron para la expresión transitoria de ORAI1-mCherry/CTTN-GFP y se monitorizó la fluorescencia de ambos marcadores en medio Leibovitz's L-15 suplementado con 10% de suero. La adquisición de la fluorescencia se registró cada 3 segundos durante 10 minutos y las imágenes se analizaron separando ambos canales (mCherry y GFP). El ratio mCherry/GFP se calculó desde los canales individuales y se muestra en una escala de pseudocolor (escala de ratio 0.1-1.4). El *panel B* muestra una representación de la variación de la intensidad de fluorescencia de los marcadores en un área seleccionada (indicada en con un círculo rojo). El video completo se muestra en el archivo suplementario 8.

Los resultados de este último apartado apoyan la idea de que CTTN interacciona con ORAI1 formando un complejo macromolecular que participa en la formación del ruffling de membrana. A partir de la línea U2OS CTTN-KO generada por el sistema de edición génica CRISPR/Cas9 hemos obtenido resultados específicos sobre el efecto del déficit de CTTN sobre la localización de ORAI1 tanto en células fijadas como en célula viva. En este sentido, los resultados mostrados sugieren que CTTN es necesaria para la correcta polarización de ORAI1 en la zona de avance de células en migración. Además,

los resultados de co-inmunoprecipitación en respuesta a EGF sugieren una interacción dinámica del complejo macromolecular ORAI1-CTTN, la cual podría estar acompañada de cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ en áreas enriquecidas en fosfo-STIM1 y ORAI1. Sin embargo, estos resultados son iniciales y son necesarios estudios futuros que profundicen en la interacción entre ORAI1-CTTN y su papel en la formación de ruffles de membrana. En este sentido ya se ha iniciado un nuevo proyecto en nuestro grupo de investigación en el que se evalúan las modificaciones postraduccionales de ORAI1 y CTTN como eventos clave para la interacción de estas dos proteínas. Este nuevo proyecto de investigación pretende determinar los residuos de ORAI1 y CTTN implicados en la interacción de ambas, y así poder desarrollar líneas celulares que expresen mutantes de ORAI1 y CTTN que inhiban o que potencien su interacción. Con estas herramientas esperamos determinar la contribución real de CTTN en la actividad de los canales ORAI1 en los ruffles de membrana y su relevancia en migración celular.



Discusión

En esta Tesis Doctoral se pretende estudiar algunos aspectos concretos de la interdependencia entre SOCE y el citoesqueleto, con especial énfasis en cómo SOCE altera o modifica el citoesqueleto cortical y cómo miembros del citoesqueleto son necesarios para la correcta distribución de los elementos necesarios que regulan SOCE, STIM1 y ORAI1. Uno de los mediadores críticos en la remodelación del citoesqueleto son las quinasas ERK1/2, y estas mismas quinasas regulan SOCE por fosforilación de STIM1, un dato que se encuentra bien documentado en trabajos previos de nuestro grupo de investigación. Sin embargo, existe cierta controversia al respecto a la luz de una serie de publicaciones que sugieren que SOCE es un regulador de ERK1/2, por lo que de forma previa al estudio del citoesqueleto hemos asumido el estudio de la interdependencia entre SOCE y ERK1/2 con el empleo de líneas celulares editadas genómicamente para silenciar la expresión de STIM1 y generar células defectivas en SOCE.

La ruta de señalización de Raf-MEK-ERK participa en la regulación del ciclo celular, proliferación y apoptosis (McCubrey et al., 2007). Una gran variedad de estímulos pueden causar la activación de las proteínas Raf, que principalmente es dependiente de la actividad de Ras, PKC o miembros de la familia de la quinasa Src (Buhl et al., 1995; McCubrey et al., 2007; Roberts and Der, 2007; Stokoe and McCormick, 1997; Wang et al., 2001). Por este motivo, esta ruta de señalización es objeto de estudio para muchos grupos de investigación en la actualidad, los cuales abordan el diseño de estrategias para prevenir una proliferación celular maligna. La ruta de señalización mediada por Raf-MEK-ERK se encuentra también conectada a la ruta de señalización PI3K-PTEN-Akt, debido a que ésta última regula negativamente la actividad de Raf. Así, la ausencia de PTEN en la línea celular PC3 tiene como consecuencia un nivel basal de actividad ERK1/2 muy bajo, aunque la ruta se activa completamente en respuesta a EGF.

Existen multitud de dianas corriente abajo de ERK1/2, incluyendo factores de transcripción, quinasas, como RSK (ribosomal S6 kinase), o proteínas de citoesqueleto (Steelman et al., 2004; Yoon and Seger, 2006). Además, se ha descrito que SOCE se inhibe en presencia de inhibidores de ERK1/2, como U0126 o PD184352, y esta inhibición es independiente de PI3K pero sensible a inhibidores de Ras (Rosado and Sage, 2001). Después del hallazgo de la proteína STIM1 como sensor del Ca^{2+} en el interior de RE y principal activador de SOCE, se demostró que STIM1 es un diana directa de ERK1/2 *in vitro* e *in vivo*, y que esta fosforilación regula la actividad de STIM1 y su unión a microtúbulos (Casas-Rua et al., 2013; Pozo-Guisado et al., 2010). En el

trabajo descrito por Pozo-Guisado y cols, también se describió que los inhibidores de la actividad de ERK1/2, PD0325901 y PD184352, causaban la completa inhibición de SOCE (Pozo-Guisado et al., 2010) sugiriendo por tanto que SOCE es una diana de ERK1/2. Sin embargo, este dato no excluye la posibilidad de que en distintos tipos celulares podamos encontrar diferencias en los niveles de actividad de las rutas de señalización de Raf-MEK-ERK, PI3K-PTEN-Akt, y rutas de señalización dependientes de Ca^{2+} . Por esto motivo, en la bibliografía se pueden encontrar diferentes modelos descritos en relación a la interdependencia de ERKs y SOCE. Por ejemplo, EGF causa una activación de ERK1/2 independiente del influjo de Ca^{2+} en células de adenocarcinoma endometrial (Ishikawa) (Casas-Rua et al., 2015). Una activación similar también ha sido descrita en células HEK293 en respuesta a una estimulación con IGF-1 (Tomas-Martin et al., 2015). En concordancia con estos resultados, se ha descrito que el knock-down de STIM1 no causa una modificación en los niveles de fosforilación de MEK1/2-ERK1/2 en células de cáncer gástrico (Xu et al., 2016), sugiriendo que STIM1 no es un regulador de ERKs en células tumorales. Del mismo modo, se ha descrito que la migración y proliferación de células epiteliales de retina (ARPE-19) era sensible al knock-down de STIM1 u ORAI1, pero que esta reducción en los niveles de expresión de STIM1 u ORAI1 no tenía ningún efecto negativo sobre la activación de ERK1/2 en respuesta a EGF (Yang et al., 2013).

Por el contrario, también se ha descrito que la entrada de Ca^{2+} extracelular regula la activación de ERK1/2 en células de melanoma. Utilizando un diseño experimental basado en el silenciamiento de STIM1 y ORAI1 mediante siRNA, la ruta de señalización de SOCE-CAMKII-Raf-ERK se propuso como reguladora de la proliferación celular (Umemura et al., 2014). Del mismo modo, una activación de ERK1/2 dependiente de SOCE también ha sido descrita en células acinares de glándula parótida, un trabajo en el que se describió la inhibición de SOCE por el bloqueante 2-APB (Soltoff and Lannon, 2013). Para valorar la posibilidad de que SOCE tenga una contribución real sobre la activación de las quinasas ERK1/2, nos planteamos el desarrollo de una línea PC3 modificada para silenciar de forma completa la expresión de STIM1. La manipulación genética de los cultivos celulares utilizando herramientas de edición genómica, como el sistema CRISPR/Cas9, ofrecen la posibilidad de obtener un knock-out de la expresión de un gen conservando la estabilidad genómica, debido a la creación de pequeñas inserciones o deleciones (indels) en la secuencia diana del genoma. Los resultados mostrados en este trabajo demuestran que la línea celular PC3 generada mediante el sistema CRISPR/Cas9, deficiente en la expresión de STIM1, y consecuentemente sin entrada de Ca^{2+} extracelular en respuesta al tratamiento con Tg o EGF, es capaz de

activar ERK1/2 en respuesta a EGF de manera similar a la observada en células con expresión de STIM1. Además de la activación de ERK1/2 en ausencia de Ca^{2+} extracelular, estos resultados demuestran que en células PC3 la activación de ERK1/2 es independiente del influjo de Ca^{2+} . Puesto que nuestro marcador de actividad de ERK1/2 es el nivel de ERK1/2 fosforilada, es importante resaltar que no hay una diferencia en el nivel de expresión total de ERK1/2 en células STIM1-KO con respecto a células parentales, por lo que la determinación del nivel de fosfo-ERK1/2 es un buen método para determinar la activación de esta ruta de señalización, y para llegar finalmente a las conclusiones aquí expuestas. También es importante señalar que cabría la posibilidad de una participación de STIM2 en la entrada de Ca^{2+} estimulada por Tg o EGF, pero la medida directa de este influjo en células PC3 STIM1-KO, demuestran que STIM1, y no STIM2, es intermediario único en esta ruta de entrada de Ca^{2+} .

Por otro lado, es conocido que la quinasa Src es un regulador positivo del eje Raf-MEK-ERK, ya que Src fosforila a Raf en el residuo Tyr340/341 en células endoteliales estimuladas con el factor de crecimiento endotelial (VEGF) (Ueda et al., 1996). Nuestros resultados muestran que Raf-MEK-ERK se activa de manera dependiente de la quinasa Src, y por tanto el tratamiento con inhibidores específicos de la quinasa es suficiente para prevenir la activación de ERK1/2. En nuestro trabajo utilizamos el inhibidor Src11 que inhibe completamente la actividad de ERK1/2 en respuesta a EGF, sin que el inhibidor tenga efecto directo sobre ERK1/2, Raf o MEK1/2 (Bain et al., 2007). El hecho de que Src se active en ausencia de Ca^{2+} extracelular, sumado al hecho de que STIM1 es diana de ERK1/2, sugiere que la topología de la ruta de señalización es: Src-Raf-MEK1/2-ERK1/2-STIM1-SOCE. Nuestros datos no excluyen la posibilidad de que participen otras quinasas en la activación de esta ruta, y de hecho hemos evaluado la participación de CAMKII y PKC, como posibles quinasas reguladoras de Raf-MEK1/2-ERK1/2 en respuesta a EGF en ausencia de Ca^{2+} extracelular. En relación a estos experimentos, los inhibidores específicos de CAMKII y PKC, KN-62 y Go 6976 respectivamente (Bain et al., 2007; Tokumitsu et al., 1990), no tuvieron efecto inhibitor sobre la activación de ERK1/2, resultados que sugieren que ambas quinasas no estarían involucradas en la activación de ERK1/2, al menos en células PC3.

Los resultados descritos en este trabajo son relevantes puesto que sitúan a STIM1 como diana de ERK1/2, y descartan definitivamente que ERK1/2 sea dependiente de STIM1 y SOCE. Este conocimiento es útil para el diseño de inhibidores/reguladores de las rutas de señalización para controlar o prevenir la progresión de la proliferación celular maligna (por ejemplo, la transición epitelio-mesénquima y la migración celular)

dependiente de la activación de rutas específicas en distintos tipos de células tumorales. En conclusión, en nuestro trabajo hemos utilizado la línea PC3 STIM1-KO generada mediante edición genómica del locus *STIM1*, y por lo tanto deficiente en SOCE para demostrar que la activación de ERK1/2 es independiente del influjo de Ca^{2+} a través de esta ruta de entrada de Ca^{2+} . Además, proponemos que la actividad de ERK1/2 es dependiente de la actividad de la quinasa Src, lo que supone que la quinasa Src es una diana farmacológica adecuada para controlar la actividad de ERK1/2. Sin embargo, son necesarios estudios que profundicen en reguladores (corriente arriba) y sustratos de ERK para controlar de una manera más directa los eventos celulares en los que esta quinasa está implicada. De hecho, SOCE, a pesar de ser un evento activado corriente abajo por quinasas desreguladas en tipos celulares tumorales, como Ras, podría también constituir una diana farmacológica, si pudiéramos demostrar que los efectos de posibles inhibidores de STIM1 y/o SOCE afectan a procesos asociados a la progresión tumoral, como la transformación epitelio-mesénquima o la migración e invasión tumoral. De hecho éste es el caso para la transformación epitelio-mesénquima y migración de células de adenocarcinoma endometrial (Casas-Rua et al., 2015), por lo que un diseño de posibles inhibidores de la fosforilación de STIM1 sería en principio válido para disminuir la transformación de células tumorales y la migración celular, reduciendo de esta forma metástasis tumoral.

Por todo ello, en el desarrollo de esta Tesis Doctoral hemos dirigido nuestro interés hacia el estudio del papel de la señalización mediada por Ca^{2+} en la migración celular, y especialmente el papel de SOCE en migración celular, un aspecto de intenso debate desde la descripción de dos de sus principales reguladores de la entrada de Ca^{2+} extracelular en células eucarióticas: STIM1 y ORAI1. Un avance relevante en la investigación en este campo fue el estudio de Yang y cols. en relación al reciclaje de las adhesiones focales estimulado por SOCE (Yang et al., 2009). Las adhesiones focales están compuestas por una compleja red de proteínas asociadas a la membrana plasmática, en la que integrinas y proteínas citosólicas forman una placa que une la matriz extracelular al citoesqueleto de actina. Es por ello que el adecuado ensamblaje y disociación de las adhesiones focales son necesarios para la migración celular. En el mencionado trabajo, Yang y cols. describieron que el knock-down de STIM1, así como de ORAI1, mediante RNA de interferencia causaba el enlentecimiento de la migración celular *in vitro* y la inhibición de la metástasis en células MDA-MB-231 de ratones atímicos (Yang et al., 2009). Estos resultados, junto con la inhibición del reciclaje de las adhesiones focales y disminución en la progresión del tumor en ratones tratados con SKF96365, un inhibidor de los canales SOC, sugirieron que SOCE participa de manera

significativa en la entrada de Ca^{2+} requerida para la migración celular. De hecho, datos posteriores de nuestro laboratorio mostraron que la desfosforilación constitutiva de STIM1 en residuos diana de ERK1/2 reduce el reciclaje de adhesiones focales en mioblastos de ratón, así como la migración de los mismos *in vitro*, sugiriendo de nuevo que la actividad de STIM1 y por tanto la activación de SOCE podría inhibirse mediante el bloqueo de la fosforilación de STIM1 en los residuos diana de ERK1/2 (Tomás-Martín, 2016), lo que supondría acotar más aún una posible diana farmacológica y centrarla en la fosforilación de STIM1 cuando el objetivo sea disminuir migración celular.

Sin embargo, y aunque existen numerosas propuestas, no se encuentra del todo claro el mecanismo intracelular dependiente de Ca^{2+} que regula el ensamblaje y disociación de las adhesiones focales. Entre las hipótesis de regulación que se han planteado se ha descrito la participación de la proteasa dependiente de Ca^{2+} calpaína (Huttenlocher et al., 1997), que puede aumentar la velocidad o tasas de disociación de componentes en las adhesiones focales por la ruptura de la proteína talina, permitiendo esta proteólisis la disociación de otros componentes de las adhesiones focales como paxilina, vinculina, y zyxina (Franco et al., 2004). Otro estudio que relaciona SOCE con el reciclaje de adhesiones focales es el descrito por Chen y cols., en el que se muestra que EGF estimula la fosforilación de la tirosina quinasa PTK2B, también conocida como PYK2, en el residuo Tyr402, y a la quinasa de adhesiones focales FAK en el residuo Tyr397. Estos dos eventos son necesarios para el reciclaje de las adhesiones focales, y ambos se inhiben por el knock-down de la expresión de STIM1 (Chen et al., 2011). Sin embargo, la disociación de las adhesiones focales no es un paso inicial en el proceso de migración celular. Por el contrario, se considera una acción tardía de la señalización mediada por Ca^{2+} , y la disociación de las adhesiones focales de manera dependiente de Ca^{2+} debería ser un evento importante en la región de retracción de la célula, es decir, la región opuesta al frente de las células en migración, dónde hay una mayor tasa de contracción del citoesqueleto. Por lo tanto es posible que la difusión de Ca^{2+} desde regiones del frente de migración, o el gradiente de Ca^{2+} intracelular desde el frente de migración a la región de cola (o retracción) pudiera estar regulando eventos diferentes a lo largo del eje antero-posterior celular de manera dependiente a la concentración de Ca^{2+} . En este sentido, los trabajos descritos anteriormente no aportaban información relacionada con la localización de STIM1-ORAI1, información que es crítica para definir una regulación espacio-temporal de la señalización mediada por Ca^{2+} .

Por todo ello nos planteamos llevar a cabo el estudio de la localización de STIM1 y ORAI1 en células en migración con el objetivo de poder explicar cómo la señalización

mediada por el influjo de Ca^{2+} a través de ORAI1 modula el citoesqueleto. Debido a los datos previos de nuestro grupo que nos indicaban que fosfo-STIM1 (Ser575, Ser608, Ser621) se disocia de EB1 y se une a ORAI1, decidimos estudiar la localización de fosfo-STIM1, ya que a niveles endógenos y con una estimulación suave, como sería EGF y la presencia de FBS en el medio, no esperaríamos grandes cambios de localización de STIM1 total. No resultó sorprendente encontrar que la mayor parte de fosfo-STIM1 se localiza en el frente de migración de células U2OS y células HeLa. Esta polarización fue monitorizada con la inmunolocalización de cortactina (CTTN) endógena, en base a los numerosos datos registrados en la bibliografía que destacan la concentración de CTTN en la región de avance de las células en migración, y más concretamente en las regiones de reorganización del citoesqueleto cortical, conocidos como ruffles (ondas) de membrana, donde actúa junto con Arp2/3, como regulador de las ramificaciones de actina-F que permiten la generación de filopodios y lamelipodios necesarios para el avance celular (Ammer and Weed, 2008; Weed and Parsons, 2001; Wu and Parsons, 1993). Puesto que fosfo-STIM1 es la forma activa de STIM1 en la estimulación de la entrada de Ca^{2+} a través de ORAI1, los resultados descritos apoyan un modelo en el que una alta actividad de STIM1 y de entrada de Ca^{2+} dependiente de STIM1 están presentes en el frente de las células en migración (Pozo-Guisado et al., 2010; Pozo-Guisado et al., 2013). De hecho, la descripción de fosfo-STIM1 como marcador en la zona de avance de células en migración que aquí hemos mostrado define un nuevo concepto que puede ser útil en el estudio de la motilidad celular y la migración. Nuestros resultados, que muestran una alta actividad de STIM1 en el frente de migración, concuerdan con los resultados de Tsai y cols. que muestran un enriquecimiento de STIM1 en el frente de migración en células en cultivo, si bien estos autores empleaban la sobre-expresión ectópica de YFP-STIM1, junto con un marcador del RE unido a CFP para visualizar esta localización (Tsai et al., 2014).

La estimulación de las células con activadores de la ruta de señalización de las quinasas MAPK, como EGF (Casas-Rua et al., 2015) o IGF-1 (Tomas-Martin et al., 2015) resulta en la fosforilación de STIM1 en los sitios diana de ERK1/2, y nuestro grupo de investigación ha descrito que esta fosforilación facilita la disociación de STIM1 de los microtúbulos. Puesto que existe un enriquecimiento de receptores tirosina quinasa (RTK) en el frente de migración, la activación de RTKs por ligandos daría lugar a una mayor actividad ERK1/2 en esta región, pero también a una mayor movilización de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares, al activarse la ruta de los fosfoinosítidos (Casas-Rua et al., 2015; Tomas-Martin et al., 2015). Esta depleción parcial y local de los niveles de Ca^{2+} del RE, junto con la fosforilación de STIM1 dependiente de ERK1/2 podría

aumentar de manera local y transitoria el número de pulsos de Ca^{2+} debido a la activación del influjo de Ca^{2+} . Este modelo requiere de la participación de un canal de Ca^{2+} activado por STIM1, y los resultados mostrados en este trabajo de investigación son los primeros en describir un enriquecimiento de ORAI1-GFP en el frente de células en migración, lo que apoya la hipótesis que aquí estamos planteando sobre la regulación de la migración celular mediada por el influjo de Ca^{2+} a través de canales SOC. De hecho, ORAI1 co-localiza y co-inmunoprecipita con cortactina (en este último caso tanto ORAI1 endógeno como ORAI1 sobre-expresado).

Esta hipótesis se ve apoyada por los resultados descritos por Tsai y cols., que describen un aumento de la actividad de la PMCA en el frente de migración (Tsai et al., 2014), ya que en estas áreas se espera un número más elevado de picos o incrementos transitorios en la concentración de Ca^{2+} (debido a descargas desde el RE y al influjo a través de SOCs), y por lo tanto se requiere una alta capacidad de extrusión de Ca^{2+} para contrarrestar estos incrementos transitorios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. La localización polarizada de la señalización de SOCE proporciona a la célula un mecanismo clave para el mantenimiento de la dinámica espacio-temporal del sistema de señalización de Ca^{2+} . Sin embargo, y aunque nuestra hipótesis aclara bien por qué existe una mayor concentración de fosfo-STIM1 en el frente de migración (mayor actividad RTKs, supone mayor actividad ERK1/2, y mayores niveles de fosfo-STIM1), queda por esclarecer el mecanismo por el cual ORAI1 permanece restringido a estas áreas enriquecidas en CTTN.

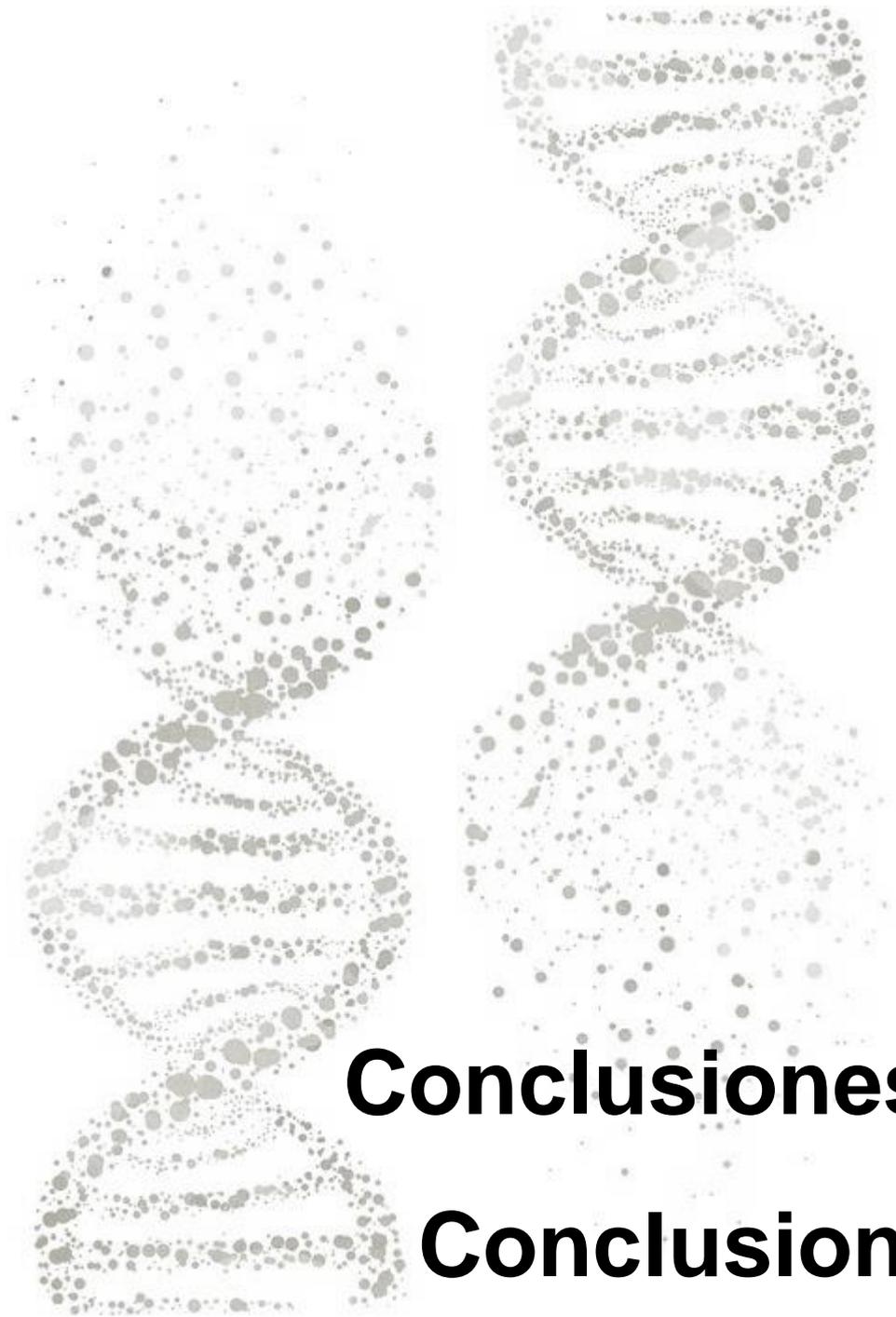
Por otro lado, nuestros resultados ofrecen una buena explicación a observaciones previamente publicadas ya que era conocido que el influjo de Ca^{2+} extracelular es necesario para una retroalimentación positiva de Ca^{2+} en el frente de macrófagos polarizados (Evans and Falke, 2007), aunque se desconocía el mecanismo de entrada de Ca^{2+} . En esta Tesis Doctoral se demuestra que STIM1-ORAI1 regulan el influjo de Ca^{2+} que potencia el ruffling de membrana. Además de los resultados que muestran la localización física de fosfo-STIM1 y ORAI1, y que sugieren una actividad SOCE en un área muy restringida de la célula, el knock-out de STIM1 y ORAI1 revela que ambas proteínas son totalmente necesarias para el ruffling de membrana, siendo estos resultados apoyados por el hecho de que este efecto de pérdida de ruffling en células STIM1-KO y ORAI1-KO pueda ser revertido por la expresión ectópica de STIM1 y ORAI1, respectivamente. En nuestros experimentos hemos monitorizado el ruffling de membrana mediante una medida de la intensidad de fluorescencia de GFP-CTTN, determinando cómo varía la intensidad de fluorescencia, la dirección de este cambio y la

velocidad, mediante un análisis que hemos denominado STICS (Hebert et al., 2005), y que ha sido empleado recientemente por otros grupos para evaluar la dinámica del citoesqueleto para células en cultivo (Hartzell et al., 2016). Hay que señalar además que las líneas celulares KO generadas utilizando la herramienta de edición génica CRISPR/Cas9 presentan un impacto mínimo en la estabilidad genómica, ya que muestran indels (deleciones o inserciones) de 31 pb o de menor tamaño. Aunque hasta la fecha ha sido muy común el empleo de RNA de interferencia para atribuir efectos a la falta de expresión de las proteínas STIM1 y ORAI1 las líneas KO aquí generadas suponen uno de los primeros trabajos que describen la estrategia de obtención de KOs para los loci de *STIM1* y *ORAI1*, empleando el sistema CRISPR y la nucleasa Cas9D10A.

Finalmente, el hecho de que el ratio de intensidad de fluorescencia de ORAI1-GFP y mCherry-CTTN, con una fuerte co-localización entre ambas proteínas, se mantenga estable durante el ruffling indica al menos que ambas proteínas no se distancian entre sí más de 80 nm, la resolución espacial de la microscopía que se ha empleado en este trabajo, lo que indica que es probable que formen parte de un mismo complejo durante la formación de protrusiones, y que no hay una pérdida significativa de esta co-localización en las subsecuentes retracciones de la membrana plasmática. Esta hipótesis se ha comprobado y hemos determinado que existe co-inmunoprecipitación específica entre ORAI1 y CTTN a niveles endógenos de ambas proteínas, así como una fuerte co-inmunoprecipitación entre ORAI1-GFP y CTTN endógena. Estos resultados apoyan por tanto que ORAI1 y CTTN formen parte de un mismo complejo molecular en el frente de migración, y que además este complejo es dinámico, ya que la interacción entre ORAI1 y CTTN, ya sea directa o indirecta, responde precisamente a una estimulación que conduce al vaciado de depósitos (EGF en medio libre de Ca^{2+}), de modo que células en reposo muestran mayor interacción ORAI1-CTTN y el vaciado de depósitos permite la disociación entre ambas proteínas. Esta disociación no supone sin embargo una clara deslocalización para ORAI1, que sigue concentrado en regiones ricas en CTTN durante el ruffling. CTTN es diana de diferentes Ser/Thr quinasas (como PAK2 o ERK1/2), así como tirosina quinasas (como Src) que regulan la actividad de CTTN por fosforilación. De hecho, es conocido que la activación de CTTN dependiente de Src tiene un papel clave en la migración celular, la reorganización del citoesqueleto y la localización de fosfo-CTTN en áreas de adhesiones focales en células de cáncer de mama en respuesta al tratamiento con IGF-1 o EGF (Mezi et al., 2012). En este sentido, cabe la posibilidad de que la fosforilación de CTTN en respuesta a EGF pudiera desencadenar la disociación de CTTN y ORAI1, como paso previo a la unión de ORAI1

a STIM1 y la estimulación del influjo de Ca^{2+} extracelular, una hipótesis que necesita ser estudiada en el futuro.

En relación a esta hipótesis, los resultados mostrados en la última parte de este trabajo de Tesis Doctoral sugieren que CTTN podría tener un papel importante en la localización de ORAI1 de manera polarizada en el frente de células en migración. La generación de la línea celular U2OS CTTN-KO mediante el sistema CRISPR/Cas9 supuso la confirmación de que en ausencia de CTTN la localización de ORAI1 se ve alterada. Mientras que en células wild-type la localización de ORAI1-GFP está polarizada en zonas de ruffling, en células CTTN-KO ORAI1-GFP se localiza en regiones dorsales y ventrales, sin mostrar un claro eje antero-posterior. Estos resultados de inmunolocalización en célula fijada concuerdan con los resultados obtenidos al monitorizar ORAI1-mCherry en célula viva, que mostraron un menor número e intensidad de ruffles de membrana en células U2OS CTTN-KO. Aunque estos resultados concuerdan con los descritos en esta memoria, que muestran que tanto STIM1 como ORAI1 son necesarios para la correcta dinámica de GFP-CTTN en el frente de migración, hay que indicar que son necesarios estudios que aborden diferentes hipótesis de trabajo para explicar la interacción dinámica de ORAI1 y CTTN, hipótesis en las que nuestro grupo de investigación ya trabaja en la actualidad.



Las conclusiones derivadas del trabajo desarrollado durante la realización de esta Tesis Doctoral son:

1. La activación de ERK1/2 es independiente del influjo de Ca^{2+} extracelular, de modo que el nivel de activación de ERK1/2 en respuesta a EGF en células deficientes en STIM1, y por tanto deficientes en SOCE, alcanza niveles similares en células parentales (wild-type), confirmando que STIM1 no es un modulador de la activación de ERK1/2, pero sí un sustrato de estas quinasas.
2. La activación de ERK1/2 en respuesta a EGF es dependiente de la actividad de la quinasa Src e independiente de las quinasas dependientes de Ca^{2+} CAMKII y PKC (alfa y beta).
3. STIM1 fosforilado en sitios diana de ERK1/2 se encuentra localizado de manera polarizada en el frente de migración en células U2OS en cultivo, en áreas enriquecidas en CTTN, mientras que STIM1 no fosforilado presenta una distribución más difusa sin asimetría patente.
4. La ausencia de STIM1 lleva asociada la pérdida de SOCE en respuesta a taspigargina y a EGF, por lo que STIM1 es la principal isoforma de entre las proteínas STIM en el control del influjo de Ca^{2+} en la respuesta a estos dos agentes.
5. El influjo de Ca^{2+} extracelular controlado por STIM1 es necesario para el mantenimiento del ruffling de membrana en el frente de migración.
6. ORAI1 se encuentra localizado de manera polarizada en el frente de migración, donde co-localiza con CTTN. Además, la ausencia de ORAI1 lleva asociada la pérdida de SOCE en respuesta a taspigargina y a EGF, por lo que ORAI1 es la principal isoforma de las proteínas ORAI en el control del influjo de Ca^{2+} extracelular en la respuesta a estos dos agentes.
7. La interacción entre ORAI1 y CTTN es dinámica y responde a EGF, de modo que un vaciado de depósitos intracelulares de Ca^{2+} estimulado por EGF conduce a una disociación de ORAI1-CTTN.

8. La ausencia de expresión de CTTN impide la localización polarizada de ORAI1-GFP por lo que CTTN juega un papel importante en el reclutamiento de ORAI1 en el frente de migración.

The conclusions raised by the results shown in this Doctoral Thesis are the following:

1. Extracellular Ca^{2+} influx is dispensable for the activation of ERK1/2. Therefore, the level of ERK1/2 activation in response to EGF is not altered in cells lacking SOCE-deficient STIM1 KO cells. These results confirm that STIM1 is not an upstream regulator of ERK1/2, but a substrate of these kinases.
2. ERK1/2 is activated in response to EGF in a Src kinase-dependent manner and it is independent of other Ca^{2+} -regulated kinases, such as CAMKII and PKC (alpha and beta).
3. STIM1 phosphorylated at ERK1/2 target sites shows a polarized localization at the leading edge of migrating U2OS cells in culture, in CTTN-rich domains, whereas non-phosphorylated STIM1 shows a scattered localization without a clear front-rear pattern.
4. The lack of expression of STIM1 leads to a striking loss of SOCE in response to thapsigargin or EGF, confirming that STIM is the main isoform within the STIM family of proteins in the control of the extracellular Ca^{2+} influx in response to these two agents.
5. The extracellular Ca^{2+} influx regulated by STIM1 is required for maintaining the membrane ruffling at the leading edge of migrating cells.
6. ORAI1 shows a polarized localization at the leading edge of migrating cells, where co-localizes with CTTN. Moreover, the lack of expression of ORAI1 causes a striking loss of SOCE in response to thapsigargin or EGF. Therefore, ORAI1 is the main isoform of the ORAI proteins in the control of the extracellular Ca^{2+} influx in response to these two agents.
7. There is a dynamic interaction between ORAI1 and CTTN in response to EGF, and the depletion of intracellular Ca^{2+} stores in response to EGF triggers the dissociation of the complex ORAI1-CTTN.
8. The lack of expression of CTTN impairs the polarized localization of ORAI1-GFP. Thus, CTTN plays a key role in maintaining the proper localization of ORAI1 at the leading edge of migrating cells.



Materiales y Métodos

1. Cultivos celulares

Durante el desarrollo de este estudio se han utilizado las siguientes líneas celulares: células de cáncer de próstata humano, PC3; la línea celular HeLa, que deriva de una muestra de cáncer cérvico-uterino humano; y células humanas de osteosarcoma, U2OS.

Las líneas celulares se conservan y almacenan en crioviales a -80°C en medio de congelación¹. Las células se cultivan en medio DMEM completo² a 37°C y en una atmósfera húmeda de 5% de CO_2 . Las células cultivadas crecen formando monocapas hasta alcanzar una confluencia del 80-90%. Para recrear un cultivo, inicialmente, la monocapa de células se lava con PBS³ y se incuba con una solución de tripsina⁴ durante 3-4 minutos a 37°C . A continuación, la tripsina⁴ se inactiva por la adición de medio completo². Si el experimento requiere un número de células concreto, se toma una alícuota de las células tripsinizadas y se cuentan utilizando un hematocitómetro (cámara Neubauer). Posteriormente, las células se siembran en placas de cultivo hasta alcanzar la confluencia deseada para la realización del experimento.

2. Generación de líneas celulares modificadas genéticamente mediante el sistema CRISPR/Cas9.

El sistema CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas interespaciadas agrupadas de forma regular) tipo II es un sistema inmune bacteriano que ha sido modificado mediante ingeniería genética. Debido a su simplicidad y adaptabilidad, el uso del sistema CRISPR se ha extendido como una de las herramientas de edición génica más populares.

El sistema CRISPR está formado por dos componentes: un RNA guía (gRNA) y una endonucleasa asociada a CRISPR (Cas9). Para disminuir los cortes inespecíficos de la endonucleasa se utiliza una versión mutada de Cas9, conocida como Cas9 nickase, o Cas9n, que contiene la mutación D10A, y que es capaz de cortar solamente DNA monocatenario (Ran et al., 2013). A diferencia de la Cas9 wild-type que genera un

¹ **Medio de congelación:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con 50% de suero fetal bovino (FBS) y 10% de dimetil-sulfóxido (DMSO).

² **Medio de cultivo completo:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml.

³ **PBS:** NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 4.3 mM, KH_2PO_4 1.4 mM, pH 7.4.

⁴ **Solución de Tripsina (Invitrogen):** Tripsina 0.05% (p/v), EDTA 5 mM.

corte en la doble cadena de DNA, la versión mutada Cas9n, genera un corte en una hebra de DNA de manera específica debido a la co-expresión de RNAs guías concretos (gRNA), diseñados en función de la secuencia diana. El gRNA es una secuencia corta de RNA compuesta por una secuencia de nucleótidos necesaria para la unión de la endonucleasa Cas9n y una secuencia repetida de nucleótidos de aproximadamente 20 pares de bases denominada “DNA espaciador”, la cual reconoce secuencias específicas permitiendo a la endonucleasa Cas9n generar cortes en la secuencia de DNA diana que pretendemos modificar. De esta manera, la elección de la secuencia diana del genoma modificada por la Cas9n puede ser modificada simplemente cambiando la secuencia de DNA específica presente en los gRNAs.

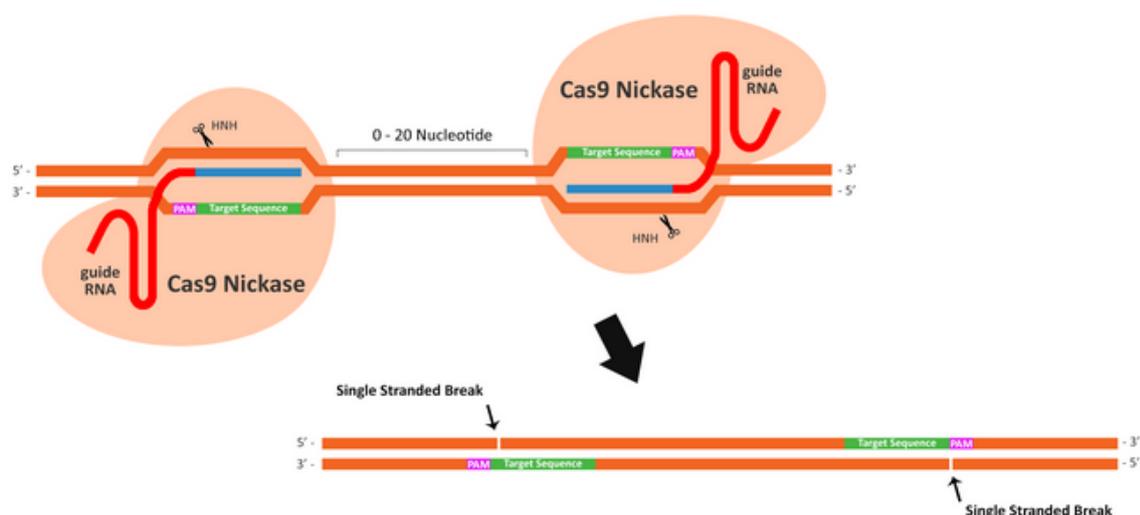


Figura 70. Esquema de la estrategia de corte de la Cas9 nickase. Fuente de la imagen *Applied Biological Materials (ABM) Inc.*

La generación de las líneas celulares knock-out (KO) para la expresión de las proteínas STIM1, ORAI1 y CTTN en la línea celular U2OS y el KO de STIM1 en la línea celular PC3, se realiza siguiendo un protocolo en el que se pueden diferenciar tres etapas, que son: (1) diseño de gRNAs, (2) transfección y (3) screening y validación de clones.

(1) Diseño de gRNAs: La secuencia diana del genoma puede ser en principio cualquier secuencia de nucleótidos de DNA, pero la longitud típica de una secuencia diana de DNA es de 20 pb y debe reunir además dos condiciones:

1. La secuencia de nucleótidos es única, comparándola con el resto del genoma.
2. La secuencia diana de DNA está localizada inmediatamente corriente arriba de una secuencia PAM (Protospacer Adjacent Motif).

Ej: 5' NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGG 3'

El locus del gen *STIM1* (ENSG00000167323) presenta tres variantes transcripcionales NM_001277961.1, NM_001277962.1 y NM_003156.3. La secuencia de DNA elegida como sitio diana de CRISPR se encuentra localizada en el exón 5 de *STIM1*, por ser éste común a las tres variantes transcripcionales. El par de gRNAs (sentido 5'-AGATGACAGACCGGAGTCATCGG y antisentido 5'-AGTCCCTGTCATGGTGGTGGTGG) se identificó utilizando la herramienta bioinformática de Sanger institute: (http://www.sanger.ac.uk/htqt/wge/find_crisprs), con la colaboración del Dr. Thomas Macartney (MRC-Protein Phosphorylation Unit y Universidad de Dundee). El gRNA antisentido se clonó en el vector pX335 (Addgene Plasmid #42335) que contiene el inserto para la expresión de spCas9 D10A, y el gRNA sentido se clonó en un vector que contiene el plásmido para la selección por el antibiótico puromicina pBABED P U6 (Munoz et al., 2014; Rojas-Fernandez et al., 2015).

El locus de *Orai1* (ENSG00000276045) presenta dos variantes transcripcionales: NM_032790.3 y una variante más corta con número de acceso Uniprot A0A087WTK9. El par de gRNAs óptimo (sentido 5'-(G)CCAAGCTTAAAGCCTCCAGC y antisentido 5'-(G)GCTCAAGTAGAGCTTGCGGCC) se identificó y seleccionó para la secuencia diana de DNA común al exón 1 compartido entre los diferentes transcritos descritos para la proteína. Como se mencionó anteriormente, el gRNA antisentido se clonó en el vector que contiene la nucleasa, y el gRNA sentido se clonó en un plásmido que permite la selección con puromicina.

El locus de *CTTN* (ENSG00000085733) presenta 3 variantes transcripcionales: NM_001184740.1, NM_005231.3 y NM_138565.2. El par de guías óptimo se identificó y seleccionó para la secuencia diana de DNA en el exón 3 compartida entre los distintos transcritos conocidos de *CTTN*.

(2) Transfección: Las células U2OS y PC3 se sembraron en placas de 10 cm de diámetro hasta alcanzar una confluencia del 40-50%. En ese momento, las células se co-transfectaron con 1 µg de cada plásmido (los dos gRNAs y endonucleasa) utilizando polietilenimina como agente de transfección y 24 horas más tarde se les añadió el medio de selección (DMEM + puromicina (2 µg/ml) y se mantuvieron en ese medio durante 48 horas adicionales. A continuación se les retira el medio de selección y con el fin de enriquecer el cultivo de células transfectadas se repite todo el proceso de transfección y de selección con puromicina. En este momento las células se individualizan por citometría de flujo (cell sorting) y los diferentes clones de células se cultivan, se crecen y

posteriormente se analizan para determinar la ausencia de expresión de las proteínas para la que se ha diseñado el knock-out.

(3) Screening y validación de clones: Este procedimiento se puede llevar a cabo mediante diferentes análisis. Para el análisis de los clones de STIM1, en primer lugar se analizó la expresión de la proteína por inmunoblot, y los clones seleccionados, negativos para la expresión de la proteína STIM1, se validaron por secuenciación genómica. En el caso de los clones de ORAI1 y CTTN el análisis se llevó a cabo directamente por secuenciación genómica.

Para el análisis de la secuencia genómica se llevó a cabo el protocolo que se detalla a continuación. A partir del pellet celular de los clones seleccionados se procedió al aislamiento del DNA genómico siguiendo el protocolo indicado en el kit específico para este fin de Thermo-Scientific. A continuación se realizó una PCR para amplificar el sitio diana de DNA específico para el corte de la nucleasa, utilizando la polimerasa con actividad proofreading Herculasa II. En el caso de STIM1, los primers o cebadores empleados fueron:

STIM1-KO forward primer: 5-CAAGAGCTAGAAGTGTTCTGGG;

STIM1-KO reverse primer 5'-CTTTGGTTTCCATGGCACAGC.

El programa de amplificación de DNA genómico utilizado para STIM1-KO consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 2 segundos, seguida de 30 ciclos consistentes en una desnaturalización a 95°C durante 20 segundos, hibridación de los cebadores con el DNA molde a 53°C durante 20 segundos y una extensión de la cadena en síntesis a 72°C durante 30 segundos cada ciclo. El producto de PCR resultante se subclonó utilizando el kit StrataClone Blunt-end PCR Cloning (Agilent Technologies). Las células competentes incluidas en el kit anteriormente mencionado se transforman con el producto de PCR, se siembran en placas de LB-agar con ampicilina (100 µg/ml), y se pican un mínimo de 12 colonias para verificar la secuencia del fragmento subclonado. Las colonias se cultivan individualmente en 2 ml de LB + ampicilina (100 µg/ml) y posteriormente se procede a la purificación del plásmido siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial Quiagen. En la práctica se considera que el análisis de 12 colonias bacterianas transformadas con el producto de PCR del clon de estudio es suficiente para determinar la modificación genética generada en los dos alelos (Lai et al., 2015).

En la línea U2OS STIM1-KO el análisis de secuenciación genómica reveló una deleción de 31 + 17 pb confirmando el KO del locus de *STIM1*.

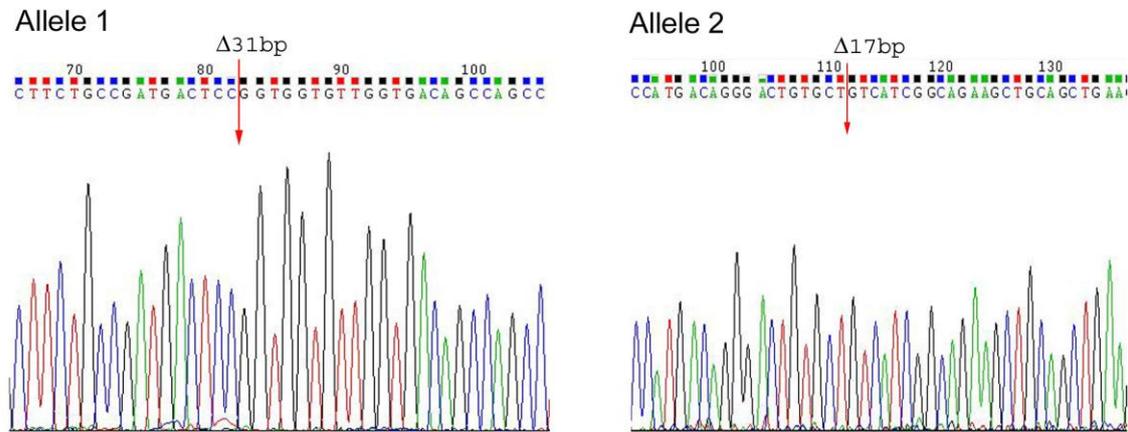


Figura 71. Cromatograma de la secuencia genómica de dos de las muestras de células U2OS STIM1-KO.

En la línea PC3 STIM1-KO el análisis de secuenciación genómica reveló una inserción de 16 pb confirmando el KO del locus *STIM1* en esta línea celular.

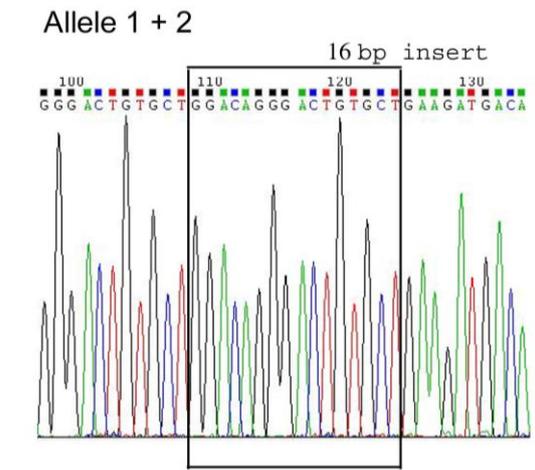


Figura 72. Cromatograma de la secuencia genómica de una de las muestras de células PC3 STIM1-KO analizadas.

Tal y como se ha comentado, los clones de células obtenidos en la generación de ORAI1-KO se analizaron directamente por secuenciación genómica. Para amplificar por PCR el sitio diana de DNA específico para CRISPR/Cas9n se utilizaron los siguientes cebadores:

ORAI1-KO primer forward: 5'-TCACCTACCCGGACTGGATCG;

ORAI1-KO primer reverse: 5'-AGCAGCCGGGACAGTAGAGG.

El programa de amplificación de DNA genómico utilizado para ORAI1-KO consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 2 segundos, seguida de 30 ciclos consistentes en una desnaturalización a 95°C durante 20 segundos, hibridación de los primers con el DNA molde a 56°C durante 20 segundos y una extensión de la cadena a 72°C durante 30 segundos cada uno. El análisis de la secuenciación genómica reveló una inserción de 16 + 14 pb confirmando el KO del locus de *ORAI1*.

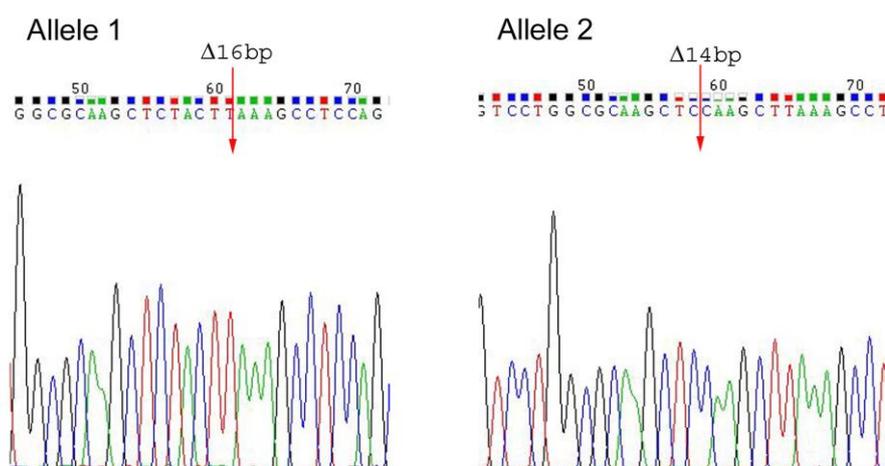


Figura 73. Cromatograma de la secuencia genómica de células U2OS ORAI1-KO analizadas.

Del mismo modo, los clones de células obtenidos en la generación de CTTN-KO se analizaron directamente por secuenciación genómica. Para la amplificación por PCR de la secuencia diana de DNA específica para el corte de la CRISPR/Cas9n se utilizaron los siguientes primers:

CTTN-KO primer forward: 5'-CTCGGTAGTTTTGGCCAAAGGG

CTTN-KO primer reverse: 5'-AAACCCAGGAGAGCCACTTCC.

El programa de amplificación de DNA genómico utilizado para CTTN-KO consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 2 segundos, seguida de 30 ciclos que consisten en una desnaturalización a 95°C durante 20 segundos, hibridación de los primers con el DNA molde a 56°C durante 20 segundos y una extensión de la cadena a 72°C durante 30 segundos. El análisis de secuenciación genómica reveló una delección de 23 + 20 pb, confirmando la generación de la línea CTTN-KO.

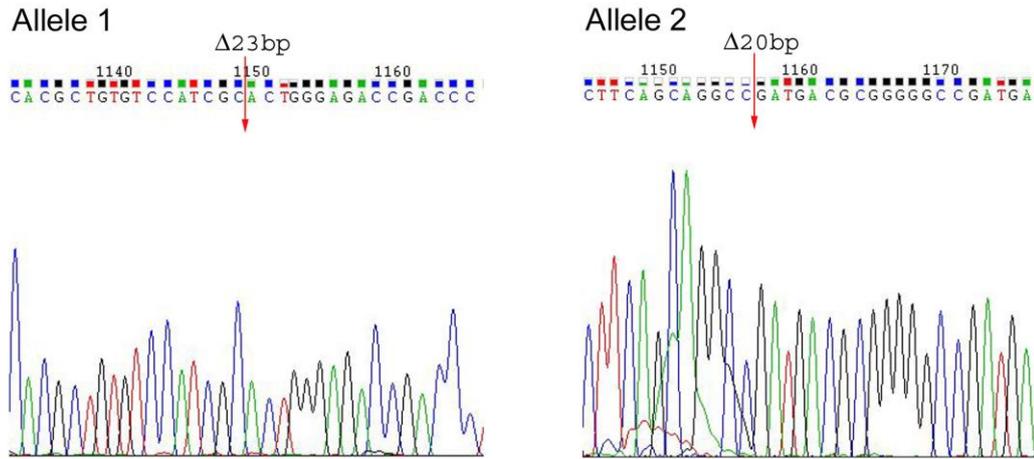


Figura 74. Cromatograma de la secuencia genómica de células U2OS CTTN-KO analizadas.

Una vez validados y seleccionados los clones positivos de las líneas KO generadas, los cultivos se expanden y se almacenan en crioviales en N₂ líquido hasta el momento de ser utilizados para experimentación.

3. Tratamientos de las líneas celulares

3.1. Tratamientos de las líneas celulares HeLa y U2OS

Las células se siembran y se deja que se adhieran a la placa de cultivo durante 24 horas para conseguir la confluencia necesaria para cada experimento. La confluencia celular varía desde un 60%, para ensayos de inmunolocalización y medidas de Ca²⁺ citosólico, hasta un 80-90% para ensayos de migración celular. Para ensayos de inmunolocalización y medidas de Ca²⁺ las células se siembran en cubreobjetos pre-tratados con colágeno al 0.01% durante un mínimo de 30 min a 37°C. El exceso de colágeno se lava 3 veces con PBS y a continuación se siembran las células. La privación de suero en ambas líneas celulares se realiza reemplazando el medio de cultivo por RPMI sin suero⁵, durante 8-10 horas antes de la realización de los tratamientos correspondientes, siendo este tiempo suficiente para reducir la actividad de las principales quinasas implicadas en este estudio.

⁵ **RPMI libre de suero:** RPMI suplementado con L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml.

3.2. Tratamientos de la línea PC3.

Al igual que con las líneas celulares HeLa y U2OS, las células PC3 se siembran y se dejan crecer en la placa de cultivo durante 24 horas hasta alcanzar la confluencia adecuada para cada ensayo y en el caso de ensayos de inmunolocalización o medida de Ca^{2+} las células PC3 se siembran en cubreobjetos pre-tratados con colágeno. Las células PC3 se deprivan de suero durante 12-14 horas en medio DMEM libre de suero⁶ con el fin de disminuir el nivel basal de fosforilación de las células.

Para el tratamiento de las células con inhibidores de quinasas, las células PC3 se pre-incubaron, antes de la estimulación con EGF, con PD0325901 durante 10 min, con KN-62 durante 30 min, y con Go 6976 y Src11 durante 20 min. Tras la pre-incubación con los inhibidores se retira este medio y se añade EGF en presencia del inhibidor en medio HBSS⁷.

4. Preparación de extractos celulares e inmunoblot.

4.1. Preparación de extractos celulares.

Los extractos proteicos se obtuvieron a partir de los diferentes cultivos celulares sembrados en placas de 10 cm de diámetro. Tras retirar el medio de cultivo las células se lavan con PBS frío y se lisan por la adición de 1 ml de tampón de lisis⁸ para la obtención de extractos proteicos totales. Puesto que STIM1 y ORAI1 son proteínas transmembranales los lisados se sonicar (Sonicador Branson Digital; 4 pulsos de 10 segundos a 40% de amplitud) para dispersar las membranas celulares y facilitar la solubilización de las proteínas. Por último, las muestras se clarifican, centrifugando a 20.000 *g* durante 20 minutos. Todo el proceso de obtención de extractos celulares se realizó en frío (4°C).

⁶ **DMEM libre de suero:** DMEM suplementado con L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml.

⁷ **HBSS (Hank's Balanced Salt Solution):** NaCl 138 mM, KCl 5.3 mM, Na_2HPO_4 0.34 mM, KH_2PO_4 0.44 mM, NaHCO_3 4.17 mM, D-glucosa 5.56 mM, Mg^{2+} 2.2 mM, EGTA 0.1 mM (pH 7.4).

⁸ **Tampón de lisis para extractos proteicos totales:** Tris-HCl 50 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, fluoruro sódico 50 mM, pirofosfato sódico 5 mM, ortovanadato sódico 1 mM, 1% Nonidet-P40, sacarosa 270 mM, DTT 1 mM, benzamidina 1 mM y PMSF 1 mM.

4.2. Medida de la concentración de proteína.

La concentración de proteína de los extractos celulares se determina mediante método colorimétrico de Bradford, utilizando como estándar cantidades conocidas de albúmina de suero bovino (BSA). La concentración de proteína se determina midiendo la absorbancia de las muestras a 594 nm e interpolando los valores obtenidos con la recta patrón generada con la proteína BSA (cantidades utilizadas entre 1-6 µg)

4.3. Inmunoprecipitación y co-inmunoprecipitación de proteínas.

Para inmunoprecipitar proteínas de fusión unidas a Flag o GFP se incuban extractos celulares con una resina de agarosa con afinidad por el péptido Flag (Flag-beads) o por la proteína GFP (GFP-Trap beads, ChromoTek) durante 1 hora o durante 4 horas respectivamente, a 4°C con rotación. Una vez unida la proteína de estudio a las Flag o GFP-beads se precipita este complejo, se descarta el sobrenadante y el pellet se lava con tampón de lisis suplementado con NaCl 0.5 M. Si el objetivo del experimento es analizar las proteínas co-precipitadas con la proteína en estudio, entonces la concentración de NaCl es de 150 mM, para así eliminar las proteínas inespecíficas unidas por enlaces débiles al complejo proteico. A continuación, el pellet se lava con tampón A⁹ para eliminar los restos de sales y seguidamente las proteínas precipitadas se eluyen de la resina de agarosa (Flag-beads o GFP-Trap) con 15-20 µl de tampón de elución¹⁰ e hirviendo la muestra durante 10 minutos a 72°C. Para descartar las beads la muestra se pasan por columnas de filtración (Spin-X). En el desarrollo de este trabajo de investigación también se utilizó una resina de agarosa conjugada con un anticuerpo primario anti-ORAI1 (anti-ORAI1-beads, clone G-2 de Santa Cruz Biotechnology), que se manipularon de igual forma que las GFP-Trap. Las muestras obtenidas por inmunoprecipitación se someten a electroforesis y transferencia a membrana de nitrocelulosa como se describe a continuación.

4.4. Electroforesis en condiciones desnaturizantes y transferencia a membranas de nitrocelulosa.

Para la realización de las electroforesis de proteínas en geles desnaturizantes de poliacrilamida se utiliza el sistema de tampón discontinuo descrito por Laemmli

⁹ **Tampón A:** Tris-HCl 50 mM, EGTA 0.1 mM, pH 7.5.

¹⁰ **Tampón de elución:** LDS (2X) (Nu-Page) β-mercaptoetanol 300 mM.

(Laemmli, 1970). La cantidad determinada (3-40 μg) de los extractos celulares se mezcla con el volumen adecuado de tampón de carga¹¹. Las proteínas se someten a electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes por la presencia del detergente iónico SDS (SDS-PAGE)¹² y se separan en función de su peso molecular. Dependiendo del tamaño de la proteína en estudio se emplean geles de poliacrilamida de diferentes concentraciones, entre el 8 y 12% de acrilamida. Una vez realizada la electroforesis, las proteínas presentes en el gel se transfieren a membranas de nitrocelulosa por aplicación de un campo eléctrico en una cubeta que contiene un tampón de transferencia¹³. La transferencia se realiza a 4°C durante 4 horas a 40V.

4.5. Inmunodetección.

Una vez terminada la transferencia, las membranas se tiñen con el colorante Ponceau S¹⁴ que nos permite comprobar la eficiencia en la transferencia, así como la homogeneidad en la cantidad de proteína cargada en cada muestra. Para ensayos de inmunoblot las membranas se mantienen durante 1 hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo¹⁵ y a continuación se incuban con el anticuerpo primario correspondiente empleando las condiciones y diluciones indicadas en la Tabla I. Tras 6 lavados de 10 minutos en solución TBS-T¹⁶, las membranas se incuban en solución de bloqueo con el anticuerpo secundario conjugado con la enzima HRP (horseradish peroxidase) a una dilución de 1:20.000 y se mantiene en esta solución durante 60 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las membranas se lavan 6 veces adicionales (durante 10 minutos cada lavado) en TBS-T¹⁶ y un lavado adicional en TBS¹⁷ de 5 minutos. Finalmente, se añade el sustrato quimioluminiscente Super-Signal West Femto (Thermo) durante 3 minutos a temperatura ambiente y las membranas se exponen a películas fotográficas durante 1-10 minutos, que se revelan de modo que las bandas inmunoreactivas se observan allí dónde ha habido emisión de luminiscencia.

Algunas membranas de nitrocelulosa pueden ser reutilizadas para la incubación con más de un anticuerpo, como es el caso de la detección con anticuerpos fosfo-específicos y los anticuerpos totales para el estudio de la expresión de una misma proteína. En este caso la membrana se bloquea y se expone en primer lugar al

¹¹ **Tampón de carga:** LDS (4X) (Nu-Page) DTT 40 mM y azul de bromofenol.

¹² **Tampón de electroforesis:** Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0.1 % (p/v).

¹³ **Tampón de transferencia:** Tris 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20% (v/v).

¹⁴ **Ponceau S:** ponceau S 0.5% (p/v), ácido acético 5% (v/v).

¹⁵ **Solución de bloqueo:** Leche desnatada en polvo 10% (p/v) disuelta en TBS-T.

¹⁶ **TBS-T:** Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 75 mM, Tween 20 0.2% (v/v).

¹⁷ **TBS:** Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 75 mM.

anticuerpo fosfo-específico de la proteína de estudio y al anticuerpo secundario correspondiente. Seguidamente se añade el sustrato quimioluminiscente y se expone a una película fotográfica para su revelado. A continuación, para reutilizar la membrana es necesario lavar la membrana con un tampón de lavado de anticuerpos¹⁸ durante 5-10 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo el tampón de lavado es reemplazado por TBS-T, solución que se cambiará varias veces durante un mínimo de 2 horas. El siguiente paso es la incubación de la membrana en solución de bloqueo durante 60 minutos, seguido de la incubación con el siguiente anticuerpo primario, su anticuerpo secundario correspondiente y el revelado final.

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	DILUCIÓN	TIEMPO DE INCUBACIÓN
Mouse anti-Flag	<i>Sigma</i>	1:300	4°C 12-16 h + RT 1 h
Goat anti-GFP	<i>Cell Signaling</i>	1: 2000	4°C 12-16 h + RT 1 h
Rabbit anti-STIM1	<i>ProSci</i>	1:1000-1:10000	4°C 12-16 h
Mouse anti-STIM1	<i>BD</i>	1:1000	4°C 12-16 h
Sheep anti-phospho-S575-STIM1	<i>(Universidad de Dundee)</i>	1 µg/ml + 10 µg/ml blocking peptide	4°C 12-16 h*
Sheep anti-phospho-S608-STIM1	<i>(Universidad de Dundee)</i>	1 µg/ml + 10 µg/ml blocking peptide	4°C 12-16 h*
Sheep anti-phospho-S621-STIM1	<i>(Universidad de Dundee)</i>	1 µg/ml + 10 µg/ml blocking peptide	4°C 12-16 h*
Mouse anti-GAPDH	<i>AbCam</i>	1: 6000	4°C 12-16 h
Rabbit anti-phospho-ERK1/2	<i>Cell Signaling</i>	1: 2000	4°C 12-16 h
Rabbit anti-total ERK1/2	<i>Cell Signaling</i>	1: 2000	4°C 12-16 h
Rabbit anti-phospho-cJun	<i>Cell Signaling</i>	1:1000	4°C 12-16 h
Sheep anti-total cJun	<i>(Universidad de Dundee)</i>	1: 1000	4°C 12-16 h
Rabbit anti-phospho-p38 MAPK	<i>Cell Signaling</i>	1: 1000	4°C 12-16 h
Rabbit anti-total p38 MAPK	<i>Cell Signaling</i>	1: 1000	4°C 12-16 h
Rabbit anti-phospho-CAMKII	<i>Cell Signaling</i>	1: 1000	4°C 12-16 h
Rabbit anti-total CAMKII	<i>Cell Signaling</i>	1: 500	4°C 12-16 h
Mouse anti-CTTN	<i>Millipore</i>	1: 1000	4°C 12-16 h
Rabbit anti-pTyr421-CTTN	<i>Cell Signaling</i>	1 : 1000	4°C 12-16 h
Mouse anti-ORAI1(clone G2)	<i>Sta. Cruz</i>	1: 200	4°C 12-16 h

* Los anticuerpos fosfo-STIM1 se pre-incuban con su péptido específico no fosforilado durante 30 min.

Tabla I: Relación de anticuerpos utilizados en inmunoblots. RT: temperatura ambiente.

¹⁸ **Tampón de lavado de anticuerpos:** Restore™ Blot Stripping Buffer de Thermo Scientific.

5. Inmunolocalización.

Las células sembradas en cubreobjetos pre-tratados con 0.01% de colágeno y fijadas en paraformaldehído (PFA) al 4%, durante 10 min y a temperatura ambiente, se permeabilizan con Tritón-X100 0.2% durante 10 min y se incuban en solución de bloqueo¹⁹ durante 30-60 min. A continuación, las células se incuban con el anticuerpo primario utilizando la dilución y el tiempo de incubación establecido para cada anticuerpo (Tabla II). Posteriormente, las células se lavan con PBS-Tween 0.2% y se incuban con el anticuerpo secundario correspondiente, marcado con Alexa Fluor-488 o Alexa Fluor-594, diluido 1:500-1:1000 en solución de bloqueo¹⁹, durante 20 min y a temperatura ambiente. A continuación, las células se lavan con PBS-Tween al 0.2% y finalmente con PBS.

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	DILUCIÓN	TIEMPO DE INCUBACIÓN
Sheep anti-phospho-S575-STIM1	<i>(Universidad de Dundee)</i>	10 µg/ml + 200 µg/ml blocking peptide	4°C 12-16 h*
Sheep anti-STIM1	<i>(Universidad de Dundee)</i>	10 µg/ml + 200 µg/ml blocking peptide	4°C 12-16 h
Mouse anti-CTTN	<i>Millipore</i>	20 µ/ml	4°C 12-16 h

* Los anticuerpos fosfo-STIM1 se pre-incuban con su péptido específico no fosforilado durante 30 min.

Tabla II: Relación de anticuerpos utilizados para inmunolocalización.

5.1. Análisis por epifluorescencia en célula fijada.

Las células HeLa y U2OS, una vez fijadas y realizado el protocolo de inmunolocalización, se lavan con PBS y agua para eliminar las sales y se montan en portaobjetos utilizando el medio Hydromount® (National Diagnostics). Para la observación de la localización de las proteínas se utiliza un microscopio invertido Nikon Ti-E equipado con filtros de excitación, espejo dicróico y filtros de emisión específicos de cada fluoróforo (GFP o mCherry). Las imágenes se capturan en una cámara CCD Hamamatsu C9100-02 acoplada al microscopio de fluorescencia invertido con un objetivo Aplanachromat 100x de inmersión en aceite. El análisis de imágenes se realiza con el software NIS-Elements Advanced Research.

¹⁹ **Solución de bloqueo:** 3% gelatina de piel de pescado (Cold water fish skin gelatin, Sigma) disuelta en PBS-Tween 0.2% pH 7.4 (suplementada con NaF 0.5 mM en el caso de la determinación de epítomos fosforilados).

Las imágenes de microscopía de luz estructurada mostradas en la figura 32 se realizaron con un microscopio DeltaVision OMX (de iluminación estructurada) de la Universidad de Dundee (con la colaboración del Dr. Alejandro Rojas-Fernández).

5.2. Análisis por epifluorescencia en célula viva.

La fluorescencia de los marcadores utilizados, GFP y mCherry, unidos a las proteínas de estudio se monitoriza manteniendo las células a 37°C en un incubador UNO-Okolab. En los registros de fluorescencia de célula viva se utiliza el medio libre de bicarbonato Leibovitz's L-15 suplementado con 10% de suero. Se utilizan filtros de excitación a 480/30 nm, y de emisión 535/40 nm y un espejo dicróico de 505 nm para GFP, y filtros de excitación a 562/40, de emisión a 641/175 y un espejo dicróico a 593 nm para mCherry (Semrock). El tiempo de adquisición de imágenes es de 20-40 milisegundos por captura, con un intervalo de tiempo de 3 segundos, durante 5-10 minutos. El foco de la imagen se ajusta continuamente por el sistema de enfoque perfecto (PFS, perfect focusing system) del microscopio invertido Nikon Ti-E.

5.3. Análisis de imágenes.

El análisis de intensidad de fluorescencia en el tiempo (kymographs), se calcula a partir de la media de intensidad de fluorescencia en una profundidad de 3-pixel en el área seleccionada. El análisis espacio temporal de las imágenes, STICS (spatiotemporal image correlation spectroscopy), se llevó a cabo evaluando la dirección y la velocidad de cortactina unida al marcador fluorescente GFP en la periferia de las células, utilizando el software ImageJ (con la colaboración del Dr. Graeme Bale, de la Universidad de Dundee). Para el análisis de las imágenes también se utilizó el software NIS-Elements AR.

6. Ensayos de migración celular.

Para evaluar la migración de las líneas celulares se utiliza el ensayo de cierre de herida en placa. Para este tipo de ensayo se utilizan placas de 35 mm de diámetro pre-tratadas con colágeno al 0.01% durante un mínimo de 30 min a 37°C. Posteriormente las placas se lavan con PBS 3 veces y se procede a la siembra de las células en medio DMEM. Una vez alcanzada una confluencia celular del 80% se hace una herida de aproximadamente 500 µm de anchura en la monocapa de células, raspando el fondo de

la placa con una punta de pipeta de 20-200 μ l. Para eliminar las células desprendidas, la monocapa de células se lava con DMEM. En este momento se hacen fotografías de la herida (tiempo 0) utilizando un microscopio invertido de contraste de fases y un objetivo 10x, y se vuelven a tomar fotografías pasadas 14 horas, a tiempo final del ensayo (tiempo 14 h). La cuantificación del cierre de herida se lleva a cabo utilizando el software ImageJ.

7. Análisis del ciclo celular.

En el desarrollo de este trabajo hemos empleado el análisis por citometría de flujo para cuantificar la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular, así como la proporción de células apoptóticas. Las células se siembran en placas de cultivo a baja confluencia y se cultivan durante 48 horas en medio DMEM⁶ suplementado con 10% de suero. En primer lugar se recupera el medio de cultivo de las placas y se reserva en un tubo estéril. A continuación, la monocapa de células se lava con PBS³, que también se recupera y se reserva en el tubo estéril. En este momento las células se separan de la placa de cultivo mediante la adición de tripsina⁴. Por último, las células se centrifugan, se lavan con PBS y se fijan con una solución de etanol al 70% a 4°C. Posteriormente se lleva a cabo el análisis por citometría de flujo que fue realizado por los Servicios de Apoyo a la Investigación (STAB) de la Universidad de Extremadura.

8. Clonaje molecular y transfección.

8.1. Cuantificación del DNA.

La concentración de DNA se calcula por espectrofotometría, teniendo en cuenta que 50 μ g/ml de DNA en solución acuosa tienen un valor de absorbancia a 260 nm (A_{260}) igual a 1.0. Para estimar la pureza del extracto se calcula la relación A_{260}/A_{280} , que debe resultar un valor comprendido entre 1.7-1.8 para una disolución de DNA puro.

8.2. Transformación bacteriana.

El método de transformación bacteriana seguido es el descrito por (Hanahan, 1983) y se basa en permeabilizar a las bacterias con un choque térmico. Se transforman 100 μ l de bacterias competentes del tipo DH5 α F' de *Escherichia coli* con 10 μ l de una mezcla de ligación (plásmido con la resistencia al antibiótico, y el inserto de cDNA

correspondiente en cada caso). A continuación, se incuba en hielo durante 30 min y después se da un choque térmico a 42°C durante 90 segundos, seguido de una breve incubación en hielo durante 5 min. Después, se añade 1 ml de medio LB (Luria-Bertani) y se incuba durante 1.5-2 horas con una agitación suave a 37°C. Finalmente se siembra por extensión 100 µl de esta suspensión de bacterias en una placa de LB-agar suplementada con el antibiótico de selección y se incuba a 37°C durante 16-18h. En el anexo 1 se muestran las construcciones utilizadas en el desarrollo de este trabajo.

8.3. Obtención de DNA plasmídico.

A partir de las colonias de bacterias crecidas en la placa de LB-agar, se realiza un crecimiento de las colonias seleccionadas en 2 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml) o kanamicina (50 µg/ml) y se deja incubando a 37°C en agitación (250 rpm) durante 10-12 horas. Tras el crecimiento del cultivo se procede a la centrifugación del mismo a 4°C y 10000 g durante 5 min. Finalmente se realiza la purificación del plásmido siguiendo el protocolo de purificación del kit Quiagen.

8.4. Construcciones de DNA y transfección.

Para la expresión transitoria de proteínas como Flag-STIM1, STIM1-GFP, STIM1-mCherry, ORAI1-GFP, etc., las células se transfectan con plásmidos que incluyen los cDNA que codifican para las proteínas de interés (Anexo I). El DNA utilizado para la transfección se purifica a partir de bacterias *Escherichia coli* DH5αF' utilizando el kit de Quiagen para la extracción de plásmidos siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial. Las construcciones de DNA para la transfección transitoria de GFP-CTTN (Adgene #26722) y mCherry-CTTN (Addgene #27676) son distribuidas por Addgene.

La transfección de las construcciones de DNA se realiza 8 horas después de la siembra y utilizando de 1-3 µg de DNA por placa de 10 cm para las líneas celulares U2OS, HeLa y PC3. Como agente de transfección se utiliza polietilenimina (PEI). La transfección se realiza 20-24 horas antes del inicio de los experimentos para asegurar una adecuada expresión de la proteína de interés.

9. Medida de la concentración de calcio libre intracelular.

La medida de la concentración de Ca^{2+} libre intracelular $[(\text{Ca}^{2+})_i]$ se determina mediante el método descrito en (Pozo-Guisado et al., 2010) empleando fura 2 como fluoróforo sensible a Ca^{2+} . Fura 2 presenta un espectro de excitación con dos máximos situados a 340 y 380 nm. El primero de ellos permite monitorizar la concentración del complejo fura 2- Ca^{2+} , mientras que el segundo corresponde al fura 2 libre. A 360 nm presenta un punto isobéptico que se utiliza para determinar la fluorescencia independiente de Ca^{2+} o para determinar la extinción de fluorescencia. El espectro de emisión de este indicador presenta un único máximo situado a 510 nm. La constante de disociación (Kd), para Ca^{2+} es de 225 nM, lo que hace a esta sonda especialmente adecuada para determinar los valores de Ca^{2+} desde 20-30 nM hasta 1-2 μM (Thomas and Delaville, 1991).

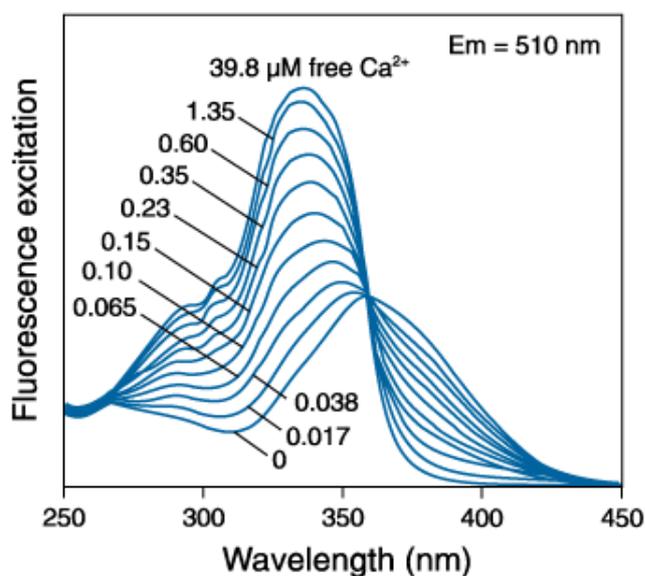


Figura 75. Espectro de excitación de fura 2-AM. La gráfica representa el espectro de excitación de la sonda fluorescente fura 2-AM en solución con concentraciones de Ca^{2+} saturantes (38.9 μM), y concentraciones que se encuentran incluidas en el rango de intervalo de detección de fura-2: 0,017-1.70 μM , para una longitud de onda de emisión de 510 nm.

Debido a que el fura-2 es un anión policarboxilato, no atraviesa la bicapa lipídica, por lo que la forma más conveniente de cargar este indicador en la célula es mediante la dispersión del acetoximetiléster (AM) del indicador. Los grupos carboxílicos del indicador son esenciales para que éste sea sensible a Ca^{2+} , por lo tanto los grupos esterificados a los mismos deben de ser eliminados una vez que el indicador ha penetrado en la célula. Esta acción es llevada a cabo por la actividad esterasa intracelular, capaz de liberar la forma policarboxilato sensible a Ca^{2+} . Una problemática asociada a los acetoximetilésteres de los indicadores es su baja solubilidad en soluciones acuosas. Por ello, para que la carga del fura-2AM sea efectiva se necesita realizarla junto con pluronic F-127, un surfactante no iónico que facilita la dispersión de los mismos.

9.1. Carga con fura 2-AM en células U2OS y PC3.

Para realizar la medida de la $[Ca^{2+}]_i$ se procede en primer lugar a la carga de las células con fura 2-AM. Para ello las células se incuban con fura 2-AM 1 μ M y pluronic F-127 0.025% en medio de cultivo, durante 1 hora y a 37°C. Transcurrido este tiempo las células se lavan con HBSS y se lleva a cabo el registro de los valores de fluorescencia.

9.2. Medida de los valores de fluorescencia.

Para determinar la fluorescencia de la sonda en el interior de las células se utiliza un microscopio invertido Nikon Ti-E. El registro de emisión de fluorescencia consta de tres registros simultáneos: (1) el registro de la emisión de fluorescencia utilizando una excitación a 340 (F340), (2) utilizando una excitación a 380 nm (F380) y (3) el registro del cociente (ratio de fluorescencia, $R = F340/F380$) entre la emisión de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 340 nm y la emisión de fluorescencia con una longitud de onda de 380 nm. Todas las medidas se realizan a 35-36°C (controlador de temperatura DH-40i de Warner Instruments, Inc.). Las imágenes se obtienen utilizando los filtros de excitación 340/26 y 387/11 nm, un espejo dicróico de 510 nm y un filtro de emisión de 510/10 nm (Semrock). Las imágenes son capturadas con una cámara CCD Hamamatsu C9100-02 acoplada al microscopio de fluorescencia invertido y analizadas con el software NIS-Elements AR.

9.3. Calibración de la medida.

El cociente $F340/F380$, que hemos denominado R , puede ser utilizado para determinar la concentración de Ca^{2+} libre intracelular. La ecuación que relaciona R con la $[Ca^{2+}]_i$ es la siguiente:

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \times (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R) \times \beta.$$

En esta ecuación, R es el ratio de la fluorescencia ($F340/F380$). R_{\max} y R_{\min} son los valores de R bajo condiciones saturantes o libres de Ca^{2+} , respectivamente, y β es el cociente de los valores de fluorescencia a 380 nm registrados en condiciones de Ca^{2+} libre y saturantes de Ca^{2+} .

9.4. Activación de la entrada de Ca^{2+} mediante canales SOC.

Para inducir la apertura de los canales de Ca^{2+} operados por depósitos intracelulares (canales SOC) se utiliza tapsigargina (Tg), un inhibidor específico e irreversible de la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarco(endo)plasmático (SERCA) (Lytton et al., 1991; Thastrup et al., 1990) que impide su relleno, induciendo un estado de vaciado de Ca^{2+} del RE. Además, en este trabajo se evalúa el efecto de EGF (epidermal growth factor) sobre la activación de la entrada de Ca^{2+} a través de los canales SOC. El vaciado de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} se determina incubando las células durante 10 min con Tg 1 μM o con EGF 50 ng/ml en tampón HBSS libre de Ca^{2+} suplementado con Mg^{2+} 2.2 mM y EGTA 0.1 mM. Por otro lado, la activación de canales SOC se confirma por el incremento del ratio F340/F380 tras la adición de CaCl_2 2 mM al medio extracelular.



Global summary

Cytoskeleton reorganization regulated by STIM1 and ORAI1

1. Introduction

Cell motility and migration are complex and dynamic events that involve the reorganization of cytoskeleton. This reorganization includes a cycle of leading edge protrusion, attachment, and rear edge retraction, to generate morphological polarization. Directional cell migration plays an important role in many physiological and pathological processes. For that reason, the signaling controlling these events is still a topic of intense study. It is known that extracellular Ca^{2+} influx is essential for cell migration and for the positive feed-back cycle that maintains the leading-edge structure and the activity of the membrane ruffles (Berridge et al., 2003; Evans and Falke, 2007). Thus, the regulation of the spatio-temporal characteristics of Ca^{2+} signaling is also important to control cell motility and migration (Espinosa-Tanguma et al.). In this regard, store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) has been pointed to as being involved in cell migration and metastasis (Prevarskaya et al., 2011; Yang et al., 2009). SOCE, the predominant extracellular Ca^{2+} entry mechanism in non-excitable cells, is activated by the partial depletion of intracellular Ca^{2+} stores, mainly the endoplasmic reticulum (ER). SOCE is controlled by STIM1 (stromal interaction molecule 1), an intraluminal Ca^{2+} sensor of the ER that activates store-operated calcium channels (SOCs) (Liou et al., 2005; Roos et al., 2005; Zhang et al., 2005). STIM1 is an ER transmembrane protein with a Ca^{2+} -binding canonical EF-hand domain that acts as a Ca^{2+} sensor in the ER lumen. Upon ER depletion STIM1 translocates to ER-plasma membrane junctions where it activates ORAI1, a plasma membrane Ca^{2+} channel, once STIM1 has become activated (Feske et al., 2006; Soboloff et al., 2006b; Vig et al., 2006) (Muik et al., 2008).

Several studies have reported the role of STIM1 and SOCE on cell migration (Casas-Rua et al., 2015; Motiani et al., 2013; Suganuma et al., 2012; Tsai et al., 2014; Yang et al., 2009; Yoshida et al., 2012). The mechanism by which STIM1 activates ORAI1 is well known, and a detailed map of the protein-protein interaction sites is available and has been reviewed elsewhere (Derler et al., 2016; Soboloff et al., 2012). However, additional studies are required to understand the mechanism required for STIM1 and ORAI1 localization and their role in migrating cells. In this regard, it is known that STIM1 is transported by a microtubule-dependent mechanism. EB1 (end-binding protein 1), a microtubule plus-end-tracking protein that regulates microtubules growth, binds directly to STIM1 through a sequence that includes residues 642-645 (Thr-Arg-Ile-Pro) (Grigoriev et al., 2008). Thus, YFP-STIM1 mutated at the EB1 binding sites

(STIM1I644N/P645N) failed to polarize in migrating cells, although it can activate overall SOC influx to a similar degree as wild-type STIM1 (Pozo-Guisado et al., 2013; Tsai et al., 2014) indicating that the transport of STIM1 to the leading edge is a microtubule-dependent event. Previous work of our group reported that STIM1 becomes phosphorylated at three ERK1/2 target sites, Ser575, Ser608, and Ser621, upon store depletion conditions triggered by thapsigargin, EGF or IGF-1 (Pozo-Guisado et al., 2010; Pozo-Guisado and Martin-Romero, 2013; Tomas-Martin et al., 2015))(Pozo-Guisado et al., 2013). STIM1 phosphorylation at ERK1/2 target sites leads to the dissociation from EB1 (Casas-Rua et al., 2013; Pozo-Guisado et al., 2010; Pozo-Guisado et al., 2013; Tomas-Martin et al., 2015), and this dissociation of STIM1 is required for the proper binding to ORAI1. Consequently, the Ser-to-Ala substitution mutant of STIM1 remained bound to EB1 and did not trigger full SOC influx in response to store depletion (Pozo-Guisado et al., 2010; Pozo-Guisado et al., 2013). These results highlighted the requirement of an EB1-dependent transport of STIM1, followed by the dissociation from microtubules to let STIM1 bind to SOC channels (such as ORAI1). However, the mechanism that regulates the polarized localization of STIM1 remains unclear.

Recent studies reported that a transient rise of cytosolic free Ca^{2+} is required for migration of osteoclasts, endothelial cells, and breast cancer cells (Tsai et al., 2014; Wheal et al., 2013; Yang et al., 2009). Some aspects of this regulation have been proposed, for instance, the participation of calpain, a Ca^{2+} -dependent protease which increases cell adhesion and migration in ovary cells as well as cervical and osteosarcoma cancer cells (Huttenlocher et al., 1997; Saraiva et al., 2013). Another example is the increase of actomyosin contractile force stimulated by SOCE in cervical cancer cells (Chen et al., 2013; Vicente-Manzanares et al., 2009). Therefore, it is assumed that SOCE regulates the cytosolic Ca^{2+} increases required for cell migration. However, it is not well understood how Ca^{2+} regulatory proteins, such as STIM1 and ORAI1, are spatially sorted within migrating cells.

In the present study, we examined some aspects of the interdependence between SOCE and the cytoskeleton, with special focus on the relation between the components of cytoskeleton and the proper localization of the major components involved in SOCE, STIM1 and ORAI1. ERK1/2 kinases have an essential role in the process of reorganization of the cytoskeleton. In addition, these kinases also have a key role in the regulation of SOCE by phosphorylating STIM1, a fact that has been showed in previous works of our group (Casas-Rua et al., 2013; Casas-Rua et al., 2015; Pozo-Guisado et al., 2010; Pozo-Guisado et al., 2013; Tomas-Martin et al., 2015). However, it is possible

to find some discrepancy in the recent literature regarding the interdependence of ERKs and SOCE. For this reason, we first examined the interdependence between SOCE and ERK1/2 using cell lines edited by genome engineering to knock-out the expression of STIM1, and thus to generate cells without active SOCE.

2. Objectives

The general objective of this Doctoral Thesis is the study of the influence of STIM1 and ORAI1 in the reorganization of the cytoskeleton at the leading edge in migrating cells.

3. Results and Discussion

3.1. SOCE is dispensable for the activation of ERK1/2 pathway in response to EGF.

The Raf-MEK-ERK pathway is involved in the regulation of cell cycle, cell growth and apoptosis (Roberts and Der, 2007). A wide variety of stimuli can trigger the activation of Raf proteins, which is mediated mainly by Ras, PKC or members of the Src kinase family (Alavi et al., 2003; McCubrey et al., 2007; Roberts and Der, 2007; Stokoe and McCormick, 1997; Wang et al., 2001). Therefore, many recent studies have focused on Raf-MEK-ERK pathway in order to design strategies to prevent malignant cell growth. The Raf-MEK-ERK is also closely linked to the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-PTEN-AKT pathway, because this latter pathway negatively regulates the Raf protein activity, although the pathway can be fully activatable by EGF.

There are two different models proposed in the recent literature regarding the interdependence of ERKs and SOCE: (I) it has been reported that Ca^{2+} entry regulates ERK1/2 activation in melanoma cells (Umemura et al., 2014), and in parotid acinar cells (Soltoff and Lannon, 2013); (II) On the contrary, other studies claimed that the activation of ERK1/2 is required for the fully activation of SOCE in adenocarcinoma endometrial (Ishikawa) cells, HEK293 cells, gastric cancer cells and retinal epithelial cells (Casas-Rua et al., 2015; Tomas-Martin et al., 2015; Xu et al., 2016; Yang et al., 2013). Since, previous results from our group pointed out that extracellular Ca^{2+} , and therefore Ca^{2+} entry, were dispensable for ERK1/2 activation, we decided to study the interdependence of ERK1/2 and SOCE, firstly, by monitoring the effect of the presence of extracellular

Ca²⁺ in the assay medium to examine the level of ERK1/2 activation. The results (figure I) demonstrate that there is no significant increase of this activation in response to EGF.

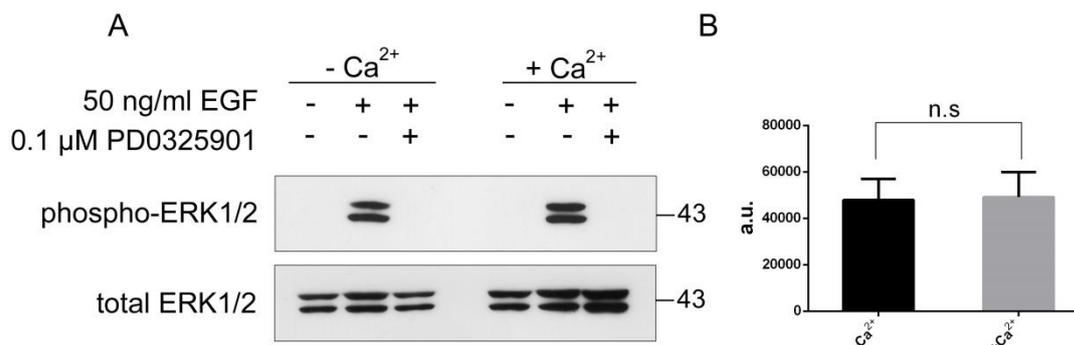


Figure I. Ca²⁺ influx is dispensable for ERK1/2 activation. *Panel A:* PC3 cells were FBS starved for 12 h and treated with 50 ng/ml EGF in Ca²⁺ free HBSS (-Ca²⁺) or Ca²⁺ -containing HBSS (+Ca²⁺). Lysates (20 μg protein/lane) were evaluated for the level of ERK1/2 activation (phospho-ERK1/2) using total ERK1/2 levels as loading control. Blots are representative of 3 independent experiments. *Panel B.* The data are presented as mean ± standard deviation (s.d.) from 3 independent experiments. The graph bar indicates the level of phospho-ERK1/2 from 3 independent experiments. Statistical analysis was done using the unpaired t-test. (n.s.) p > 0.05.

The results support a model in which SOCE is not required for ERK1/2 activation. Therefore, in order to study the real contribution of SOCE on this signaling pathway, we designed experiments to avoid SOCE activation by generating a PC3 cell line deficient on STIM1, as SOCE fully depends on the activity of this protein. Using CRISPR/Cas9-mediated gene edition we generated a knock-out in the *STIM1* locus in PC3 cells. As a consequence, these modified PC3 cells did not show detectable expression of STIM1 protein, and consequently there was no Ca²⁺ entry in response to thapsigargin or EGF. In these modified cells, deficient in SOCE, EGF is fully capable to activate ERK1/2 (figure II).

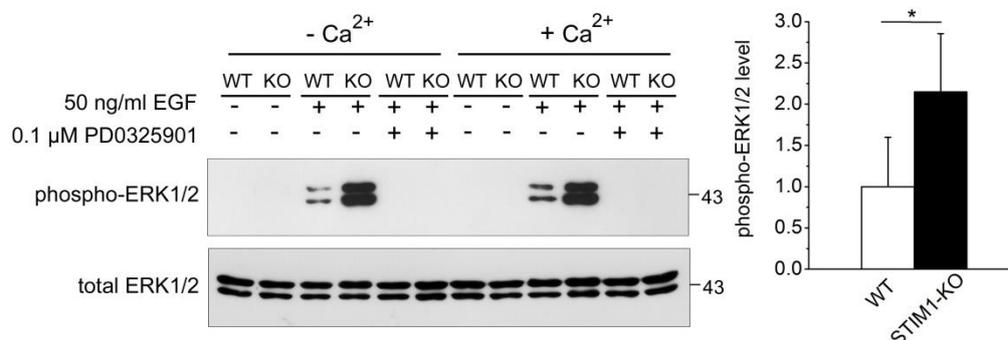


Figure II. ERK1/2 activation in STIM1-deficient cells. *Left: panel:* PC3 cells, either wild-type (WT), or STIM1-KO (KO) were FBS-starved for 12 h and subsequently treated with 50 ng/ml EGF in Ca²⁺-free HBSS (-Ca²⁺) or Ca²⁺-containing HBSS (+Ca²⁺). Lysates (20 μg protein/lane) were evaluated for the level of phospho-ERK1/2, using total ERK1/2 as loading control. PD0325901 (0.1 μM) was added to block ERK1/2

activation. *Right panel:* Quantification of ERK1/2 activation from 3 independent experiments, using immunoblots as in left panel. Data are presented as mean \pm s.d. (*) $p < 0.05$.

In addition to the activation of ERK1/2 in the absence of extracellular Ca^{2+} this result demonstrate that, in PC3 cells, the activation of ERK1/2 is STIM1- and SOCE-independent, but also that Ca^{2+} influx (through alternative pathways) is dispensable. Finally, we also demonstrate here that Raf-MEK-ERK is activated in a Src kinase-dependent manner, and that the specific pharmacological inhibition of the upstream kinase is enough to prevent ERK1/2 activation (figure III).

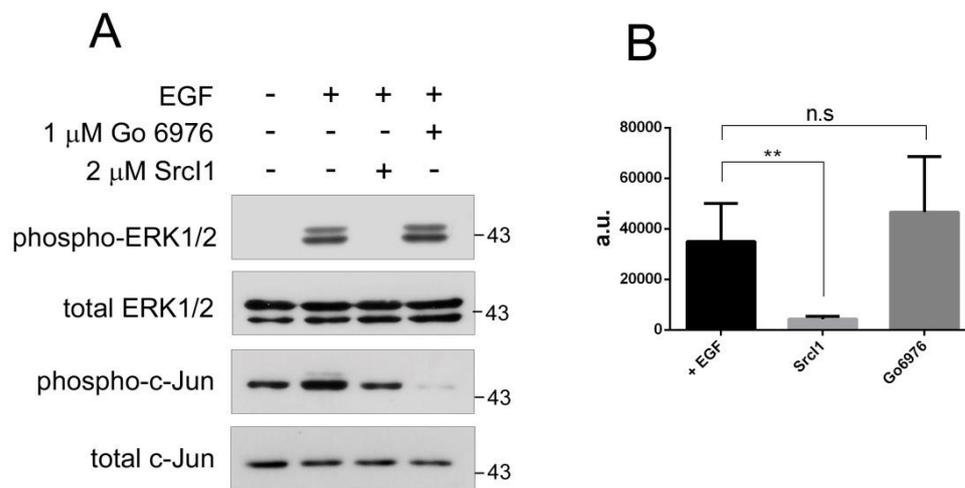


Figure III. Src kinase is an upstream activator of ERK1/2 in PC3 cells. *Panel A:* PC3 cells were starved for 12 h and then cells were treated with 50 ng/ml of EGF in Ca^{2+} -free HBSS. Go 6976 and Src11 were pre-incubated for 20 min before adding EGF to the cell cultures. Lysates (30 μg protein/lane) were assessed to evaluate the level of ERK1/2 activation (phospho-ERK1/2) using total ERK1/2 levels as loading control. Inhibition of c-Jun phosphorylation was evaluated as a control of PKC inhibition, using total c-Jun as a loading control. *Panel B:* Quantification of ERK1/2 activation from 3 independent experiments using immunoblots as in panel A. Statistical analysis was done using the unpaired t-test (**) $p < 0.001$ and (n.s.) $p > 0.05$.

The consequences of these observations are important because they set SOCE downstream ERK1/2, but not upstream Raf proteins. In conclusion, our results using STIM1-deficient cells, demonstrate that ERK1/2 activation is SOCE-independent and Src-dependent, pointing out the focus of a suitable pharmacological target on this kinase family when the control of ERK1/2 activity is required, but ruling out the participation of SOCE in the activation of ERK1/2.

3.2. Regulation of membrane ruffling by polarized STIM1 and ORAI1 in cortactin-rich domains.

The role of Ca^{2+} signaling on cell migration is a point of intense debate since the description of the two major components involved in Ca^{2+} entry in eukaryotic cells. However, the molecular nature of the regulators of this pathway is unknown. Therefore, we examined here the role of STIM1 and ORAI1 in the promotion of membrane ruffling.

As mentioned above, our group had shown that phosphorylation of STIM1 at ERK1/2 target sites regulates cell migration in an adenocarcinoma cell model (Ishikawa cells) (Casas-Rua et al., 2015). For this reason we decided to study the location of endogenous STIM1 phosphorylated at ERK1/2 target sites. Additionally, as cortactin (CTTN) is one of the best markers for the areas of membrane ruffling at the leading edge of migrating cells (Ammer and Weed, 2008; Weed and Parsons, 2001; Wu and Parsons, 1993), we decided to determine whether phospho-STIM1 was located close to CTTN-rich domains (figure IV). Our results pointed out a significant co-localization between phospho-STIM1 and CTTN suggesting a role of phospho-STIM1 at the leading edge of migrating cells.

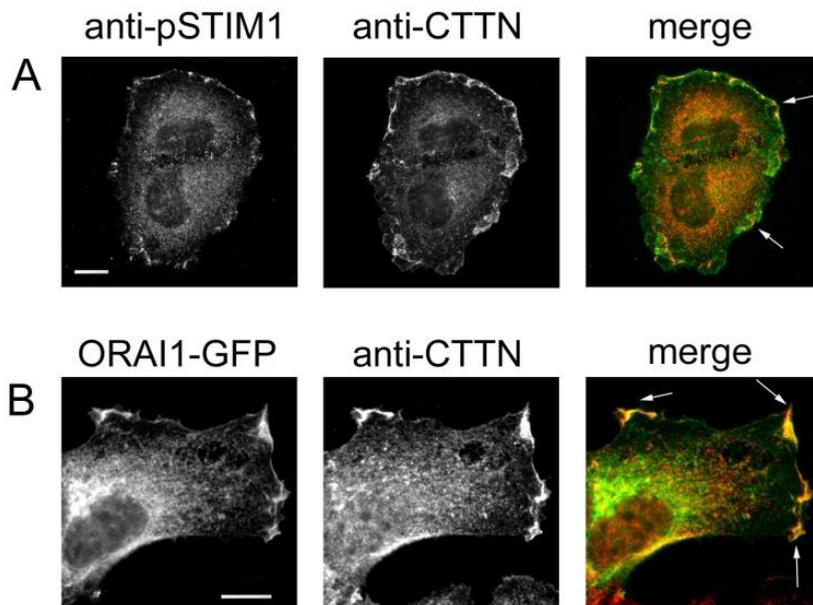


Figure IV: Co-localization of phospho-STIM1 or ORAI1-GFP and endogenous CTTN. U2OS cells were plated onto collagen-coated coverslips. Cells were stimulated with 50 ng/ml of EGF for 10 min after 8-10 h of FBS-deprivation in RPMI medium. *Panel A:* Immunolocalization of phospho-STIM1 was performed at one of the ERK1/2 target sites (pS575) using a phospho-specific antibody and anti-sheep IgG labelled with Alexa Fluor 594 as a secondary antibody. Cells were assessed for endogenous CTTN localization with a mouse

monoclonal anti-cortactin antibody and anti-mouse IgG labelled with Alexa Fluor 488. *Panel B*: U2OS cells were plated as in panel A, transfected for the transient expression of ORAI1-GFP and then stimulated as described in panel A. Cells were assessed for endogenous CTTN localization as performed in panel A. Images are representative of at least 5 independent experiments for both proteins. Bar = 10 μm .

Due to the fact that the most important effector of STIM1 is the plasma membrane Ca^{2+} channel ORAI1, we hypothesized that the leading edge of migrating cells would be enriched with ORAI1. Thus, we examined the location of ORAI1-GFP and endogenous CTTN and we found that ORAI1 and endogenous CTTN show a high level of co-localization in U2OS cells, which is further evidence for a high SOCE activity at these CTTN-rich sites.

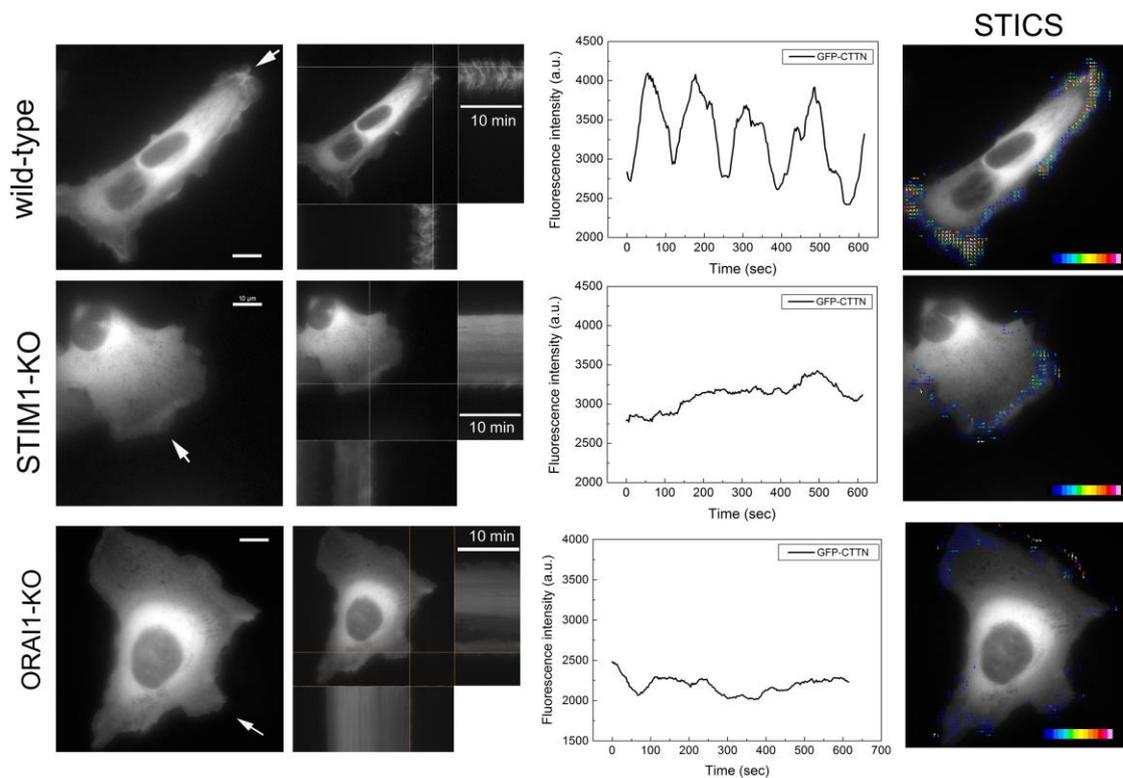


Figure V: Dynamics of plasma membrane ruffling in U2OS cells. Left panels: U2OS wild-type, STIM1-KO, ORAI1-KO cells were transfected for the transient expression of GFP-CTTN, and monitored for 10 min at 37°C (image acquisition every 3 sec). Assay medium was Leibovitz's L-15 + 10% FBS. Orthogonal projection of the areas marked shows the fluorescence intensity over the time (10 min) (kymograph). Central panels: GFP-CTTN fluorescence of the selected area indicated with arrows in left panels was evaluated to assess membrane ruffling. Right panels: STICS analysis is shown as overlaid vectors on a pseudocolor scale. The figure is representative for 32 recordings (WT and STIM1-KO) and 19 recordings for ORAI1-KO from at least 3 independent assays. Full time-lapse is given in the supplementary Movies: 1 (WT), 2 (STIM1-KO) and 4 (ORAI1-KO).

We therefore undertook the study of the influence of STIM1 and ORAI1 on the dynamics of membrane ruffling as a way to inquire into the role of SOCE in cell migration. For this purpose, we generated genetically modified U2OS cells to target STIM1 expression by gene knock-out (KO) using the CRISPR/Cas9 genome editing system. U2OS wild-type (wt) and STIM1-KO cells were transfected for the transient expression of GFP-CTTN to assess plasma membrane ruffling dynamics (figure V). In the same way, we decided to generate ORAI1-KO cells using the CRISPR/Cas9 system to examine the role of this channel in the cortical reorganization of the cytoskeleton by monitoring the fluorescence of GFP-CTTN, as we performed with U2OS wild-type and STIM1-KO (figure V). We also show the spatio-temporal image correlation spectroscopy (STICS) analysis to evaluate the direction and velocity of this ruffling, as performed elsewhere (Hartzell et al., 2016). The results show a striking reduction of the membrane ruffling in STIM1-KO and ORAI1-KO cells, compared with U2OS wild-type cells.

Although the molecular pathway for this Ca^{2+} influx may vary from one cell type to another, our findings demonstrate that STIM1-ORAI1 mediate this Ca^{2+} influx in membrane ruffling. In addition to the findings regarding the physical location of phospho-STIM1 and ORAI1 that circumscribes SOCE at a restricted site, the knock-out of *STIM1* and *ORAI1* genes reveals that both proteins are fully required for membrane ruffling, and that the impaired ruffling can be rescued by ectopic expression of STIM1 or ORAI1.

Finally, because the ruffling areas are highly dynamic, we were interested in monitoring ORAI1-CTTN dynamics at these sites with ORAI1-GFP/mCherry-CTTN double labeling and monitoring live cells for both tags to study whether the two proteins show a mutually-dependent movement in this area. Analysis of the GFP/mCherry fluorescence indicates that spiking of fluorescence is identical for both tags in the ruffling area, and therefore the ratio is preserved (figure VI, panel a). To study further the possible interaction between CTTN and ORAI1 we immunoprecipitated endogenous ORAI1 from U2OS cells and observed a specific co-immunoprecipitation of endogenous CTTN (figure VI, panel b).

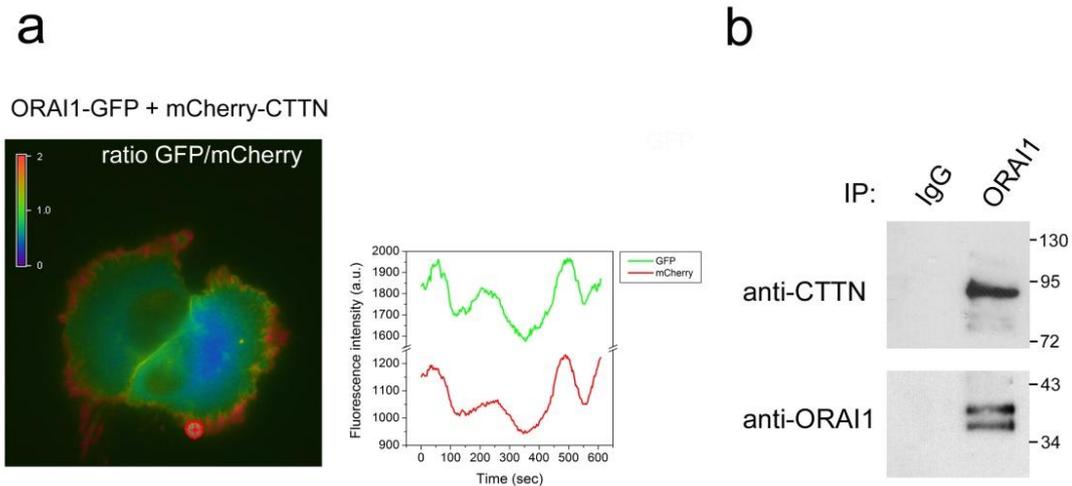


Figure VI. Co-localization and co-precipitation of ORAI1 and CTTN. *Panel A:* U2OS wild-type cells were transfected for the transient expression of ORAI1-GFP/mCherry-CTTN and monitored for both tags in Leibovitz's L-15 medium supplemented with 10% FBS. Emission of fluorescence was recorded every 3 sec for 10 min. The GFP/mCherry ratio was calculated and is shown on a pseudocolor scale (ratio values 0-2). A selected area was assessed for the variation of fluorescence intensity, shown in the line graph. The full time-lapse sequence is given in Supplementary Movie 6. *Panel B:* Endogenous ORAI1 was immunoprecipitated with an anti-ORAI1 antibody conjugated to agarose beads (lane 2). The level of immunoprecipitated ORAI1 was assessed with an anti-ORAI1 antibody (bottom panel), and the level of co-immunoprecipitated CTTN was evaluated with an anti-CTTN antibody (top panel). As a negative control, lysates from the same experimental conditions were incubated with pre-immune serum and agarose beads (lane 1). Blots are representative of 3 independent experiments with 3 different cultures.

The high value of the ratio between ORAI1-GFP and mCherry-CTTN fluorescence in live cells indicates that the two proteins strongly co-localize in migrating cells during the formation of protrusions. Moreover, the co-immunoprecipitation between ORAI1 and CTTN suggests that both proteins are found in the same macromolecular complex. A study of the mechanisms and regulation of this interaction lay beyond the objectives of the present work, but our results do open the possibility of studying the molecular mechanisms that regulate cell migration with the description of STIM1 and ORAI1 as new partners in this process. They also suggest that these two proteins act in cooperation with other regulators of the cytoskeleton such as CTTN, and possibly with other regulators of cell motility such as the small GTPase Rac1 due to its well-known role as activator of CTTN, something that needs further study. In this regard, the results shown in the last part of the present work suggest that CTTN might have a role regulating the polarized location of ORAI1 at the leading edge of migrating cells. We showed that in U2OS CTTN-KO cells, generated using the CRISPR/Cas9 system, ORAI1 shows a scattered distribution, in contrast to the polarized location of ORAI1 in wild-type cells. However, additional studies are required to elucidate the details of the molecular interaction between ORAI1 y CTTN, a topic currently being addressed by our research group.



Bibliografía

- Akervall, J. A., Jin, Y., Wennerberg, J. P., Zatterstrom, U. K., Kjellen, E., Mertens, F., Willen, R., Mandahl, N., Heim, S. and Mitelman, F.** (1995). Chromosomal abnormalities involving 11q13 are associated with poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* **76**, 853-9.
- Al Moustafa, A. E., Achkhar, A. and Yasmeen, A.** (2012). EGF-receptor signaling and epithelial-mesenchymal transition in human carcinomas. *Front Biosci (Schol Ed)* **4**, 671-84.
- Alavi, A., Hood, J. D., Frausto, R., Stupack, D. G. and Cheresh, D. A.** (2003). Role of Raf in vascular protection from distinct apoptotic stimuli. *Science* **301**, 94-6.
- Ambily, A., Kaiser, W. J., Pierro, C., Chamberlain, E. V., Li, Z., Jones, C. I., Kassouf, N., Gibbins, J. M. and Authi, K. S.** (2014). The role of plasma membrane STIM1 and Ca(2+)entry in platelet aggregation. STIM1 binds to novel proteins in human platelets. *Cell Signal* **26**, 502-11.
- Ambudkar, I. S.** (2007). TRPC1: a core component of store-operated calcium channels. *Biochem Soc Trans* **35**, 96-100.
- Ambudkar, I. S.** (2013). Polarization of calcium signaling and fluid secretion in salivary gland cells. *Curr Med Chem* **19**, 5774-81.
- Ambudkar, I. S. and Ong, H. L.** (2007). Organization and function of TRPC channelosomes. *Pflugers Arch* **455**, 187-200.
- Ammer, A. G. and Weed, S. A.** (2008). Cortactin branches out: roles in regulating protrusive actin dynamics. *Cell Motil Cytoskeleton* **65**, 687-707.
- Andrews, P. D., Ovechkina, Y., Morrice, N., Wagenbach, M., Duncan, K., Wordeman, L. and Swedlow, J. R.** (2004). Aurora B regulates MCAK at the mitotic centromere. *Dev Cell* **6**, 253-68.
- Artym, V. V., Zhang, Y., Seillier-Moiseiwitsch, F., Yamada, K. M. and Mueller, S. C.** (2006). Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function. *Cancer Res* **66**, 3034-43.
- Asanov, A., Sherry, R., Sampieri, A. and Vaca, L.** (2013). A relay mechanism between EB1 and APC facilitate STIM1 puncta assembly at endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions. *Cell Calcium* **54**, 246-56.
- Ayala, I., Baldassarre, M., Giacchetti, G., Caldieri, G., Tete, S., Luini, A. and Buccione, R.** (2008). Multiple regulatory inputs converge on cortactin to control invadopodia biogenesis and extracellular matrix degradation. *J Cell Sci* **121**, 369-78.
- Baba, Y., Hayashi, K., Fujii, Y., Mizushima, A., Watarai, H., Wakamori, M., Numaga, T., Mori, Y., Iino, M., Hikida, M. et al.** (2006). Coupling of STIM1 to store-operated Ca²⁺ entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 16704-9.
- Babcock, D. F., Herrington, J., Goodwin, P. C., Park, Y. B. and Hille, B.** (1997). Mitochondrial participation in the intracellular Ca²⁺ network. *J Cell Biol* **136**, 833-44.
- Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C. J., McLauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J. S., Alessi, D. R. and Cohen, P.** (2007). The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* **408**, 297-315.
- Bandyopadhyay, B. C., Swaim, W. D., Liu, X., Redman, R. S., Patterson, R. L. and Ambudkar, I. S.** (2005). Apical localization of a functional TRPC3/TRPC6-Ca²⁺-signaling complex in polarized epithelial cells. Role in apical Ca²⁺ influx. *J Biol Chem* **280**, 12908-16.
- Berridge, M. J.** (2014). Cell Signalling Biology.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D. and Roderick, H. L.** (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 517-29.
- Berridge, M. J., Lipp, P. and Bootman, M. D.** (2000). The versatility

and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 11-21.

Boyle, S. N., Michaud, G. A., Schweitzer, B., Predki, P. F. and Koleske, A. J. (2007). A critical role for cortactin phosphorylation by Abl-family kinases in PDGF-induced dorsal-wave formation. *Curr Biol* **17**, 445-51.

Bringuier, P. P., Tamimi, Y., Schuurin, E. and Schalken, J. (1996). Expression of cyclin D1 and EMS1 in bladder tumours; relationship with chromosome 11q13 amplification. *Oncogene* **12**, 1747-53.

Bruce, J. I., Giovannucci, D. R., Blinder, G., Shuttleworth, T. J. and Yule, D. I. (2004). Modulation of [Ca²⁺]_i signaling dynamics and metabolism by perinuclear mitochondria in mouse parotid acinar cells. *J Biol Chem* **279**, 12909-17.

Buhl, A. M., Osawa, S. and Johnson, G. L. (1995). Mitogen-activated protein kinase activation requires two signal inputs from the human anaphylatoxin C5a receptor. *J Biol Chem* **270**, 19828-32.

Cahalan, M. D. (2009). STIMulating store-operated Ca²⁺ entry. *Nat Cell Biol* **11**, 669-77.

Cai, J. H., Zhao, R., Zhu, J. W., Jin, X. L., Wan, F. J., Liu, K., Ji, X. P., Zhu, Y. B. and Zhu, Z. G. (2010). Expression of cortactin correlates with a poor prognosis in patients with stages II-III colorectal adenocarcinoma. *J Gastrointest Surg* **14**, 1248-57.

Campbell, D. H., deFazio, A., Sutherland, R. L. and Daly, R. J. (1996). Expression and tyrosine phosphorylation of EMS1 in human breast cancer cell lines. *Int J Cancer* **68**, 485-92.

Campbell, D. H., Sutherland, R. L. and Daly, R. J. (1999). Signaling pathways and structural domains required for phosphorylation of EMS1/cortactin. *Cancer Res* **59**, 5376-85.

Casas-Rua, V., Alvarez, I. S., Pozo-Guisado, E. and Martin-Romero, F. J. (2013). Inhibition of STIM1 phosphorylation underlies resveratrol-induced inhibition of store-operated

calcium entry. *Biochem Pharmacol* **86**, 1555-63.

Casas-Rua, V., Tomas-Martin, P., Lopez-Guerrero, A. M., Alvarez, I. S., Pozo-Guisado, E. and Martin-Romero, F. J. (2015). STIM1 phosphorylation triggered by epidermal growth factor mediates cell migration. *Biochim Biophys Acta* **1853**, 233-43.

Catterall, W. A. and Zheng, N. (2015). Deciphering voltage-gated Na⁺ and Ca²⁺ channels by studying prokaryotic ancestors. *Trends Biochem Sci* **40**, 526-34.

Clark, E. S., Whigham, A. S., Yarbrough, W. G. and Weaver, A. M. (2007). Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia. *Cancer Res* **67**, 4227-35.

Colbran, R. J., Schworer, C. M., Hashimoto, Y., Fong, Y. L., Rich, D. P., Smith, M. K. and Soderling, T. R. (1989). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J* **258**, 313-25.

Collins, H. E., Zhu-Mauldin, X., Marchase, R. B. and Chatham, J. C. (2013). STIM1/Orai1-mediated SOCE: current perspectives and potential roles in cardiac function and pathology. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **305**, H446-58.

Collins, S. R. and Meyer, T. (2011). Evolutionary origins of STIM1 and STIM2 within ancient Ca²⁺ signaling systems. *Trends Cell Biol* **21**, 202-11.

Crimaldi, L., Courtneidge, S. A. and Gimona, M. (2009). Tks5 recruits AFAP-110, p190RhoGAP, and cortactin for podosome formation. *Exp Cell Res* **315**, 2581-92.

Crostella, L., Lidder, S., Williams, R. and Skouteris, G. G. (2001). Hepatocyte Growth Factor/scatter factor-induces phosphorylation of cortactin in A431 cells in a Src kinase-independent manner. *Oncogene* **20**, 3735-45.

Croucher, D. R., Rickwood, D., Tactacan, C. M., Musgrove, E. A. and Daly, R. J. (2010). Cortactin modulates RhoA activation and expression of

Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors to promote cell cycle progression in 11q13-amplified head and neck squamous cell carcinoma cells. *Mol Cell Biol* **30**, 5057-70.

Chen, Y. F., Chiu, W. T., Chen, Y. T., Lin, P. Y., Huang, H. J., Chou, C. Y., Chang, H. C., Tang, M. J. and Shen, M. R. (2011). Calcium store sensor stromal-interaction molecule 1-dependent signaling plays an important role in cervical cancer growth, migration, and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 15225-30.

Chen, Y. T., Chen, Y. F., Chiu, W. T., Wang, Y. K., Chang, H. C. and Shen, M. R. (2013). The ER Ca(2+)(+) sensor STIM1 regulates actomyosin contractility of migratory cells. *J Cell Sci* **126**, 1260-7.

De Kimpe, L., Janssens, K., Derua, R., Armacki, M., Goicoechea, S., Otey, C., Waelkens, E., Vandoninck, S., Vandenheede, J. R., Seufferlein, T. et al. (2009). Characterization of cortactin as an in vivo protein kinase D substrate: interdependence of sites and potentiation by Src. *Cell Signal* **21**, 253-63.

Deb, B. K., Pathak, T. and Hasan, G. (2016). Store-independent modulation of Ca(2+) entry through Orai by Septin 7. *Nat Commun* **7**.

Derler, I., Jardin, I. and Romanin, C. (2016). Molecular mechanisms of STIM/Orai communication. *Am J Physiol Cell Physiol* **310**, C643-62.

Dionisio, N., Smani, T., Woodard, G. E., Castellano, A., Salido, G. M. and Rosado, J. A. (2015). Homer proteins mediate the interaction between STIM1 and Cav1.2 channels. *Biochim Biophys Acta* **1853**, 1145-53.

DiPolo, R. and Beauge, L. (2006). Sodium/calcium exchanger: influence of metabolic regulation on ion carrier interactions. *Physiol Rev* **86**, 155-203.

Eiseler, T., Hausser, A., De Kimpe, L., Van Lint, J. and Pfizenmaier, K. (2010). Protein kinase D controls actin polymerization and cell

motility through phosphorylation of cortactin. *J Biol Chem* **285**, 18672-83.

Espinosa-Tanguma, R., O'Neil, C., Chrones, T., Pickering, J. G. and Sims, S. M. Essential role for calcium waves in migration of human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **301**, H315-23.

Evans, J. H. and Falke, J. J. (2007). Ca²⁺ influx is an essential component of the positive-feedback loop that maintains leading-edge structure and activity in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 16176-81.

Fahrner, M., Muik, M., Schindl, R., Butorac, C., Stathopoulos, P., Zheng, L., Jardin, I., Ikura, M. and Romanin, C. (2014). A coiled-coil clamp controls both conformation and clustering of stromal interaction molecule 1 (STIM1). *J Biol Chem* **289**, 33231-44.

Faoro, L., Singleton, P. A., Cervantes, G. M., Lennon, F. E., Choong, N. W., Kanteti, R., Ferguson, B. D., Husain, A. N., Tretiakova, M. S., Ramnath, N. et al. (2010). EphA2 mutation in lung squamous cell carcinoma promotes increased cell survival, cell invasion, focal adhesions, and mammalian target of rapamycin activation. *J Biol Chem* **285**, 18575-85.

Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S. H., Tanasa, B., Hogan, P. G., Lewis, R. S., Daly, M. and Rao, A. (2006). A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* **441**, 179-85.

Franco, S. J., Rodgers, M. A., Perrin, B. J., Han, J., Bennin, D. A., Critchley, D. R. and Huttenlocher, A. (2004). Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nat Cell Biol* **6**, 977-83.

Frings, S. (1997). Cyclic nucleotide-gated channels and calcium: an intimate relation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **31**, 75-82.

Garcia-Castillo, J., Pedersen, K., Angelini, P. D., Bech-Serra, J. J., Colome, N., Cunningham, M. P., Parra-Palau, J. L., Canals, F., Baselga, J. and Arribas, J. (2009). HER2

carboxyl-terminal fragments regulate cell migration and cortactin phosphorylation. *J Biol Chem* **284**, 25302-13.

Ginnan, R., Pfleiderer, P. J., Pumiglia, K. and Singer, H. A. (2004). PKC-delta and CaMKII-delta 2 mediate ATP-dependent activation of ERK1/2 in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* **286**, C1281-9.

Grigoriev, I., Gouveia, S. M., van der Vaart, B., Demmers, J., Smyth, J. T., Honnappa, S., Splinter, D., Steinmetz, M. O., Putney, J. W., Jr., Hoogenraad, C. C. et al. (2008). STIM1 is a MT-plus-end-tracking protein involved in remodeling of the ER. *Curr Biol* **18**, 177-82.

Gudermann, T., Hofmann, T., Mederos y Schnitzler, M. and Dietrich, A. (2004). Activation, subunit composition and physiological relevance of DAG-sensitive TRPC proteins. *Novartis Found Symp* **258**, 103-18; discussion 118-22, 155-9, 263-6.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-80.

Hardy, T. A. and May, J. M. (2002). Coordinate regulation of L-arginine uptake and nitric oxide synthase activity in cultured endothelial cells. *Free Radic Biol Med* **32**, 122-31.

Hartzell, C. A., Jankowska, K. I., Burkhardt, J. K. and Lewis, R. S. (2016). Calcium influx through CRAC channels controls actin organization and dynamics at the immune synapse. *Elife* **5**.

Hebert, B., Costantino, S. and Wiseman, P. W. (2005). Spatiotemporal image correlation spectroscopy (STICS) theory, verification, and application to protein velocity mapping in living CHO cells. *Biophys J* **88**, 3601-14.

Helwani, F. M., Kovacs, E. M., Paterson, A. D., Verma, S., Ali, R. G., Fanning, A. S., Weed, S. A. and Yap, A. S. (2004). Cortactin is necessary for E-cadherin-mediated contact formation and actin reorganization. *J Cell Biol* **164**, 899-910.

Hogan, P. G. and Rao, A. (2015). Store-operated calcium entry: Mechanisms and modulation. *Biochem Biophys Res Commun* **460**, 40-9.

Holda, J. R. and Blatter, L. A. (1997). Capacitative calcium entry is inhibited in vascular endothelial cells by disruption of cytoskeletal microfilaments. *FEBS Lett* **403**, 191-6.

Hong, J. H., Li, Q., Kim, M. S., Shin, D. M., Feske, S., Birnbaumer, L., Cheng, K. T., Ambudkar, I. S. and Muallem, S. (2011). Polarized but differential localization and recruitment of STIM1, Orai1 and TRPC channels in secretory cells. *Traffic* **12**, 232-45.

Honnappa, S., Gouveia, S. M., Weisbrich, A., Damberger, F. F., Bhavesh, N. S., Jawhari, H., Grigoriev, I., van Rijssel, F. J., Buey, R. M., Lawera, A. et al. (2009). An EB1-binding motif acts as a microtubule tip localization signal. *Cell* **138**, 366-76.

Hoth, M. and Penner, R. (1992). Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* **355**, 353-6.

Hou, P., Estrada, L., Kinley, A. W., Parsons, J. T., Vojtek, A. B. and Gorski, J. L. (2003). Fgd1, the Cdc42 GEF responsible for Faciogenital Dysplasia, directly interacts with cortactin and mAbp1 to modulate cell shape. *Hum Mol Genet* **12**, 1981-93.

Hou, X., Pedi, L., Diver, M. M. and Long, S. B. (2012). Crystal structure of the calcium release-activated calcium channel Orai. *Science* **338**, 1308-13.

Huang, G. N., Zeng, W., Kim, J. Y., Yuan, J. P., Han, L., Muallem, S. and Worley, P. F. (2006). STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels. *Nat Cell Biol* **8**, 1003-10.

Huttenlocher, A., Palecek, S. P., Lu, Q., Zhang, W., Mellgren, R. L., Lauffenburger, D. A., Ginsberg, M. H. and Horwitz, A. F. (1997). Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease calpain. *J Biol Chem* **272**, 32719-22.

Kawasaki, T., Ueyama, T., Lange, I., Feske, S. and Saito, N. (2010). Protein kinase C-induced phosphorylation of Orai1 regulates the intracellular Ca²⁺ level via the store-operated Ca²⁺ channel. *J Biol Chem* **285**, 25720-30.

- Keil, J. M., Shen, Z., Briggs, S. P. and Patrick, G. N.** (2010). Regulation of STIM1 and SOCE by the ubiquitin-proteasome system (UPS). *PLoS One* **5**, e13465.
- Kelley, L. C., Hayes, K. E., Ammer, A. G., Martin, K. H. and Weed, S. A.** (2010). Cortactin phosphorylated by ERK1/2 localizes to sites of dynamic actin regulation and is required for carcinoma lamellipodia persistence. *PLoS One* **5**, e13847.
- Kelley, L. C., Hayes, K. E., Ammer, A. G., Martin, K. H. and Weed, S. A.** (2011). Revisiting the ERK/Src cortactin switch. *Commun Integr Biol* **4**, 205-7.
- Kumar, P., Lyle, K. S., Gierke, S., Matov, A., Danuser, G. and Wittmann, T.** (2009). GSK3beta phosphorylation modulates CLASP-microtubule association and lamella microtubule attachment. *J Cell Biol* **184**, 895-908.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Lai, Y. C., Kondapalli, C., Lehneck, R., Procter, J. B., Dill, B. D., Woodroof, H. I., Gourlay, R., Pegg, M., Macartney, T. J., Corti, O. et al.** (2015). Phosphoproteomic screening identifies Rab GTPases as novel downstream targets of PINK1. *EMBO J* **34**, 2840-61.
- Lee, J. E., Jeon, I. S., Han, N. E., Song, H. J., Kim, E. G., Choi, J. W., Song, K. D., Lee, H. K. and Choi, J. K.** (2013). Ubiquitin 1 interacts with Orai1 to regulate calcium mobilization. *Mol Cells* **35**, 41-6.
- Lewis, R. S.** (2011). Store-operated calcium channels: new perspectives on mechanism and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**.
- Li, Z., Lu, J., Xu, P., Xie, X., Chen, L. and Xu, T.** (2007). Mapping the interacting domains of STIM1 and Orai1 in Ca(2+) release-activated Ca(2+) channel activation. *J Biol Chem* **282**, 29448-56.
- Liou, J., Fivaz, M., Inoue, T. and Meyer, T.** (2007). Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after Ca2+ store depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 9301-6.
- Liou, J., Kim, M. L., Heo, W. D., Jones, J. T., Myers, J. W., Ferrell, J. E., Jr. and Meyer, T.** (2005). STIM is a Ca(2+) sensor essential for Ca(2+)-store-depletion-triggered Ca(2+) influx. *Curr Biol* **15**, 1235-41.
- Luik, R. M., Wu, M. M., Buchanan, J. and Lewis, R. S.** (2006). The elementary unit of store-operated Ca2+ entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions. *J Cell Biol* **174**, 815-25.
- Luo, C., Pan, H., Mines, M., Watson, K., Zhang, J. and Fan, G. H.** (2006). CXCL12 induces tyrosine phosphorylation of cortactin, which plays a role in CXC chemokine receptor 4-mediated extracellular signal-regulated kinase activation and chemotaxis. *J Biol Chem* **281**, 30081-93.
- Lytton, J., Westlin, M. and Hanley, M. R.** (1991). Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J Biol Chem* **266**, 17067-71.
- Ma, G., Wei, M., He, L., Liu, C., Wu, B., Zhang, S. L., Jing, J., Liang, X., Senes, A., Tan, P. et al.** (2015). Inside-out Ca(2+) signalling prompted by STIM1 conformational switch. *Nat Commun* **6**, 7826.
- MacLennan, D. H. and Green, N. M.** (2000). Structural biology. Pumping ions. *Nature* **405**, 633-4.
- Madden, D. R.** (2002). The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat Rev Neurosci* **3**, 91-101.
- Madl, J., Weghuber, J., Fritsch, R., Derler, I., Fahrner, M., Frischauf, I., Lackner, B., Romanin, C. and Schutz, G. J.** (2010). Resting state Orai1 diffuses as homotetramer in the plasma membrane of live mammalian cells. *J Biol Chem* **285**, 41135-42.
- Manji, S. S., Parker, N. J., Williams, R. T., van Stekelenburg, L., Pearson, R. B., Dziadek, M. and Smith, P. J.** (2000). STIM1: a novel

phosphoprotein located at the cell surface. *Biochim Biophys Acta* **1481**, 147-55.

Martinez-Quiles, N. (2013). Emerging roles of haematopoietic lineage cell-specific protein 1 in the immune system (HS1) in the immune system. *Molecular and structural Immunology* **1(1):2**.

Martinez-Quiles, N., Ho, H. Y., Kirschner, M. W., Ramesh, N. and Geha, R. S. (2004). Erk/Src phosphorylation of cortactin acts as a switch on-switch off mechanism that controls its ability to activate N-WASP. *Mol Cell Biol* **24**, 5269-80.

Matthews, G., Neher, E. and Penner, R. (1989). Second messenger-activated calcium influx in rat peritoneal mast cells. *J Physiol* **418**, 105-30.

McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Wong, E. W., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D. M., Milella, M., Tafuri, A. et al. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1263-84.

McNally, B. A., Somasundaram, A., Yamashita, M. and Prakriya, M. (2012). Gated regulation of CRAC channel ion selectivity by STIM1. *Nature* **482**, 241-5.

Mezi, S., Todi, L., Orsi, E., Angeloni, A. and Mancini, P. (2012). Involvement of the Src-cortactin pathway in migration induced by IGF-1 and EGF in human breast cancer cells. *Int J Oncol* **41**, 2128-38.

Mignen, O., Thompson, J. L. and Shuttleworth, T. J. (2008). Orai1 subunit stoichiometry of the mammalian CRAC channel pore. *J Physiol* **586**, 419-25.

Mitra, S. K., Hanson, D. A. and Schlaepfer, D. D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 56-68.

Mostowy, S. and Cossart, P. (2012). Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 183-94.

Motiani, R. K., Hyzinski-Garcia, M. C., Zhang, X., Henkel, M. M.,

Abdullaev, I. F., Kuo, Y. H., Matrougui, K., Mongin, A. A. and Trebak, M. (2013). STIM1 and Orai1 mediate CRAC channel activity and are essential for human glioblastoma invasion. *Pflugers Arch* **465**, 1249-1260.

Muik, M., Fahrner, M., Schindl, R., Stathopoulos, P., Frischauf, I., Derler, I., Plenk, P., Lackner, B., Groschner, K., Ikura, M. et al. (2011). STIM1 couples to ORAI1 via an intramolecular transition into an extended conformation. *EMBO J* **30**, 1678-89.

Muik, M., Frischauf, I., Derler, I., Fahrner, M., Bergsmann, J., Eder, P., Schindl, R., Hesch, C., Polzinger, B., Fritsch, R. et al. (2008). Dynamic coupling of the putative coiled-coil domain of ORAI1 with STIM1 mediates ORAI1 channel activation. *J Biol Chem* **283**, 8014-22.

Mullins, F. M., Park, C. Y., Dolmetsch, R. E. and Lewis, R. S. (2009). STIM1 and calmodulin interact with Orai1 to induce Ca²⁺-dependent inactivation of CRAC channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 15495-500.

Munoz, I. M., Szyniarowski, P., Toth, R., Rouse, J. and Lachaud, C. (2014). Improved genome editing in human cell lines using the CRISPR method. *PLoS One* **9**, e109752.

Nathke, I. S. (2004). The adenomatous polyposis coli protein: the Achilles heel of the gut epithelium. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 337-66.

Ohoka, Y. and Takai, Y. (1998). Isolation and characterization of cortactin isoforms and a novel cortactin-binding protein, CBP90. *Genes Cells* **3**, 603-12.

Oka, T., Hori, M. and Ozaki, H. (2005). Microtubule disruption suppresses allergic response through the inhibition of calcium influx in the mast cell degranulation pathway. *J Immunol* **174**, 4584-9.

Ong, H. L., Cheng, K. T., Liu, X., Bandyopadhyay, B. C., Paria, B. C., Soboloff, J., Pani, B., Gwack, Y., Srikanth, S., Singh, B. B. et al. (2007). Dynamic assembly of TRPC1-STIM1-Orai1 ternary complex is involved in store-operated calcium influx. Evidence

for similarities in store-operated and calcium release-activated calcium channel components. *J Biol Chem* **282**, 9105-16.

Oser, M., Mader, C. C., Gil-Henn, H., Magalhaes, M., Bravo-Cordero, J. J., Koleske, A. J. and Condeelis, J. (2010). Specific tyrosine phosphorylation sites on cortactin regulate Nck1-dependent actin polymerization in invadopodia. *J Cell Sci* **123**, 3662-73.

Park, C. Y., Hoover, P. J., Mullins, F. M., Bachhawat, P., Covington, E. D., Raunser, S., Walz, T., Garcia, K. C., Dolmetsch, R. E. and Lewis, R. S. (2009). STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell* **136**, 876-90.

Park, C. Y., Shcheglovitov, A. and Dolmetsch, R. (2010). The CRAC channel activator STIM1 binds and inhibits L-type voltage-gated calcium channels. *Science* **330**, 101-5.

Penna, A., Demuro, A., Yeromin, A. V., Zhang, S. L., Safrina, O., Parker, I. and Cahalan, M. D. (2008). The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers. *Nature* **456**, 116-20.

Penner, R., Matthews, G. and Neher, E. (1988). Regulation of calcium influx by second messengers in rat mast cells. *Nature* **334**, 499-504.

Perrin, B. J., Amann, K. J. and Huttenlocher, A. (2006). Proteolysis of cortactin by calpain regulates membrane protrusion during cell migration. *Mol Biol Cell* **17**, 239-50.

Porat-Shliom, N., Milberg, O., Masedunskas, A. and Weigert, R. (2013). Multiple roles for the actin cytoskeleton during regulated exocytosis. *Cell Mol Life Sci* **70**, 2099-121.

Pozo-Guisado, E., Campbell, D. G., Deak, M., Alvarez-Barrientos, A., Morrice, N. A., Alvarez, I. S., Alessi, D. R. and Martin-Romero, F. J. (2010). Phosphorylation of STIM1 at ERK1/2 target sites modulates store-operated calcium entry. *J Cell Sci* **123**, 3084-93.

Pozo-Guisado, E., Casas-Rua, V., Tomas-Martin, P., Lopez-Guerrero, A. M., Alvarez-Barrientos, A. and Martin-Romero, F. J. (2013). Phosphorylation of STIM1 at ERK1/2 target sites regulates interaction with the microtubule plus-end binding protein EB1. *J Cell Sci* **126**, 3170-80.

Pozo-Guisado, E. and Martin-Romero, F. J. (2013). The regulation of STIM1 by phosphorylation. *Commun Integr Biol* **6**, e26283.

Prakriya, M., Feske, S., Gwack, Y., Srikanth, S., Rao, A. and Hogan, P. G. (2006). Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature* **443**, 230-3.

Prakriya, M. and Lewis, R. S. (2015). Store-Operated Calcium Channels. *Physiol Rev* **95**, 1383-436.

Prevarskaya, N., Skryma, R. and Shuba, Y. (2011). Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors. *Nat Rev Cancer* **11**, 609-18.

Putney, J. W. (2009). Capacitative calcium entry: from concept to molecules. *Immunol Rev* **231**, 10-22.

Putney, J. W., Jr. (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* **7**, 1-12.

Ran, F. A., Hsu, P. D., Lin, C. Y., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Trevino, A. E., Scott, D. A., Inoue, A., Matoba, S., Zhang, Y. et al. (2013). Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* **154**, 1380-9.

Redondo, P. C., Harper, A. G., Sage, S. O. and Rosado, J. A. (2007). Dual role of tubulin-cytoskeleton in store-operated calcium entry in human platelets. *Cell Signal* **19**, 2147-54.

Ren, G., Crampton, M. S. and Yap, A. S. (2009a). Cortactin: Coordinating adhesion and the actin cytoskeleton at cellular protrusions. *Cell Motil Cytoskeleton* **66**, 865-73.

Ren, G., Helwani, F. M., Verma, S., McLachlan, R. W., Weed, S. A. and Yap, A. S. (2009b). Cortactin is a functional target of E-cadherin-activated Src family kinases in MCF7 epithelial monolayers. *J Biol Chem* **284**, 18913-22.

- Rey, M., Irondelle, M., Waharte, F., Lizarraga, F. and Chavrier, P.** (2011). HDAC6 is required for invadopodia activity and invasion by breast tumor cells. *Eur J Cell Biol* **90**, 128-35.
- Ribeiro, C. M., Reece, J. and Putney, J. W., Jr.** (1997). Role of the cytoskeleton in calcium signaling in NIH 3T3 cells. An intact cytoskeleton is required for agonist-induced $[Ca^{2+}]_i$ signaling, but not for capacitative calcium entry. *J Biol Chem* **272**, 26555-61.
- Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., Parsons, J. T. and Horwitz, A. R.** (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* **302**, 1704-9.
- Roberts, P. J. and Der, C. J.** (2007). Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* **26**, 3291-310.
- Rodriguez, O. C., Schaefer, A. W., Mandato, C. A., Forscher, P., Bement, W. M. and Waterman-Storer, C. M.** (2003). Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nat Cell Biol* **5**, 599-609.
- Rojas-Fernandez, A., Herhaus, L., Macartney, T., Lachaud, C., Hay, R. T. and Sapkota, G. P.** (2015). Rapid generation of endogenously driven transcriptional reporters in cells through CRISPR/Cas9. *Sci Rep* **5**, 9811.
- Roos, J., DiGregorio, P. J., Yeromin, A. V., Ohlsen, K., Lioudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J. A., Wagner, S. L., Cahalan, M. D. et al.** (2005). STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca^{2+} channel function. *J Cell Biol* **169**, 435-45.
- Rosado, J. A., Jenner, S. and Sage, S. O.** (2000). A role for the actin cytoskeleton in the initiation and maintenance of store-mediated calcium entry in human platelets. Evidence for conformational coupling. *J Biol Chem* **275**, 7527-33.
- Rosado, J. A. and Sage, S. O.** (2000). Farnesylcysteine analogues inhibit store-regulated Ca^{2+} entry in human platelets: evidence for involvement of small GTP-binding proteins and actin cytoskeleton. *Biochem J* **347 Pt 1**, 183-92.
- Rosado, J. A. and Sage, S. O.** (2001). Role of the ERK pathway in the activation of store-mediated calcium entry in human platelets. *J Biol Chem* **276**, 15659-65.
- Russa, A. D., Ishikita, N., Masu, K., Akutsu, H., Saino, T. and Satoh, Y.** (2008). Microtubule remodeling mediates the inhibition of store-operated calcium entry (SOCE) during mitosis in COS-7 cells. *Arch Histol Cytol* **71**, 249-63.
- Sampieri, A., Zepeda, A., Asanov, A. and Vaca, L.** (2009). Visualizing the store-operated channel complex assembly in real time: identification of SERCA2 as a new member. *Cell Calcium* **45**, 439-46.
- Sangrar, W., Gao, Y., Scott, M., Truesdell, P. and Greer, P. A.** (2007). Fer-mediated cortactin phosphorylation is associated with efficient fibroblast migration and is dependent on reactive oxygen species generation during integrin-mediated cell adhesion. *Mol Cell Biol* **27**, 6140-52.
- Saraiva, N., Prole, D. L., Carrara, G., Johnson, B. F., Taylor, C. W., Parsons, M. and Smith, G. L.** (2013). hGAAP promotes cell adhesion and migration via the stimulation of store-operated Ca^{2+} entry and calpain 2. *J Cell Biol* **202**, 699-713.
- Sharma, S., Quintana, A., Findlay, G. M., Mettlen, M., Baust, B., Jain, M., Nilsson, R., Rao, A. and Hogan, P. G.** (2013). An siRNA screen for NFAT activation identifies septins as coordinators of store-operated Ca^{2+} entry. *Nature* **499**, 238-42.
- Shuttleworth, T. J.** (2012). Orai3--the 'exceptional' Orai? *J Physiol* **590**, 241-57.
- Smith-Pearson, P. S., Greuber, E. K., Yogalingam, G. and Pendergast, A. M.** (2010). Abl kinases are required for invadopodia formation and chemokine-induced invasion. *J Biol Chem* **285**, 40201-11.

- Smyth, J. T., DeHaven, W. I., Bird, G. S. and Putney, J. W., Jr.** (2007). Role of the microtubule cytoskeleton in the function of the store-operated Ca²⁺ channel activator STIM1. *J Cell Sci* **120**, 3762-71.
- Smyth, J. T., Hwang, S. Y., Tomita, T., DeHaven, W. I., Mercer, J. C. and Putney, J. W.** (2010). Activation and regulation of store-operated calcium entry. *J Cell Mol Med* **14**, 2337-49.
- Smyth, J. T., Petranka, J. G., Boyles, R. R., DeHaven, W. I., Fukushima, M., Johnson, K. L., Williams, J. G. and Putney, J. W., Jr.** (2009). Phosphorylation of STIM1 underlies suppression of store-operated calcium entry during mitosis. *Nat Cell Biol* **11**, 1465-72.
- Soboloff, J., Rothberg, B. S., Madesh, M. and Gill, D. L.** (2012). STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 549-65.
- Soboloff, J., Spassova, M. A., Hewavitharana, T., He, L. P., Xu, W., Johnstone, L. S., Dziadek, M. A. and Gill, D. L.** (2006a). STIM2 is an inhibitor of STIM1-mediated store-operated Ca(2+) Entry. *Curr Biol* **16**, 1465-70.
- Soboloff, J., Spassova, M. A., Tang, X. D., Hewavitharana, T., Xu, W. and Gill, D. L.** (2006b). Orai1 and STIM1 reconstitute store-operated calcium channel function. *J Biol Chem* **281**, 20661-5.
- Soltoff, S. P. and Lannon, W. A.** (2013). Activation of ERK1/2 by store-operated calcium entry in rat parotid acinar cells. *PLoS One* **8**, e72881.
- Srikanth, S., Jung, H. J., Ribalet, B. and Gwack, Y.** (2010). The intracellular loop of Orai1 plays a central role in fast inactivation of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels. *J Biol Chem* **285**, 5066-75.
- Stathopoulos, P. B., Schindl, R., Fahrner, M., Zheng, L., Gasmi-Seabrook, G. M., Muik, M., Romanin, C. and Ikura, M.** (2013). STIM1/Orai1 coiled-coil interplay in the regulation of store-operated calcium entry. *Nat Commun* **4**, 2963.
- Steelman, L. S., Pohnert, S. C., Shelton, J. G., Franklin, R. A., Bertrand, F. E. and McCubrey, J. A.** (2004). JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* **18**, 189-218.
- Stokoe, D. and McCormick, F.** (1997). Activation of c-Raf-1 by Ras and Src through different mechanisms: activation in vivo and in vitro. *EMBO J* **16**, 2384-96.
- Suganuma, N., Ito, S., Aso, H., Kondo, M., Sato, M., Sokabe, M. and Hasegawa, Y.** (2012). STIM1 regulates platelet-derived growth factor-induced migration and Ca²⁺ influx in human airway smooth muscle cells. *PLoS One* **7**, e45056.
- Sun, J., Lu, F., He, H., Shen, J., Messina, J., Mathew, R., Wang, D., Sarnaik, A. A., Chang, W. C., Kim, M. et al.** (2014). STIM1- and Orai1-mediated Ca(2+) oscillation orchestrates invadopodium formation and melanoma invasion. *J Cell Biol* **207**, 535-48.
- Sung, B. H., Zhu, X., Kaverina, I. and Weaver, A. M.** (2011). Cortactin controls cell motility and lamellipodial dynamics by regulating ECM secretion. *Curr Biol* **21**, 1460-9.
- Taberner, F. J., Fernandez-Ballester, G., Fernandez-Carvajal, A. and Ferrer-Montiel, A.** (2015). TRP channels interaction with lipids and its implications in disease. *Biochim Biophys Acta* **1848**, 1818-27.
- Tehrani, S., Tomasevic, N., Weed, S., Sakowicz, R. and Cooper, J. A.** (2007). Src phosphorylation of cortactin enhances actin assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 11933-8.
- Thastrup, O., Cullen, P. J., Drobak, B. K., Hanley, M. R. and Dawson, A. P.** (1990). Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca(2+) stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 2466-70.
- Thomas, A. P. and Delaville, F.** (1991). The use of fluorescent indicators for measurements of cytosolic-free calcium concentration in cell population and single cells. In *Cellular calcium*, (eds J. G. McCormack and P. H. Cobbold), pp. 1-54. Oxford, UK: IRL Press.

- Tokumitsu, H., Chijiwa, T., Hagiwara, M., Mizutani, A., Terasawa, M. and Hidaka, H.** (1990). KN-62, 1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine, a specific inhibitor of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* **265**, 4315-20.
- Tomás-Martín, P.** (2016). Implicaciones de la fosforilación de STIM1 mediada por ERK1/2: Control de rutas de señalización y migración celular. In *Bioquímica, Biología Molecular y Genética* pp. 157. Badajoz: Universidad de Extremadura.
- Tomas-Martin, P., Lopez-Guerrero, A. M., Casas-Rua, V., Pozo-Guisado, E. and Martin-Romero, F. J.** (2015). Phospho-STIM1 is a downstream effector that mediates the signaling triggered by IGF-1 in HEK293 cells. *Cell Signal* **27**, 545-54.
- Tsai, F. C., Seki, A., Yang, H. W., Hayer, A., Carrasco, S., Malmersjo, S. and Meyer, T.** (2014). A polarized Ca²⁺, diacylglycerol and STIM1 signalling system regulates directed cell migration. *Nat Cell Biol* **16**, 133-44.
- Ueda, Y., Hirai, S., Osada, S., Suzuki, A., Mizuno, K. and Ohno, S.** (1996). Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *J Biol Chem* **271**, 23512-9.
- Umemura, M., Baljinyam, E., Feske, S., De Lorenzo, M. S., Xie, L. H., Feng, X., Oda, K., Makino, A., Fujita, T., Yokoyama, U. et al.** (2014). Store-Operated Ca²⁺ Entry (SOCE) Regulates Melanoma Proliferation and Cell Migration. *PLoS One* **9**, e89292.
- van Rossum, A. G., de Graaf, J. H., Schuurin-Scholtes, E., Kluin, P. M., Fan, Y. X., Zhan, X., Moolenaar, W. H. and Schuurin, E.** (2003). Alternative splicing of the actin binding domain of human cortactin affects cell migration. *J Biol Chem* **278**, 45672-9.
- Vial, C., Roberts, J. A. and Evans, R. J.** (2004). Molecular properties of ATP-gated P2X receptor ion channels. *Trends Pharmacol Sci* **25**, 487-93.
- Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R. S. and Horwitz, A. R.** (2009). Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 778-90.
- Vig, M., Peinelt, C., Beck, A., Koomoa, D. L., Rabah, D., Koblan-Huberson, M., Kraft, S., Turner, H., Fleig, A., Penner, R. et al.** (2006). CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca²⁺ entry. *Science* **312**, 1220-3.
- Vlietstra, R. J., van Alewijk, D. C., Hermans, K. G., van Steenbrugge, G. J. and Trapman, J.** (1998). Frequent inactivation of PTEN in prostate cancer cell lines and xenografts. *Cancer Res* **58**, 2720-3.
- Vuori, K. and Ruoslahti, E.** (1995). Tyrosine phosphorylation of p130Cas and cortactin accompanies integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix. *J Biol Chem* **270**, 22259-62.
- Wang, X., Wang, Y., Zhou, Y., Hendron, E., Mancarella, S., Andrade, M. D., Rothberg, B. S., Soboloff, J. and Gill, D. L.** (2014). Distinct Orai-coupling domains in STIM1 and STIM2 define the Orai-activating site. *Nat Commun* **5**, 3183.
- Wang, X. T., McCullough, K. D., Wang, X. J., Carpenter, G. and Holbrook, N. J.** (2001). Oxidative stress-induced phospholipase C-gamma 1 activation enhances cell survival. *J Biol Chem* **276**, 28364-71.
- Wang, Y., Deng, X., Mancarella, S., Hendron, E., Eguchi, S., Soboloff, J., Tang, X. D. and Gill, D. L.** (2010). The calcium store sensor, STIM1, reciprocally controls Orai and CaV1.2 channels. *Science* **330**, 105-9.
- Watanabe, T., Noritake, J., Kakeno, M., Matsui, T., Harada, T., Wang, S., Itoh, N., Sato, K., Matsuzawa, K., Iwamatsu, A. et al.** (2009). Phosphorylation of CLASP2 by GSK-3beta regulates its interaction with IQGAP1, EB1 and microtubules. *J Cell Sci* **122**, 2969-79.
- Weaver, A. M.** (2006). Invadopodia: specialized cell structures

for cancer invasion. *Clin Exp Metastasis* **23**, 97-105.

Webb, B. A., Jia, L., Eves, R. and Mak, A. S. (2007). Dissecting the functional domain requirements of cortactin in invadopodia formation. *Eur J Cell Biol* **86**, 189-206.

Webb, B. A., Zhou, S., Eves, R., Shen, L., Jia, L. and Mak, A. S. (2006). Phosphorylation of cortactin by p21-activated kinase. *Arch Biochem Biophys* **456**, 183-93.

Weed, S. A. and Parsons, J. T. (2001). Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly. *Oncogene* **20**, 6418-34.

Welch, M. D. and Mullins, R. D. (2002). Cellular control of actin nucleation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**, 247-88.

Wheal, B. D., Beach, R. J., Tanabe, N., Dixon, S. J. and Sims, S. M. (2013). Subcellular elevation of cytosolic free calcium is required for osteoclast migration. *J Bone Miner Res* **29**, 725-34.

Wu, H. and Parsons, J. T. (1993). Cortactin, an 80/85-kilodalton pp60src substrate, is a filamentous actin-binding protein enriched in the cell cortex. *J Cell Biol* **120**, 1417-26.

Xu, J. M., Zhou, Y., Gao, L., Zhou, S. X., Liu, W. H. and Li, X. A. (2016). Stromal interaction molecule 1 plays an important role in gastric cancer progression. *Oncol Rep* **35**, 3496-504.

Xu, X. Z., Garcia, M. V., Li, T. Y., Khor, L. Y., Gajapathy, R. S., Spittle, C., Weed, S., Lessin, S. R. and Wu, H. (2010). Cytoskeleton alterations in melanoma: aberrant expression of cortactin, an actin-binding adapter protein, correlates with melanocytic tumor progression. *Mod Pathol* **23**, 187-96.

Yamada, K. M. and Araki, M. (2001). Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *J Cell Sci* **114**, 2375-82.

Yang, I. H., Tsai, Y. T., Chiu, S. J., Liu, L. T., Lee, H. H., Hou, M. F., Hsu, W. L., Chen, B. K. and Chang, W. C. (2013). Involvement of STIM1 and Orai1 in EGF-mediated cell growth in

retinal pigment epithelial cells. *J Biomed Sci* **20**, 41.

Yang, S., Zhang, J. J. and Huang, X. Y. (2009). Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis. *Cancer Cell* **15**, 124-34.

Yang, X., Jin, H., Cai, X., Li, S. and Shen, Y. (2012). Structural and mechanistic insights into the activation of Stromal interaction molecule 1 (STIM1). *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 5657-62.

Yazbeck, P., Tauseef, M., Kruse, K., Amin, M. R., Sheikh, R., Feske, S., Komarova, Y. and Mehta, D. (2017). STIM1 Phosphorylation at Y361 Recruits Orai1 to STIM1 Puncta and Induces Ca²⁺ Entry. *Sci Rep* **7**, 42758.

Yoon, S. and Seger, R. (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* **24**, 21-44.

Yoshida, J., Iwabuchi, K., Matsui, T., Ishibashi, T., Masuoka, T. and Nishio, M. (2012). Knockdown of stromal interaction molecule 1 (STIM1) suppresses store-operated calcium entry, cell proliferation and tumorigenicity in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Biochem Pharmacol* **84**, 1592-603.

Yu, F., Sun, L. and Machaca, K. (2009). Orai1 internalization and STIM1 clustering inhibition modulate SOCE inactivation during meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 17401-6.

Yuan, J. P., Lee, K. P., Hong, J. H. and Muallem, S. (2012). The closing and opening of TRPC channels by Homer1 and STIM1. *Acta Physiol (Oxf)* **204**, 238-47.

Yuan, J. P., Zeng, W., Dorwart, M. R., Choi, Y. J., Worley, P. F. and Muallem, S. (2009). SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels. *Nat Cell Biol* **11**, 337-43.

Yuan, J. P., Zeng, W., Huang, G. N., Worley, P. F. and Muallem, S. (2007). STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nat Cell Biol* **9**, 636-45.

- Yule, D. I.** (2001). Subtype-specific regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: controlling calcium signals in time and space. *J Gen Physiol* **117**, 431-4.
- Zhang, S. L., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J. A., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Stauderman, K. A. and Cahalan, M. D.** (2005). STIM1 is a Ca(2+) sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca(2+) store to the plasma membrane. *Nature* **437**, 902-5.
- Zhang, X., Shrikhande, U., Alicie, B. M., Zhou, Q. and Geahlen, R. L.** (2009). Role of the protein tyrosine kinase Syk in regulating cell-cell adhesion and motility in breast cancer cells. *Mol Cancer Res* **7**, 634-44.
- Zhang, X., Yuan, Z., Zhang, Y., Yong, S., Salas-Burgos, A., Koomen, J., Olashaw, N., Parsons, J. T., Yang, X. J., Dent, S. R. et al.** (2007). HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin. *Mol Cell* **27**, 197-213.
- Zheng, L., Stathopoulos, P. B., Li, G. Y. and Ikura, M.** (2008). Biophysical characterization of the EF-hand and SAM domain containing Ca²⁺ sensory region of STIM1 and STIM2. *Biochem Biophys Res Commun* **369**, 240-6.
- Zheng, L., Stathopoulos, P. B., Schindl, R., Li, G. Y., Romanin, C. and Ikura, M.** (2011). Auto-inhibitory role of the EF-SAM domain of STIM proteins in store-operated calcium entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 1337-42.
- Zhong, W., Chebolu, S. and Darmani, N. A.** (2015). Thapsigargin-induced activation of Ca(2+)-CaMKII-ERK in brainstem contributes to substance P release and induction of emesis in the least shrew. *Neuropharmacology* **103**, 195-210.
- Zhou, Y., Srinivasan, P., Razavi, S., Seymour, S., Meraner, P., Gudlur, A., Stathopoulos, P. B., Ikura, M., Rao, A. and Hogan, P. G.** (2013). Initial activation of STIM1, the regulator of store-operated calcium entry. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 973-81.
- Zhu, J., Yu, D., Zeng, X. C., Zhou, K. and Zhan, X.** (2007). Receptor-mediated endocytosis involves tyrosine phosphorylation of cortactin. *J Biol Chem* **282**, 16086-94.
- Zumbrunn, J., Kinoshita, K., Hyman, A. A. and Nathke, I. S.** (2001). Binding of the adenomatous polyposis coli protein to microtubules increases microtubule stability and is regulated by GSK3 beta phosphorylation. *Curr Biol* **11**, 44-9.

Anexo 1

ANEXO 1. Relación de construcciones utilizadas en este estudio.

Construcción	Proteína	Especie	Genebank	Plásmido parental	Enzimas de restricción
pCMV-Flag-Empty	-	-	-	pCMV-Flag1	-
pEGFP-Empty	-	-	-	pEGFP-N1	-
pCMV-Flag-STIM1	Flag-STIM1	Mouse	NM_009287	pCMV-Flag1	BamHI/NotI
pmCherry-STIM1	mCherry-STIM1	Mouse	NM_009287	pmCherry-N1	XhoI/BamHI
pEGFP-CTTN (Addgene#26722)	GFP-CTTN	Mouse	NM_001252572	pEGFP-C1	-
pmCherry-CTTN (Addgene#27676)	mCherry-CTTN	Mouse	NM_001252572	pmCherry-C1	-
pcDNA5FRT/To-ORAI1-GFP	ORAI1-GFP	Human	NM_032790.3	pcDNA5FRT/To	BamHI/NotI
pcDNA5FRT/To-ORAI1- mCherry	ORAI1-mCherry	Human	NM_032790.3	pcDNA5FRT/To	BamHI/NotI
STIM1-KO (sense)	-	Human	ENSG00000167323	pBABED P U6	-
STIM1-KO (antisense)	-	Human	ENSG00000167323	pX335	-
ORAI1-KO (sense)	-	Human	ENSG00000276045	pBABED P U6	-
ORAI1-KO (antisense)	-	Human	ENSG00000276045	pX335	-
CTTN-KO (sense)	-	Human	ENSG00000085733	pBABED P U6	-
CTTN-KO (antisense)	-	Human	ENSG00000085733	pX335	-