



TESIS DOCTORAL

Título:

“REMODELACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA ECC EN LAS CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA”

Presentado por **Carlos Cantonero Chamorro** para optar al grado de Doctor por la Universidad de Extremadura.

Dirigida por:

Dr. Juan Antonio Rosado Dionisio.
Dr. Pedro Cosme Redondo Liberal.



Programa de Doctorado de Biomarcadores de Salud y Estados
Patológicos



FACULTAD VETERINARIA.
Departamento de Fisiología.
Campus universitario.
Avda. de la universidad s/n
10003 Cáceres (Cáceres).
Teléf: 927 25 71 39

D. **Juan Antonio Rosado Dionisio**, Doctor en Veterinaria y Catedrático del Departamento de Fisiología en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura y D. **Pedro Cosme Redondo Liberal**, Doctor en Biología y Profesor contratado Doctor de la Universidad de Extremadura,

INFORMAN:

Que la presente memoria presentada por D. **Carlos Cantonero Chamorro**, con el título “REMODELACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA ECC EN LAS CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA”, ha sido realizada bajo nuestra tutela y dirección en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Extremadura. Durante el período de realización de la presente Tesis, el doctorando realizó una estancia de tres meses en el Instituto Nacional de la Salud e Investigación Médica “INSERM” (U1029) de la Universidad de Bordeaux en Bordeaux (Francia). La Tesis ha sido informada favorablemente por el Dr. Majid Khatib, experto europeo en el área de angiogénesis y Fisiología Molecular. Por ello consideramos que la Tesis reúne los requisitos de originalidad para ser juzgada y optar a la mención “Doctor Europeo” y autorizamos su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Cáceres, a 30 de mayo de 2020.

La conformidad de los directores de la tesis consta en el original en papel de esta Tesis Doctoral.

Fdo: Dr. Juan Antonio Rosado Dionisio

Fdo: Dr. Pedro Cosme Redondo Liberal

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

Proyectos de investigación BFU2013-45564-C2-1-P y BFU2016-74932-C2-1-P del
Ministerio de Economía y Competitividad.

Ayuda a grupos de investigación Junta de Extremadura-FEDER GR15029 y GR18061.

Proyecto de investigación IB16046 de la Junta de Extremadura-FEDER.

Carlos Cantonero Chamorro ha disfrutado de una beca-contrato para la formación
predoctoral de personal investigador de la Junta de Extremadura (PD16072).



Unión Europea
Fondo Europeo de
Desarrollo Regional



JUNTA DE EXTREMADURA

Por y para mi familia.

Es incalculable la experiencia acumulada a lo largo de todo el proceso de formación de una Tesis y son muchas las personas que en mayor o menor medida me han ayudado a llevar a cabo este objetivo tan importante para mí. Tanto es así que no podría dejar pasar la oportunidad de mencionar a aquellos que me han acompañado durante este periodo.

Quisiera destacar la labor de mis directores de Tesis, Dr. Juan Antonio Rosado y Dr. Pedro C. Redondo, así como los retos que supusieron para mí la dedicación en exclusividad de mi tiempo para la investigación y el descubrimiento de un mundo, a mis inicios, desconocido. Fueron ellos dos quiénes apostaron por mí y me ofrecieron una oportunidad por la que opté.

Al Dr. Ginés María Salido, omnisciente desde su despacho y dispuesto a sumar en todo momento con la serenidad y el buen tono que le otorga un punto de vista sólo accesible tras una larga trayectoria en este mundo de la ciencia.

Son varios los compañeros con los he compartido horas, a veces interminables, en los mismos laboratorios y de los cuales, con la suficiente atención e interés, se puede aprender mucho de cada uno de ellos. Tanto es así que Leticia, José, JJ, Isaac, Raquel, Alejandro, Sandra y Mercedes, sin ser conscientes en todo momento, o siéndolos dependiendo del quién y del cuándo; me han facilitado el trabajo día a día y la satisfacción de obtener unos objetivos en los cuáles verdaderamente he puesto todo mi empeño.

Moi, je voudrais dédier les suivants mots à la période à la France parce que ça a été vraiment un plaisir travailler avec Dr. Majid Khatib. C'est l'expérience de se sentir une famille aussi avec Dra. Geraldine Siegfried, Dra. Fabienne Soulet, Jean, Nico et Flo. Merci beaucoup pour votre collaboration.

Son muchos los recuerdos que guardo y, aunque con más café del debido, este paso ha marcado una experiencia inolvidable en mi vida.

TABLA DE CONTENIDO

0. ABREVIATURAS, TABLAS Y FIGURAS.	21
0.1. ABREVIATURAS.	21
0.2. TABLAS.	24
0.3. FIGURAS.	25
1. RESUMEN.	31
1. SUMMARY.	33
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.	37
2.1. CÁNCER DE MAMA.	37
2.1.1. – Fisiopatología del cáncer de mama.	39
2.1.2. – Clasificación del cáncer de mama.	40
2.1.3. – Pronóstico del cáncer de mama.	50
2.2. HOMEOSTASIS DEL ION CALCIO (Ca²⁺) INTRACELULAR.	53
2.2.1. – Mecanismos que aumentan la [Ca ²⁺] _c	56
2.2.1.a. Entrada de Ca ²⁺ desde el medio extracelular.	56
2.2.1.b. Salida de Ca ²⁺ desde los depósitos intracelulares.	59
2.2.2. – Mecanismos que restablecen la [Ca ²⁺] _c	63
2.2.2.a. Sistemas de expulsión de Ca ²⁺ de membrana plasmática.	64
2.2.2.b. Sistemas de captación de Ca ²⁺ de reservorios internos.	66
2.2.3. – Entrada Capacitativa de Ca ²⁺ (ECC).	72
2.2.3.a. Mecanismos implicados en la ECC.	74
2.2.3.b. STIM1 (Stromal Interaction Molecule 1).	76
2.2.3.c. STIM2 (Stromal Interaction Molecule 2).	79
2.2.3.d. Orai1 (CRACM1).	80
2.2.3.e. Orai2 (CRACM2).	83
2.2.3.f. Orai3 (CRACM3).	84
2.2.3.g. Canales TRP (Transient Receptor Potential channels).	86
2.3. CÁNCER DE MAMA Y HOMEOSTASIS INTRACELULAR DEL Ca²⁺.	90
2.3.1. – Regulación de ECC en los procesos de cáncer de mama.	90
2.3.2. – Proliferación en cáncer de mama.	91
2.3.2.a. STIM.	92
2.3.2.b. Orai.	92
2.3.2.c. TRP.	93
2.3.3. – Migración, invasión y metástasis en cáncer de mama.	94
2.3.3.a. STIM.	94
2.3.3.b. Orai.	96
2.3.3.c. TRP.	96
2.3.4. – Angiogénesis en cáncer de mama.	97
2.3.4.a. Orai.	97
2.3.5. – Apoptosis en cáncer de mama.	97
2.3.5.a. STIM.	97
2.3.5.b. Orai.	98
2.3.5.c. TRP.	98
2.3.6. – Farmacorresistencia en cáncer de mama.	99

3. OBJETIVOS.....	103
3. OBJECTIVES.....	104
4. MATERIALES Y MÉTODOS.	107
4.1. REACTIVOS.....	107
4.2. TAMPONES Y SOLUCIONES.	108
4.3. PLÁSMIDOS.....	112
4.4. ARN DE INTERFERENCIA.	112
4.5. ANTICUERPOS.....	113
4.6. CULTIVO CELULAR.	113
4.7. TRANSFECCIÓN CELULAR.	118
4.8. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR ([Ca²⁺]_c) MEDIANTE MÉTODOS FLUORIMÉTRICOS.....	118
4.8.1. – Indicadores de calcio codificados genéticamente (GECI).....	118
4.8.2. – Sonda Fura-2.	119
4.9. DETECCIÓN DE COLOCALIZACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL.	121
4.10. VISUALIZACIÓN DE LA TRANLOCACIÓN DE NFAT1 AL NÚCLEO.	123
4.11. MÉTODO DE FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR.....	123
4.12. TÉCNICA DE EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.	124
4.12.1. – Lisis celular y extracción de proteínas.	124
4.12.3. – Inmunoprecipitación.	126
4.12.4. – Western Blotting.	127
4.13. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD Y APOPTOSIS CELULAR.	128
4.13.1. – Microscopía.....	129
4.13.2. – Fluorimetría.....	130
4.13.3. – Citometría.....	130
4.14. DETERMINACIÓN DE LA MIGRACIÓN CELULAR.	131
4.15. DETERMINACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.	132
4.16. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	133
5. RESULTADOS.	137
5.1. El NO1, nuevo ligando fluorescente del Sigma2 Receptor/TMEM97, disminuye SOCE y promueve la apoptosis en las líneas celulares de cáncer de mama triple negativas.	137
5.1.1. – σ 2R/TMEM97 se sobreexpresa en las líneas celulares de cáncer de mama.	137
5.1.2. – El ligando σ 2R/TMEM97 altera la migración y proliferación de las células TNBC.....	139
5.1.3. – El NO1 promueve la muerte celular y la apoptosis en células MDA-MB-231.....	142
5.1.4. – σ 2R/TMEM97 es necesario para la activación de SOCE en células MDA-MB-231.	148
5.1.5. – σ 2R/TMEM97 interactúa con STIM1 pero no con Orai1 durante la activación de SOCE.	152

5.2. La progesterona disminuye la proliferación de las células MDA-MB-231 alterando la homeostasis intracelular del Ca²⁺ a través de la activación de PGRMC1.	157
5.2.1. – La P ₄ inhibe la proliferación de las células MDA-MB-231.....	157
5.2.2. – El PGRMC1 impide la movilización de Ca ²⁺ dependiente de P ₄ en las células MDA-MB-231.	160
5.2.3. – El silenciamiento de la expresión de PGRMC1 revierte el efecto inhibitorio de la P ₄ en la proliferación celular de las células MDA-MB-231.	165
5.2.4. – La P ₄ modifica la localización intracelular de p53 y de NFAT1.....	167
5.3. El ácido araquidónico disminuye la proliferación, migración y viabilidad celular a través de mecanismos independientes a la entrada de calcio.	171
5.3.1. – El ácido araquidónico (AA) no induce movilización de Ca ²⁺ en las células MCF10A y MDA-MB-231.	171
5.3.2. – Las células MDA-MB-231 carecen de canales funcionales selectivos al Ca ²⁺ regulados por el ácido araquidónico (ARC).	173
5.3.3. – Efecto del AA en la proliferación celular en MDA-MB-231.	176
5.3.4. – El AA inhibe la migración celular en MDA-MB-231.....	178
5.3.5. – El AA disminuye la viabilidad celular en MDA-MB-231.....	180
5.3.6. – El AA induce la despolarización de la membrana mitocondrial y la activación de caspasas.	183
6. DISCUSIÓN.	189
7. CONCLUSIONES.....	199
7. CONCLUSIONS.	200
8. BIBLIOGRAFÍA.	203

0. ABREVIATURAS, TABLAS Y FIGURAS.

0.1. ABREVIATURAS.

[Ca²⁺]_c: concentración de calcio citoplasmática.

2-APB: 2-Aminoetil-Difenilborinato.

AA: ácido araquidónico.

aa: aminoácidos.

AC: adenilato ciclasa de membrana.

ADP: adenosín difosfato.

AMPA: ácido 2-amino-3-hidroxi-5-letil-4-isoxazolepropiónico.

ATP: adenosín trifosfato.

BLBC: cáncer de mama basal (*basal-like breast cancer*).

CAD: dominio activador de Ca²⁺ sensible a la liberación de Ca²⁺ -CRAC.

cADPR: ADP ribosa cíclica.

CaM: calmodulina.

CC: “*coiled-coil*”.

CDI: carcinoma ductal invasivo.

CDIS: carcinoma ductal *in situ*.

cEF: dominio canónico *EF-hand* de unión a Ca²⁺.

CICR: liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺

(“*Calcium-induced calcium release*”).

CLI: carcinoma lobular invasivo.

CLIS: carcinoma lobulillar *in situ*.

CMD: dominio modulador CRAC de STIM1.

CMI: cáncer de mama inflamatorio.

DAG: diacilglicerol.

DGK: DAG cinasa.

DTT: ditiotreitól.

ECC: Entrada Capacitativa de Ca²⁺.

ECM: matriz extracelular.

EGF: factor de crecimiento epidérmico.

EGTA: ácido tetracético etilenglicol.

EMRE: subunidad reguladora de MCU.

EPM: enfermedad de Paget de la mama.

ER: receptor estrogénico.

ETON: región N-terminal de Orail transmembrana extendida.

GECI: indicadores de calcio codificados genéticamente.

HBS: Tampón Hepes Salino.

hEF: dominio oculto *EF-hand* de no-unión a Ca²⁺.

HER2: factor de crecimiento epidérmico humano 2.

HIF1 α : factor inducible por hipoxia 1 α .

I_{ARC}: corriente de Ca²⁺ no capacitativa regulada por AA.

I_{CRAC}: “*Calcium Release-Activated Current*”.

iGluRs: receptores ionotrópicos.

IntClust: “*integrative clusters*”.

IP₃: inositol 1,4,5-trifosfato.

IP₃R: receptor 1,4,5-trifosfato.

IP₄: inositol tetrakisfosfato.

I_{SOC}: corriente de Ca²⁺ operada por depósito.

KA: kainato.

LCR: entrada de Ca²⁺ activada por leucotrieno C4.

LTC4: leucotrieno C4.

MCU*: subunidad formadora de poro de MCU.	(dimetilamino)indoline-1,3-dione.	ROCs: canales iónicos activados por receptor.
MCU: uniportador mitocondrial de Ca^{2+} .	nPR: receptor nuclear de la progesterona.	RTK: receptores tirosina cinasa.
METABRIC: Consorcio Internacional de Cáncer de Mama de Taxonomía Molecular.	OASF: fragmento corto de activación de Orai.	RyR: receptor de rianodina.
mGluRs: receptores metabotrópicos.	OMS: Organización Mundial de la Salud.	S1P: esfingosina-1-fosfato.
MICU: subunidades sensibles a Ca^{2+} de MCU.	P₄: progesterona.	SAM: dominio α -estéril de STIM.
MP: membrana plasmática.	PBS: tampón fosfato salino.	SCaMPER: canal proteico de liberación de Ca^{2+} mediado por esfingolípidos en el retículo endoplásmico.
NAADP: nicotinato de adenina dinucleótido fosfato.	PI: yoduro de propidio.	SDS: sodio-dodecil-sulfato.
nAChRs: receptores nicotínicos de la acetilcolina.	PIP₂: fosfatidilinositol 4,5 bifosfato.	SERCA: bomba ATPasa transportadora de Ca^{2+} del retículo sarcoendoplásmico.
NADP: nicotinadenín dinucleótido fosfato.	PKA: proteína cinasa A.	SM21: tropanil(\pm)-2-(4-clorophenoxi) butanoato maleato.
NCKX: intercambiadores $Na^+ / K^+ / Ca^{2+}$.	PKC: proteína cinasa C.	SMOCs: canales iónicos activados por segundos mensajeros.
NCX: intercambiadores de Na^+ / Ca^{2+} .	PKD: proteína cinasa D.	SOAR: región activadora STIM-Orai.
NCXm: intercambiadores de Na^+ / Ca^{2+} mitocondriales.	PKN: proteína cinasa N.	SOCE: entrada de Ca^{2+} por los depósitos "Store-Operated Calcium Entry".
NMDA: N-metil-D-aspartato.	PLA₂: fosfolipasa A ₂ .	SOCs: canales iónicos activados por el vaciamiento de los depósitos intracelulares.
NO1: 2-{6-[2-(3-(6,7-dimetoxi-3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)propil)-3,4-dihidroisoquinolin-1(2H)-one-5-iloxi] hexil}-5-	PLC: fosfolipasa C.	SP: péptido de señalización.
	PMCA: bomba ATPasa transportadora de Ca^{2+} de la membrana plasmática.	
	PMR1: bomba ATPasa relacionada con la membrana plasmática.	
	PR: receptor de la progesterona.	
	RE: retículo endoplásmico.	
	REDECAN: Red Española de Registros del Cáncer.	
	RIPA: tampón de radioinmunoprecipitación.	

SPCA: bomba ATPasa de Ca^{2+} de la vía secretora.

STIM1: “*Stromal Interaction Molecule 1*”.

STIM2: “*Stromal Interaction Molecule 2*”.

TBST: tampón tris salino con tween.

TG: tapsigargina.

TM: región/dominio transmembrana.

TMB: 3,3',5, 5'-tetrametil-bencidina.

TNBC: cáncer de mama triple negativo.

TRPA: receptores de potencial transitorio anquirina.

TRPC: receptores de potencial transitorio canónico.

TRPM: receptores de potencial transitorio de melastatina.

TRPML: receptores de potencial transitorio mucolipina.

TRPN: receptores de potencial transitorio no-mecanorreceptor potencial C.

TRPP: receptores de potencial transitorio policisteína.

TRPs: receptores de potencial transitorio.

TRPV: receptores de potencial transitorio vaniloide.

UPR: respuesta a proteínas desplegadas.

VDAC: canal aniónico dependiente de voltaje.

VOCs: canales iónicos activados por voltaje.

0.2. TABLAS.

Tabla 1. Distribución de los diagnósticos de cáncer estimados para la población española en 2020.	38
Tabla 2. Distribución de los diagnósticos de cáncer para la población femenina española estimados en 2020.	38
Tabla 3. Resumen de las características principales del subtipo molecular (Tsang and Tse, 2020).	49
Tabla 4. Clasificación TNM. TUMOR (T).	50
Tabla 5. Clasificación TNM. LINFONODO (L)	51
Tabla 6. Clasificación TNM. METÁSTASIS (M).	51
Tabla 7. Tampón Hepes Salino (HBS).	108
Tabla 8. Tampón Fosfato Salino (PBS).	108
Tabla 9. Tampón de lisis NP-40.	109
Tabla 10. Tampón de radioinmunoprecipitación (RIPA).	109
Tabla 11. Tampón de Laemmli.	109
Tabla 12. Tampón Tris Salino con Tween (TBST).	110
Tabla 13. Geles de acrilamida/bisacrilamida (I).	110
Tabla 14. Geles de acrilamida/bisacrilamida (II).	110
Tabla 15. Tampón de electroforesis.	111
Tabla 16. Tampón de transferencia.	111
Tabla 17. Solución de bloqueo.	111
Tabla 18. Reactivos del kit de proliferación BrdU.	112
Tabla 19. Resumen de las características principales de la línea celular no tumoral (MCF10A) y tumorales (MCF7, MDA-MB-231; MDA-MB-468) de mama.	117
Tabla 20. Intensidades de corriente de la electroforesis.	128

0.3. FIGURAS.

Figura 1. Prevalencia mundial del cáncer en 2018.	37
Figura 2. Anatomía de la glándula mamaria.....	40
Figura 3. Evolución de la fisiopatología en un modelo de cáncer de mama.	41
Figura 4. Paciente con CMI e inflamación del seno	42
Figura 5. Paciente con EPM y dermatitis eccematosa en el pezón.....	43
Figura 6. Paciente con tumor filoides en la mama derecha	44
Figura 7. Representación subtipos moleculares.	45
Figura 8. Tasa de supervivencia a 5 años desde su diagnóstico de una población de mujeres en Reino Unido.....	53
Figura 9. Principales mecanismos celulares implicados en la regulación del Ca^{2+} intracelular.....	54
Figura 10. Representación esquemática de la vía de activación de la fosfolipasa C (PLC) en la célula.	56
Figura 11. Mecanismos responsables de la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular.....	57
Figura 12. Mecanismos responsables de la entrada de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares.	60
Figura 13. Principales mecanismos de restablecimiento de $[Ca^{2+}]_i$	64
Figura 14. Estructura de la bomba ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA).....	65
Figura 15. Estructura de la bomba ATPasa de Ca^{2+} del RE (SERCA).	68
Figura 16. Estructura de la bomba ATPasa de Ca^{2+} de vías secretoras (SPCA). 70	
Figura 17. Estructura del uniportador mitocondrial (MCU).....	72
Figura 18. Secuencia de activación de la ECC entre STIM y Orai1.....	75
Figura 19. Estructura de STIM1 (Stromal Interaction Molecule 1).....	76
Figura 20. Estructura de las isoformas de STIM2 (STIM2.1; STIM2.2; STIM2.3).....	80
Figura 21. Estructura de Orai1 (CRACM1).....	82
Figura 22. Estructura de Orai2 (CRACM2).....	84
Figura 23. Estructura de Orai3 (CRACM3).....	86
Figura 24. Familia de canales TRP (Transient Receptor Potential).....	88

Figura 25. Modelo de integración interactiva entre TRPC1 y STIM1/Orai1 en la ECC.....	89
Figura 26. Adquisición por microscopía (40×) de células MCF10A en subcultivo. Imagen tomada por Invitrogen™ EVOS™ FL Auto 2 Imaging System.	114
Figura 27. Adquisición por microscopía (40×) de células MCF7 en subcultivo. Imagen tomada por Invitrogen™ EVOS™ FL Auto 2 Imaging System.	114
Figura 28. Adquisición por microscopía (40×) de células MDA-MB-231 en subcultivo. Imagen tomada por Invitrogen™ EVOS™ FL Auto 2 Imaging System.	115
Figura 29. Adquisición por microscopía (40×) de células MDA-MB-468 en subcultivo. Imagen tomada por Invitrogen™ EVOS™ FL Auto 2 Imaging System.	116
Figura 30. Molécula de Fura-2/AM antes y después del cleaving.	119
Figura 31. Ilustración esquemática de la reacción de biuret con el ácido bicinconínico (BCA).	126
Figura 32. Secuenciación temporal del avance celular de la línea MDA-MB-231. Ensayo de migración.	132
Figura 33. Ilustración de la unión anticuerpo-BrdU en el ADN.	133

Resumen

1. RESUMEN.

El cáncer de mama es una de las enfermedades contemporáneas con mayor prevalencia en la sociedad. Es la principal causa de muerte entre las mujeres de todo el mundo diagnosticadas de cáncer y son varios los modelos predictivos que auguran un aumento progresivo en su diagnóstico a lo largo de los próximos años. Existe un consenso generalizado en la comunidad científica sobre los cambios intrínsecos asociados a la transición de célula sana a célula cancerígena que se producen en las diferentes fases del cáncer: proliferación, migración, invasión y metástasis. Especialmente, en las células de cáncer de mama, la regulación de la $[Ca^{2+}]_c$ ejerce un papel fundamental a lo largo del desarrollo de esta patología. Tanto es así, que se han establecido fuertes correlaciones entre la expresión de las proteínas responsables del transporte del Ca^{2+} intracelular en muestras de pacientes previamente diagnosticados y su tasa de supervivencia y éxito terapéutico. Entendiendo el cáncer como una enfermedad multifactorial es impensable justificar esta patología únicamente a partir de procesos de desregulación del ion Ca^{2+} . No obstante, son varios los mecanismos de homeostasis del Ca^{2+} que se han descrito fundamentales en la fisiopatología del cáncer. De entre ellos, el principal mecanismo de entrada de Ca^{2+} extracelular en células no excitables es la entrada capacitativa de Ca^{2+} (ECC), modulada por las familias de proteínas STIM, Orai y TRPC; además de existir otros canales de Ca^{2+} expresados en líneas de cáncer de mama como son: Orai1, Orai3, TRPC6, TRPV6 y TRPM8, entre otros.

Esta ECC produce un aumento en la $[Ca^{2+}]_c$ desde los reservorios intracelulares y, seguidamente, una activación de la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de la membrana plasmática, proceso denominado SOCE. Estudios, cada vez más numerosos, han demostrado que SOCE y sus componentes, regulan una diversidad de procesos en el cáncer de mama, así como que se halla íntimamente asociado al metabolismo de estas células. De este modo, STIM1/STIM2 se encuentra más expresado en los subtipos de peor pronóstico y más agresivos. Se podría decir que STIM1 junto con Orai1 en muestras de tejido tumoral de pacientes son los más sobreexpresados en comparación con tejidos pre- o no cancerígenos. Orai3, por su parte, está más presente en los subtipos de cáncer de mama ER+. En general, los canales Orai son uno de los más estudiados en los subtipos ER+ y TNBC, sin embargo, en ciertas ocasiones estas tendencias parecen no coincidir. Tal es así que en los subtipos ER+ y TNBC, la expresión de STIM1 es mayor a la de STIM2 salvo en la línea ER+ SK-BR-3, en la cual STIM2 es 10 veces superior. Además de los miembros de Orai y STIM, otras isoformas de la familia TRP (TRPC3, TRPM7, TRPM8 y TRPV6) se han correlacionado con la progresión de cáncer de mama. Análisis complementarios del perfil génico de expresión de TRPC1 han demostrado que esta proteína se encuentra moderadamente sobre-regulada en la línea TNBC MDA-MB-231 con respecto a las no tumorales

y, más recientemente, la isoforma TRPC6 se ha descrito sobreexpresada en dos subtipos diferentes de mama (ER+ y TNBC).

Por todo ello y teniendo en cuenta estas consideraciones, ampliamente desarrolladas en los antecedentes bibliográficos, en el departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura se llevó a cabo durante el periodo 2016-2020 una serie de experimentos bajo la tutela y dirección de los doctores D. Juan A. Rosado y D. Pedro C. Redondo cuyo fin fue desarrollar nuevas vías de señalización y mecanismos reguladores entre los distintos componentes de la ECC. La tesis tiene por título “REMODELACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA ENTRADA CAPACITATIVA DE CALCIO (ECC) EN LAS CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA” y las líneas de investigación expuestas en este trabajo se centraron en cómo se regulan varias líneas de cáncer de mama (TNBC y ER+) en la función de STIM1 a través de σ 2R/TMEM97, la asociación de STIM2, Orai1 y TRPC1 con la P_4 , y el papel protector de Orai3 frente al AA. Con estos resultados pretendemos someter esta tesis a la valoración del Tribunal Evaluador y optar a la distinción de Doctor Internacional por la Universidad de Extremadura.

1. SUMMARY.

Breast cancer is one of the most prevalent diseases in our society. This kind of cancer involves the main cause of death between all women diagnosed of cancer around the world and experts predict that in the following years it will grow up. The scientific community accepts the idea that specific changes in healthy cells lead to a neoplastic differentiation with different hallmarks: uncontrolled proliferation, migration, invasion and metastasis. Especially in breast cancer cells, the role of the $[Ca^{2+}]_c$ and how it is regulated are crucial along the pathology. There are now substantial correlations between the expression of Ca^{2+} -handling and their survival rates but also in the success of the therapeutic program. The understanding of cancer as a multifactor illness present this process not only by the point of the dysregulated Ca^{2+} homeostasis. Nevertheless, many Ca^{2+} homeostatic pathways have been reported evolving cancer. Special mention deserves one of the major mechanisms for Ca^{2+} entry in non-excitabile cells, capacitative Ca^{2+} entry (CCE), a mechanism for Ca^{2+} influx modulated by STIM, and conducted by Orai and TRPC proteins. Breast cancer cells overexpress some Ca^{2+} channels, such as Orai1, Orai3, TRPC6, TRPV6 or TRPM8.

During activated CCE, $[Ca^{2+}]_c$ increases rapidly by Ca^{2+} release from intracellular reservoirs. This event is followed by a Ca^{2+} inward current termed SOCE. At the moment, there is a body of evidence supporting the association between SOCE, and its components, and breast cancer especially related with the metabolism in these cells. In this sense, STIM1/STIM2 appears overexpressed in worst and aggressive breast cancer subtypes. In general, both STIM1 and Orai1 proteins are overexpressed in breast cancer samples as compared to non-tumoral breast samples. Orai3, for example, is highly expressed in the ER+ breast cancer subtype. Thus, expression of STIM1 is higher than STIM2 in ER+ and TNBC breast cancer but, in SK-BR-3 ER+ subtype, STIM2 expression is 10-fold higher than that of STIM1. In addition, a variety of TRP family isoforms (i.e. TRPC3, TRPC7, TRPM8 and TRPV6) have also been correlated with progression of breast cancer. A plethora of genomic experiments showed an upper-middle expression of TRPC1 in the TNBC MDA-MB-231 cell line and, more recently, overexpression of TRPC6 has been reported in ER+ and TNBC, two different subtypes of breast cancer cell lines.

In view of these considerations and its significant component, which will be explained below in detail, we have conducted experiments to ascertain the remodelling of CCE in breast cancer cells at the Department of Physiology of the Faculty of Veterinary Medicine, during the period 2016-2020, under the supervision of Drs Rosado and Redondo. Particularly, in this thesis entitled "REMODELING OF CCE COMPONENTS IN BREAST CANCER CELLS", we have described expression and function remodelling of STIM1 and, STIM2, Orai1 and TRPC1 in presence of P_4 ,

as well as Orai3. Here, this Thesis is submitted for consideration by the Evaluation Tribunal with the aim to obtain the degree of International Doctor by the University of Extremadura.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.

2.1. CÁNCER DE MAMA.

El cáncer supone una de las mayores causas de mortalidad en la sociedad contemporánea. Se calcula que aproximadamente 18,1 millones de nuevos diagnósticos aparecieron a lo largo de 2018. Según el Instituto Nacional de Cáncer de EEUU (Bethesda, EEUU), 4 millones de personas mueren anualmente a causa del cáncer en todo el mundo, casi 500 personas por hora. Además, las últimas estimaciones apuntan a un aumento en su diagnóstico a lo largo de los próximos años, alcanzando cifras de 29,5 millones de nuevos casos diagnosticados para el año 2040 (Global Cancer Observatory, 2019).

De entre todos, los diagnósticos más frecuentes en el año 2018 fueron los de pulmón, mama, colorrectal y próstata, englobando el 40.1% de los diagnósticos. El registro de los más frecuentes fue el siguiente: pulmón (2.093.876 diagnósticos) (11,60%), mama (2.088.106 diagnósticos) (11,60%), colorrectal (1.849.518 diagnósticos) (10,20%) y próstata (1.276.106 diagnósticos) (7,10%). (Figura 1. Prevalencia mundial del cáncer en 2018.) (Global Cancer Observatory, 2019).

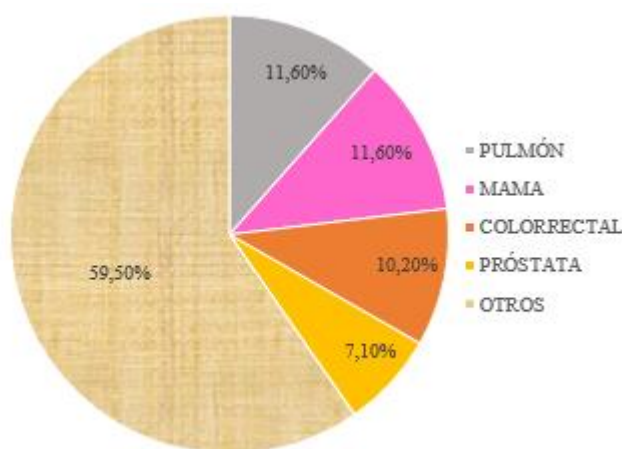


Figura 1. Prevalencia mundial del cáncer en 2018.

También en España el cáncer es una de las principales causas de mortalidad presentes en la sociedad. Tanto es así que se estima que el número de casos diagnosticados para 2020 alcanzará un total de 277.394, según la Red Española de Registros del Cáncer (REDECAN), logrando cotas muy similares a las presentadas en 2019. Del mismo modo, y para toda la población, los cánceres de mayor prevalencia para el año 2020 serán los siguientes (excluidos los tumores cutáneos no melanoma): colorrectal (44.231 casos), próstata (35.126 casos), mama (32.953 casos), pulmón (29.638 casos) y vejiga urinaria (22.350 casos). Muy desmarcados de ellos, los siguientes cánceres más diagnosticados serán: linfomas no hodgkinianos (9.188

casos), cánceres de cavidad oral y faringe (8.604 casos), páncreas (8.338 casos), estómago (7.577 casos), riñón (7.300 casos) y cuerpo uterino (6.804 casos) (Tabla 1. Distribución de los diagnósticos de cáncer estimados para la población española en 2020).

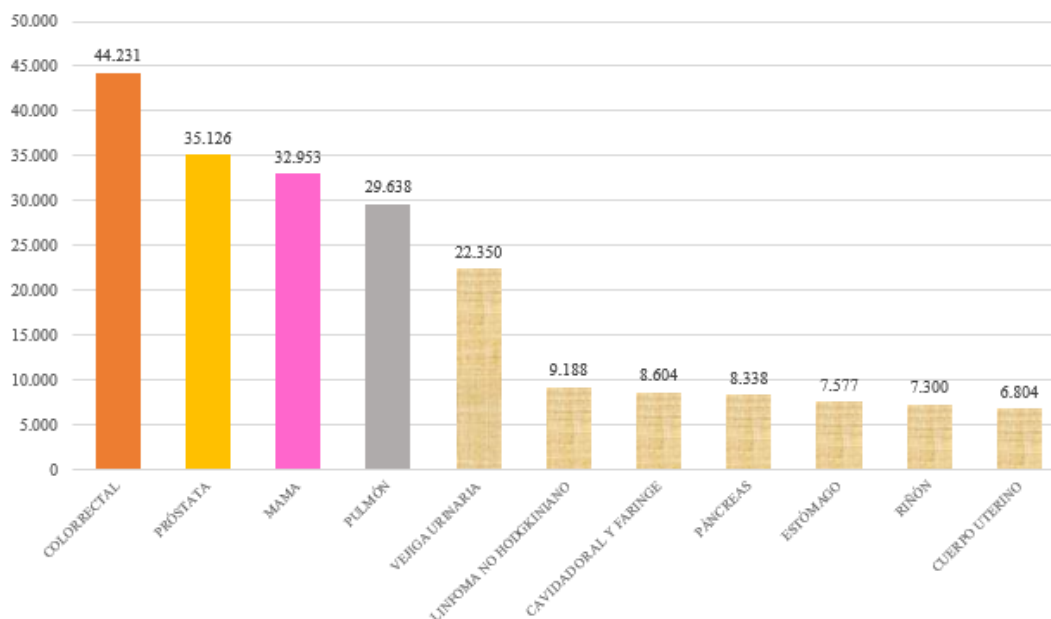


Tabla 1. Distribución de los diagnósticos de cáncer estimados para la población española en 2020.

Una vez retratada la distribución en nuestro país, el foco de atención se dirige hacia la población femenina para mostrar los cánceres que más frecuentemente se diagnosticarán en 2020, atendiendo a la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN). Se estima que se presentarán los siguientes casos (excluidos los tumores cutáneos no melanoma), recogidos en la “Tabla 2. Distribución de los diagnósticos de cáncer para la población femenina española estimados en 2020”, donde el cáncer de mama y colorrectal asumirán en gran medida los diagnósticos, siendo el de mama el que se alzará en primer lugar.

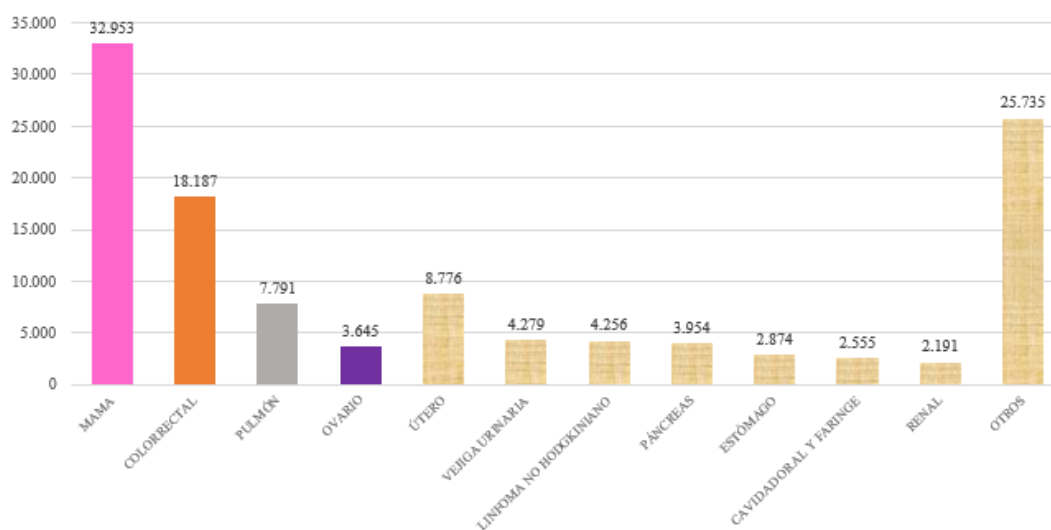


Tabla 2. Distribución de los diagnósticos de cáncer para la población femenina española estimados en 2020.

El cáncer de mama es el cáncer más frecuentemente presentado en las mujeres de todo el mundo, tanto en los países desarrollados como en los países en vías de desarrollo. Estimaciones realizadas por la OMS se elevan hasta los 2,1 millones de cánceres nuevos al año. Además, representan el 15% de todos los cánceres femeninos diagnosticados en 2018, falleciendo cerca de 627.000 mujeres por esta causa (Carga Mundial de Morbilidad, OMS, 2018). Las tasas de supervivencia varían considerablemente atendiendo a la localización geográfica, partiendo del 80% o más en América del Norte, Suecia y Japón, cerca del 60% en los países de ingresos medios, hasta cifras inferiores al 40% en los países en vías de desarrollo (Coleman *et al.*, 2008).

Son varios los factores de riesgo que ejercen una predisposición a la enfermedad. No obstante, la asociación específica entre factor de riesgo y mujer afectada es sumamente compleja de discernir (Boyle *et al.*, 2008; Lacey *et al.*, 2009). Tal es así, que son muchos los factores que predisponen e influyen en la enfermedad como la menarquia y el ciclo menstrual (Key, Verkasalo and Banks, 2001; Hamajima *et al.*, 2012; Savolainen-Peltonen *et al.*, 2018), el parto (Knabben and Mueller, 2017), la lactancia (Islami *et al.*, 2015; Knabben and Mueller, 2017), la menopausia (Ganz, 2005; Hickey, McNamara and Mishra, 2018), las concentraciones hormonales endógenas (Hamajima *et al.*, 2012; Samavat and Kurzer, 2015), la administración de anticonceptivos orales (Hunter, 2017; Samson *et al.*, 2017), las terapias hormonales (Heller *et al.*, 2018), la dieta (Dandamudi *et al.*, 2018; De Cicco *et al.*, 2019), el alcohol y el tabaco (Ellingjord-Dale *et al.*, 2017; Jones *et al.*, 2017; Knight *et al.*, 2017; Baglia, Cook, *et al.*, 2018), la obesidad (Picon-Ruiz *et al.*, 2017; Garcia-Estevez and Moreno-Bueno, 2019), el ejercicio (Kraschnewski and Schmitz, 2017), el historial familiar y la genética individual (Brewer *et al.*, 2017; Baglia, Tang, *et al.*, 2018; Braithwaite *et al.*, 2018), y las mutaciones genéticas (Shiovitz and Korde, 2015; Nik-Zainal and Morganella, 2017; Kalimutho *et al.*, 2019), entre otros. Incluso hay autores que destacan algunos de los más importantes. Danaei *et al.*, en 2005 calcularon la contribución de diversos factores de riesgo, exceptuando los factores reproductivos, a la carga global del cáncer de mama y concluyeron que, aproximadamente, el 21% de todas las muertes mundiales causadas por este tipo de cáncer son atribuibles al consumo de alcohol, al sobrepeso y obesidad, y a la falta de actividad física.

2.1.1. – Fisiopatología del cáncer de mama.

El cáncer de mama es un tipo de cáncer que comienza en las células del seno mamario. Son varios los factores que están implicados en el riesgo del desarrollo de la enfermedad, como se han comentado con anterioridad. De entre ellos, se sabe que exposiciones a estrógenos bajo condiciones *in vitro* desencadenan daños puntuales en el ADN y mutaciones. Otros individuos

pueden heredar, además, defectos en el ADN y genes asociados a este tipo de cáncer como BRCA1, BRCA2 o p53. El sistema inmune, en condiciones normales, detecta células cancerígenas y/o células con su material genético dañado y las destruye. No obstante, un fallo en la efectividad de la inmunidad puede acarrear la supervivencia y el desarrollo de células de cáncer de mama que, sumado al gran número de señalizaciones bioquímicas, factores de crecimiento y mediadores químicos entre estroma y epitelio, pueden desencadenar la evolución del cáncer de mama.

La enfermedad proliferativa del seno se asocia a un incremento en el riesgo de padecer cáncer de mama (Shah, Rosso and Nathanson, 2014). Las lesiones proliferativas del seno mamario sin atipia, incluyendo hiperplasia ductal común, papilomas intraductales, adenosis esclerosante y fibroadenomas, confieren un pequeño riesgo en el desarrollo del cáncer de mama, aproximadamente de 1.5 a 2 veces superior a la población general (Hartmann *et al.*, 2005). No obstante, la hiperplasia atípica que incluye ducto y lóbulo, eleva hasta 4.3 veces el riesgo de desarrollo cancerígeno en comparación con la población general (Dupont *et al.*, 1993; Hartmann *et al.*, 2005).

2.1.2. – Clasificación del cáncer de mama.

La clasificación actual de la OMS para el año 2019 de los tumores de mama muestra, de manera muy completa y detallada, más de 100 procesos tumorales mamarios diferentes que atienden a lesiones específicas, enfatizando en los roles de la respuesta hormonal, microambiente específico o infiltración linfocítica, entre otros. Todo ello, centralizado alrededor de un eje eminentemente morfológico (WHO Classification of Tumours Editorial Board., International Agency for Research on Cancer. and World Health Organization., 2019) (*Figura 2. Anatomía de la glándula mamaria*).

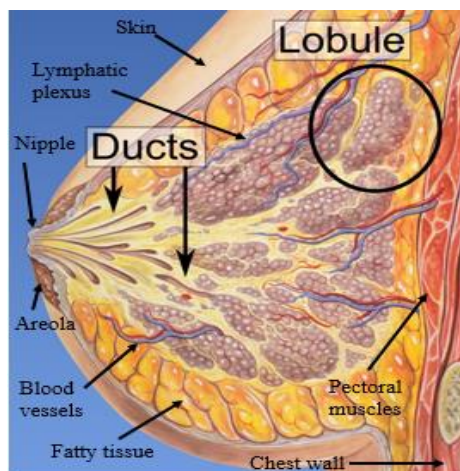


Figura 2. Anatomía de la glándula mamaria (Imagen del ilustrador médico Lynch PJ).

Adicionalmente, es muy habitual que el tipo de cáncer de mama sea determinado según la estirpe celular afectada. La mayoría de los procesos tumorales del seno mamario se presentan como carcinomas, más correctamente adenocarcinomas, que aparecen en el ducto (conductos galactóforos) o en el lobulillo (glándulas secretoras de la leche). El cáncer de mama *in situ* (carcinoma ductal *in situ* o CDIS) es el cáncer que aparece en un conducto galactóforo y no ha crecido en el resto de tejido mamario (Dillon, Guidi and Schnitt, 2014). Por su parte, el carcinoma lobulillar *in situ* (CLIS) es una forma extremadamente rara de tumor no invasivo que no suele aparecer como tipo de cáncer sino más bien es utilizado como “marcador” del desarrollo cancerígeno. Recientemente ha sido redefinido como un tipo de neoplasia lobular.

Si bien su localización es de suma importancia, la capacidad o no de invasión del tumor también lo es. El término cáncer de mama invasivo o infiltrante se asocia a cualquier proceso en el que se haya producido una diseminación (invasión) del cáncer hacia el tejido mamario adyacente (Esteva and Gutiérrez, 2014). De esta manera, el carcinoma ductal *in situ* o CDIS (también conocido como carcinoma intraductal) es un tipo de cáncer de mama no invasivo o pre-invasivo (*Figura 3. Evolución de la fisiopatología en un modelo de cáncer de mama*). Por otro lado, en el cáncer de mama invasivo (o infiltrante) hay una afectación del tejido mamario circunscrito. Los dos cánceres más comunes son el carcinoma ductal invasivo (CDI), que supone hasta el 80% de los diagnósticos invasivos, y el carcinoma lobular invasivo (CLI) que se presenta en el 10% de los cánceres mamarios invasivos.

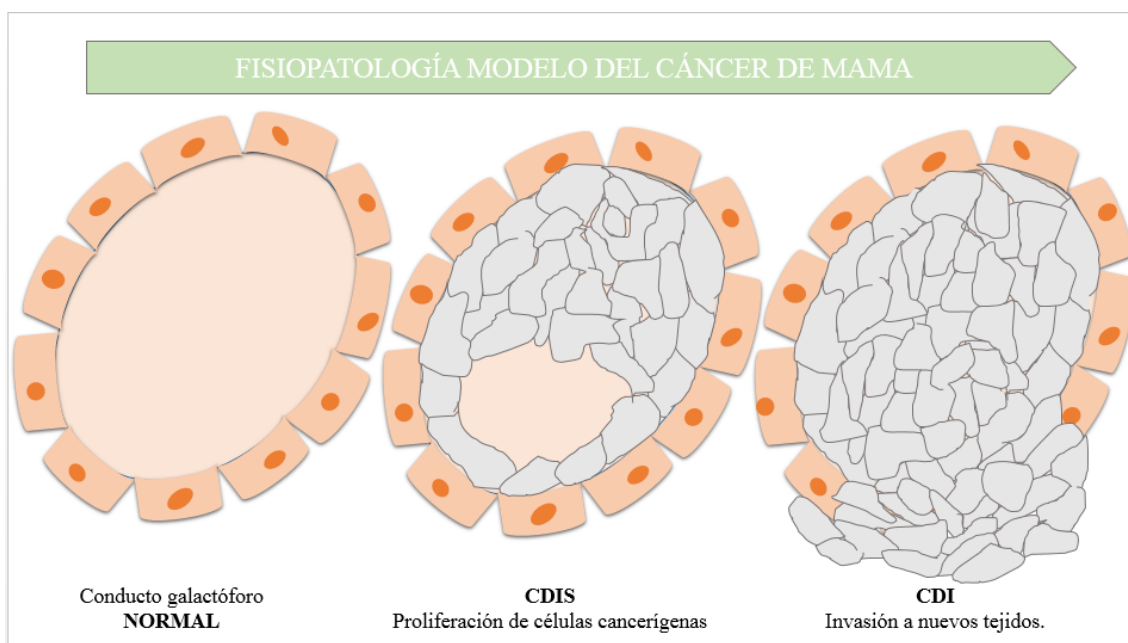


Figura 3. Evolución de la fisiopatología en un modelo de cáncer de mama.

Algunos cánceres de mama presentan características especiales y un desarrollo patogénico que difiere a los ya comentados. Estos procesos patológicos se agrupan en un subconjunto especial y presentan menor prevalencia que el resto. Aunque aparecen con mucha menos frecuencia, pueden

llegar a ser más dañinos que los anteriores (Jagsi *et al.*, 2019). Algunos de ellos se desarrollan a continuación:

◆ Cáncer de mama triple negativo.

Subtipo muy agresivo y altamente invasivo que se presenta en el 15% de los cánceres diagnosticados (Sociedad Americana Contra El Cáncer, 2019). Se caracteriza por la ausencia de receptores estrogénicos y de progesterona, así como por la falta de sobreexpresión del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2). Estos tumores tienen mal pronóstico y la quimioterapia presenta una respuesta parcial. Fenotípicamente se trata de un grupo heterogéneo, asociado en mayor o menor medida a mutaciones BRCA1 (Perou *et al.*, 2000; Podo *et al.*, 2010).

◆ Cáncer de mama inflamatorio (CMI).

Es un tipo poco frecuente e invasivo de cáncer de mama que se presenta alrededor del 1 – 5% de todos los casos diagnosticados en EEUU, según el Instituto Nacional de Cáncer (Bethesda, EEUU). Al inicio de su patología puede presentar un enrojecimiento con inflamación del seno como consecuencia de la obstrucción de los vasos linfáticos adyacentes de la piel (*Figura 4. Paciente con CMI e inflamación del seno*). De propagación rápida, presenta una prevalencia en mujeres 5 años más jóvenes que el resto de cánceres de mama (Sociedad Americana Contra El Cáncer, 2019).



Figura 4. Paciente con CMI e inflamación del seno (Educación Médica para la Clínica Mayo).

◆ Enfermedad de Paget de la mama (EPM).

Se trata de un tumor maligno que afecta de manera unilateral al pezón o areola. Clínicamente, como se observa en la *figura 5*, se presenta como una dermatitis eczematosa crónica asociada a

un carcinoma ductal *in situ* (CDIS) subyacente o a neoplasias invasivas, en el 97% de los casos (Casals-Felip *et al.*, 2007; Karakas, 2011; Lopes Filho *et al.*, 2015). La EPM es una forma clínica poco frecuente del cáncer que afecta sobre todo a mujeres, siendo rara en varones, y supone entre el 1-3% de todos los casos de cáncer de mama (Hansen, 2014) y hasta el 5% de todos los casos de cáncer de mama en los Estados Unidos, según el Instituto Nacional del Cáncer de EEUU (Bethesda, EEUU). Esta enfermedad expresa el antígeno de diferenciación NY-BR-1 y es utilizado como marcador en la enfermedad (Cohen *et al.*, 2006).



Figura 5. Paciente con EPM y dermatitis eczematosas en el pezón (Lage *et al.*, 2010).

Existen varias teorías para explicar la aparición de este proceso. Por un lado, las células podrían proceder de un CDIS previo y migrar a través de su base hasta el pezón. Algunos autores encontraron fuertes correlaciones en las tinciones inmunohistoquímicas entre el EPM y CDIS asociado (Cohen, Guarner and De Rose, 1993). Otros, detectaron una sobreexpresión de HER2 en las células de Paget, sugiriendo una síntesis previa de heregulina-alfa, factor de movilidad, por parte de los queratinocitos para, así, atraer a las células de Paget al pezón (Schelfhout *et al.*, 2000). Por otro lado, las células de Paget podrían ser queratinocitos que han sufrido mutaciones hasta convertirse en un carcinoma *in situ*, totalmente independiente al CDIS subyacente (Lagios *et al.*, 1984). Otros autores observaron, en estudios estructurales, microvellosidades y desmosomas entre las células de Paget y los queratinocitos (Janh *et al.*, 1995). Por último, una tercera teoría combina las dos anteriores, sugiriendo que las células de Paget podrían tener indistintamente dos orígenes, anteriormente mencionados, y desarrollarse dependiendo de las circunstancias locales (Lloyd and Flanagan, 2000).

◆ Tumor filoides.

Es una neoplasia del seno mamario muy poco frecuente. A diferencia de los carcinomas que se desarrollan en conductos o lobulillos, ésta se origina en el tejido conectivo (estroma) y fue descrita por primera vez por Johannes Müller en 1838 (Calhoun *et al.*, 2014). Son tumores de origen fibroepitelial que aparecen menos del 0.5% como neoplasia mamaria (Geisler *et al.*, 2000) y del 2-3% como tumor fibroepitelial. La mayoría de ellos son procesos benignos, aunque aproximadamente 1 de cada 4 se malignizan y desarrollan un elevado potencial agresivo (Calhoun *et al.*, 2014; Overmoyer and Pierce, 2014), como se puede observar en la siguiente figura (*Figura 6. Paciente con tumor filoides en la mama derecha*).



Figura 6. Paciente con tumor filoides en la mama derecha. (de Souza et al., 2011).

A pesar de que los tipos de cáncer de mama, como se ha visto, se pueden clasificar según su morfología y tipo celular, existe otro criterio fundamental a la hora de agruparlos regido por sus características histopatológicas, bioquímicas y moleculares.

En este sentido, el estudio de la expresión génica global de los diferentes cánceres nos muestra una evidencia biológica muy heterogénea. Dentro de la cual, podríamos clasificarlos intrínsecamente en 5 tipos moleculares de cáncer de mama (Perou *et al.*, 2000): luminal A, luminal B, HER2 sobreexpresado, cáncer de mama basal (BLBC, “*basal-like breast cancer*”) y tumor tipo normal (*normal-like*). Conjuntamente a esta división, la presencia de receptores hormonales y/o el estatus HER2 ayudan a complementar los grupos y el diagnóstico.

El receptor estrogénico (ER) y de la progesterona (PR) son dos receptores esteroideos sexuales y nucleares que estimulan el crecimiento en el epitelio mamario normal y neoplásico. Se calcula

que están presentes en el ~ 75% de todos los cánceres de mama y, cuando están, se utilizan como dianas para la terapia hormonal. Se consideran presentes cuando superan el 1% de expresión en el núcleo mediante técnicas inmunohistquímicas (Hammond *et al.*, 2010) y su presencia mutua usualmente se asocia con un grado y agresividad baja de la enfermedad. No obstante, parecen ser más agresivos y responder peor a los tratamientos hormonales cuando tan solo uno de ellos está presente (Cui *et al.*, 2005; Ethier *et al.*, 2018). Se calcula que aproximadamente el 15% de los cánceres de mama sobreexpresan HER2, correspondientes al gen 17q12 (Slamon *et al.*, 1987). Son varios los sistemas de evaluación que determinan el grado de expresión de HER2 (Wolff *et al.*, 2018). Aunque existen dianas terapéuticas contra HER2, la sobreexpresión de HER2 se asocia con un pronóstico grave y evolución clínica agresiva (Bedard, Cardoso and Piccart-Gebhart, 2009). El 10-15% de cánceres restantes son los que no presentan ninguno de estos tres marcadores (ER-, PR- y HER2-) y se caracterizan por compartir un pronóstico grave exento de terapias contra los receptores anteriormente mencionados (Yam, Mani and Moulder, 2017). La figura que se muestra a continuación muestra una panorámica general de todos ellos (*Figura 7. Representación subtipos moleculares*).

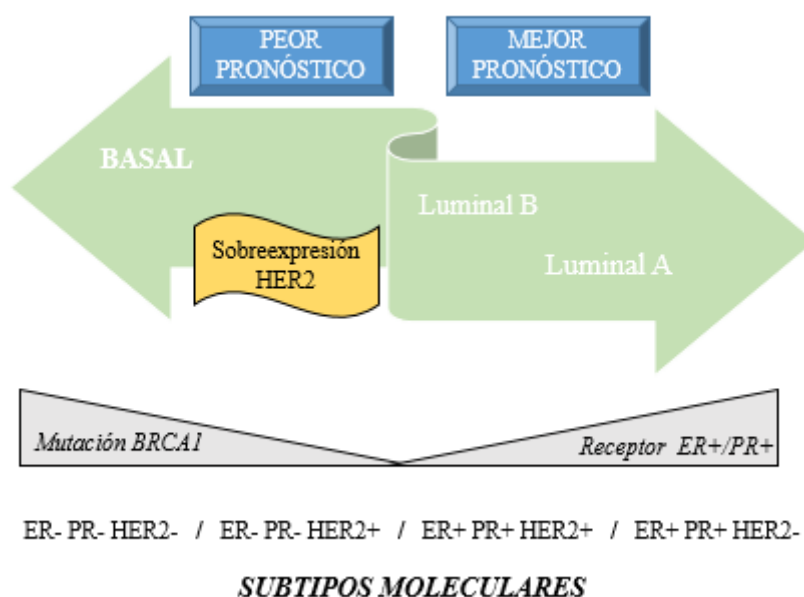


Figura 7. Representación subtipos moleculares.

Molecularmente podemos hablar de los siguientes grupos:

◆ Luminal A.

Son ER+/PR+ y, en la mayoría de casos, HER2 negativo (Pusztai *et al.*, 2006; Weigelt, Baehner and Reis-Filho, 2010). Ki67 es una proteína nuclear no histona marcadora de la proliferación

celular y estos tumores presentan $Ki67 < 13.25\%$ (Cheang *et al.*, 2009). Están débilmente asociados a la expresión de genes proliferativos (Perou *et al.*, 2000; Sørlie *et al.*, 2001, 2003) Es el grupo de cánceres de mama más comúnmente diagnosticado, entre el 40% y 50% de todos los cánceres invasivos (Voduc *et al.*, 2010). En la mayoría de los casos, presentan un grado bajo de malignidad y poseen el mejor pronóstico dentro de esta subclasificación. Clínicamente, el tratamiento hormonal *per se* logra un beneficio directo como herramienta terapéutica (Brenton *et al.*, 2005).

◆ Luminal B.

Son ER+ (en ocasiones conjuntamente PR-) (Cheang *et al.*, 2009; Ades *et al.*, 2014) y están altamente asociados a la expresión de genes proliferativos (Perou *et al.*, 2000; Sørlie *et al.*, 2001, 2003). $Ki67 > 13.25\%$ (Cheang *et al.*, 2009). Suelen asociarse a un grado mayor de malignidad y un pronóstico peor que los luminales A. Presentan una baja expresión génica relacionada con ER pero alta expresión de genes ligados a la proliferación celular, junto con una expresión génica variable concerniente a HER2, comparado con los luminales A. La terapia hormonal puede actuar conjuntamente con la quimioterapia, pero no presenta muchos beneficios por sí sola (Brenton *et al.*, 2005).

◆ HER2 sobreexpresado.

Comprende alrededor del 15% de todos los cánceres de mama invasivos. Se caracteriza por la sobreexpresión de genes de señalización HER2/HER2, localizados en el cromosoma 17q12 como GRB7 y PGAP3 (Perou *et al.*, 2000; Dai, Chen and Bai, 2014), además de presentar mutado p53 en un 40-80%. En este grupo, los tumores presentan mayormente un grado elevado de malignidad, ER-, PR- y una evolución clínica agresiva (Sørlie *et al.*, 2001, 2003; Sotiriou *et al.*, 2003). No obstante, son altamente sensibles a la terapia dirigida contra HER2 otorgando una mejora evidente. Aunque la mayoría de estos tumores (> 80%) muestran una amplificación del gen HER2 o presentan una sobreexpresión de la proteína HER2 (Provenzano, Ulaner and Chin, 2018), no todos responden clínicamente a HER2 y viceversa, es decir, existe un pequeño porcentaje de ellos que coexpresan HER2 y ER y se clasifican como tipo luminal B (Bernard *et al.*, 2009).

◆ Cáncer de mama basal (BLBC).

Son ER-y comparten una expresión génica muy similar a las células mioepiteliales/basales normales de mama, incluyendo citoqueratinas de elevada masa molecular (CK5 y CK14), P-caderina y receptor del factor de crecimiento epidermal (Perou *et al.*, 2000; Weigelt, Baehner and Reis-Filho, 2010). Presentan sobreexpresión de los genes relacionados con la proliferación celular, pero con ausencia de aquellos asociados a ER, PR y/o HER2. Constituyen el 60-90% de

todos los casos triple negativos (Fan *et al.*, 2006). Histológicamente suelen presentar un grado alto de malignidad, índice de proliferación elevado y un fenotipo de triple negativo. Tienen un pronóstico reservado y pueden recaer dentro de los primeros 5 años tras el diagnóstico (Badve *et al.*, 2011).

◆ Tipo normal (normal-like).

Los cánceres de mama que surgen como consecuencia de la mutación en BRCA1 se asocian a este subgrupo (Provenzano, Ulaner and Chin, 2018). Son ER- y están caracterizados por una expresión génica similar a la encontrada en células sanas de epitelio mamario. Se pueden dividir en BL1 y BL2. En el primer caso (BL1) se relacionan con un aumento de genes responsables de la proliferación y en el segundo caso, BL2, se relacionan con las señalizaciones del receptor del factor de crecimiento y presentan peor respuesta al tratamiento que BL1 (Masuda *et al.*, 2013). Es un subgrupo controvertido y, en algunos casos, han sido considerados como artefactos atribuidos a la contaminación de células de epitelio sanas con células de baja malignidad contenidas en un tumor mamario (Peppercorn, Perou and Carey, 2008).

La variabilidad génica heredada y la adquisición de aberraciones genómicas pueden contribuir en gran medida a la carcinogénesis debido a la variación genética expresada. Si bien los genes que con mayor frecuencia mutan en cáncer de mama son p53, PIK3CA, GATA3, MYC, CCDN1, PTEN, FGFR1, RB1, ERBB2 y MAP3K1 (Nik-Zainal *et al.*, 2016; Pereira *et al.*, 2016), sólo p53, PIK3CA y GATA3 han mostrado una incidencia superior al 10% (Koboldt *et al.*, 2012). Para entender estas aberraciones, como cambios en la expresión genética dentro de esta clasificación molecular anteriormente expuesta, el Consorcio Internacional de Cáncer de Mama de Taxonomía Molecular (METABRIC) integró en un mismo análisis más de 2000 alteraciones génicas y perfiles de expresión genéticos (Curtis *et al.*, 2012). Como resultado, 10 subgrupos (IntClust, “*integrative clusters*”) se integraron y asociaron según las distintas aberraciones en el número de copias y de los cambios de expresión genética. Los hallazgos en los diferentes IntClust han sido validados por otros autores (Ali *et al.*, 2014) y, a continuación, destacaremos algunos de ellos. Así, IntClust 1, 2, 3, 6, 7 y 8 son eminentemente ER+ y subtipo luminal. IntClust 1 generalmente es subtipo luminal B y presenta un pronóstico intermedio caracterizado por la amplificación del gen 17q23. Además, es frecuente encontrar mutaciones en GATA3, distinguiéndose de otros tumores luminal B. IntClust 2 incluye a los subtipos luminal A y B y muestra amplificados el gen 11q13/14, la región de genes de resistencia conocida como CCND1 (11q13.3), EMSY (11q13.5), PAK1 (11q14.1) y RSF1 (11q14.1). Este IntClust se asocia con los procesos tumorales mamarios con peor pronóstico dentro de los subtipos luminal. IntClust 3, 7 y 8 están mayoritariamente

integrados en el cáncer luminal A y presentan un buen pronóstico. Mientras que IntClust 3 posee pocas alteraciones genómicas y es uno de los subgrupos de mayor prevalencia, IntClust 7 y 8 incorporan un nivel intermedio de alteraciones genéticas. IntClust 6 abarca al luminal A y B, tiene un pronóstico intermedio y presenta una ampliación específica en el locus 8p12. IntClust 4, 5 y 9 pueden presentarse en los subtipos luminal A y no luminal. Tanto IntClust 4 como el 3 son altamente frecuentes. No obstante, IntClust 4 exhibe una extensa infiltración linfocítica. IntClust 5 presenta altos niveles amplificados en 17q12 abarcando el subtipo luminal B y HER2 sobreexpresado. Son varios los subtipos en los que se presenta IntClust 9, caracterizándose por un pronóstico intermedio de la enfermedad. IntClust 10 está en su mayoría en el subtipo BLCC, tiene una alta inestabilidad genómica y raramente muestra niveles altos de amplificaciones. Todos ellos quedan resumidos en la “*Tabla 3. Resumen de las características principales del subtipo molecular*”.

SUBTIPO INTRÍNSECO	PERFIL MOLECULAR	PERFIL GENÉTICO	PERFIL INMUNO-HISTOQUÍMICO	PERFIL ADN		IntClust	PRONÓSTICO
				Amplificación	IntClust		
<i>Luminal A</i>	Alta expresión de genes epiteliales luminales y genes asociados a ER-.	Mutaciones en PIK3CA, MAPK3K1 y GATA3.	ER+, PR ≥20%, HER2-, Ki67 bajo.	Amplificación 11q133/14	IntClust 2	Malo.	
				Inestabilidad génica baja.	IntClust 3	Buena.	
				-	IntClust 4	Buena.	
				Amplificación 8p12.	IntClust 6	Intermedia.	
				Amplificación 8q.	IntClust 7	Buena.	
<i>Luminal B</i>	Baja expresión de genes epiteliales luminales y genes asociados a ER-. Mayores niveles de proliferación y de genes asociados a HER2.	Similar al luminal A pero con mayor P53.	ER+, PR < 20% / o HER2+ / o Ki67 alto.	Amplificación 17q23. Mutación GATA3.	IntClust 1	Intermedia.	
				Amplificación 11q133/14	IntClust 2	Malo.	
				Amplificación HER2.	IntClust 5	Malo.	
				Amplificación 8p12.	IntClust 6	Intermedia.	
				Amplificación 20q.	IntClust 9	Intermedia.	
<i>HER2 sobreexpresado</i>	Baja expresión de los genes asociados a ER-. Alta expresión de genes asociados a HER2.	Amplificon HER2 y señalización EGFR/HER2.	ER-, PR- y HER2+.	Amplificación HER2.	IntClust 5	Malo.	
				Elevadas alteraciones genéticas.	IntClust 10	Malo.	
<i>BLBC</i>	Alta expresión de genes proliferativos y de epitelio basal. Baja expresión de genes asociados a ER- y HER2-.	Mutación TP53. Pérdida de BRCA1. Alta señalización PI3K7/AKT.	ER-, PR- y HER2-.	-	IntClust 4	Buena.	

Tabla 3. Resumen de las características principales del subtipo molecular (Tsang and Tse, 2020).

2.1.3. – Pronóstico del cáncer de mama.

Se puede entender como factores pronósticos aquellos que ayudan a la valoración de los tratamientos más adecuados según las características presentes en cada tipo de cáncer de mama. La clasificación de la enfermedad en diferentes grados es un pronóstico muy útil, que se utiliza rutinariamente como pieza integral en la toma de decisiones médicas y/o quirúrgicas, siendo uno de los más utilizados el índice pronóstico de *Nottingham* (Mook *et al.*, 2009). En dicha clasificación se tienen en cuenta las características transcripcionales y genéticas (Ivshina *et al.*, 2006; Sotiriou *et al.*, 2006; Sotiriou and Pusztai, 2009; Weigelt, Baehner and Reis-Filho, 2010). Esta aproximación a la enfermedad abarca desde el punto de vista histopatológico y la diferenciación de túbulo hasta el pleomorfismo nuclear y la proliferación celular, entendida como índice mitótico. Estas características, junto con las modificaciones de la clasificación *Scarff Bloom Richardson* ampliamente aceptadas, evalúan cada proceso con una puntuación numérica de 1 a 3, obteniendo la suma total como valor pronóstico de cada tumor de mama.

La clasificación TNM publicada por el Comité Conjunto Americano del Cáncer (AJCC) evalúa conjuntamente la información clínica y patológica a través del estudio del tamaño del tumor (T) (TX, Tis, T1, T2, T3, T4; ver *Tabla 4*), la situación de los linfonodos regionales (N) (NX, N0, N1, N2, N3; ver *Tabla 5*) y las metástasis distales (M) (M0, cMo(i+), M1; ver *Tabla 6*). Esta clasificación subdivide en 5 grados la enfermedad (0, I, II, III y IV). Además, tiene en cuenta la caracterización de los marcadores histopatológicos más utilizados (PR, ER, HER2) (Hammond *et al.*, 2010; Weiss *et al.*, 2018) Este sistema supera las limitaciones de otros anteriores, ya que atiende a parámetros biológicos y anatómicos con valor predictivo y de pronóstico, proporcionando una mayor certeza si se compara con otros (Weiss *et al.*, 2018).

Clasificación TNM. TUMOR (T).	
TX → Tamaño del tumor no evaluado.	T2 → Ancho del tumor ≥ 2 cm y ≤ 5 cm.
Tis → Carcinoma ductal <i>in situ</i> (CDIS).	T3 → Ancho del tumor ≥ 5 cm.
T1 → Ancho del tumor ≤ 2 cm.	T4 → Las dimensiones del tumor afectan otras estructuras.
T1mi (tumor ≤ 0.1 cm).	T4a (el tumor se extiende a la pared torácica).
T1a (0.1 cm ≤ tumor ≤ 0.5 cm).	T4b (el tumor se extiende a la piel y seno).
T1b (0.5 cm ≤ tumor ≤ 1 cm).	T4c (el tumor se extiende a la pared torácica y piel).
T1c (1 cm ≤ tumor ≤ 2 cm).	T4d (carcinoma inflamatorio).

Tabla 4. Clasificación TNM. TUMOR (T). (American Joint Committee on Cancer, 2010; Sobin, Gospodarowicz and Wittekind, 2011).

Clasificación TNM. LINFONODO (N).	
<i>NX</i> → Linfonodos no evaluados.	<i>N2</i> → Células cancerígenas en linfonodos axilares en contacto con los tejidos adyacentes.
<i>N0</i> → No células cancerígenas en linfonodos regionales.	<i>N2a</i> (metástasis en linfonodos axilares en contacto con otras estructuras).
<i>N1</i> → Células cancerígenas en linfonodos axilares pero no en contacto con los tejidos adyacentes.	<i>N2b</i> (metástasis en linfonodos mamaros internos detectados previamente).
<i>pN1mi</i> (linfonodos con micrometástasis).	<i>N3</i> → Células cancerígenas en estructuras no adyacentes.
<i>pN1a</i> (1-3 linfonodos con metástasis con al menos 1 con tumor ≥ 2 mm).	<i>N3a</i> (metástasis en linfonodos debajo de la clavícula).
<i>pN1b</i> (metástasis en linfonodos mamaros internos, no detectados previamente).	<i>N3b</i> (metástasis en linfonodos axilares y debajo del esternón).
<i>pN1c</i> (1-3 linfonodos con metástasis en axilares y mamaros profundos).	<i>N3c</i> (metástasis en linfonodos debajo de la clavícula).

Tabla 5. Clasificación TNM. LINFONODO (L). (American Joint Committee on Cancer, 2010; Sobin, Gospodarowicz and Wittekind, 2011).

Clasificación TNM. METÁSTASIS (M).		
<i>M0</i> → No signos de expansión del cáncer.	<i>cMo(i+)</i> → No signos de expansión del cáncer pero detectado laboratorialmente.	<i>M1</i> → Metástasis a otras regiones corporales.

Tabla 6. Clasificación TNM. METÁSTASIS (M). (American Joint Committee on Cancer, 2010; Sobin, Gospodarowicz and Wittekind, 2011).

Si dividimos la enfermedad en 5 grados o etapas, apoyándonos en toda la información anteriormente expuesta, obtenemos la reclasificación numérica siguiente (American Joint Committee on Cancer, 2010; Sobin, Gospodarowicz and Wittekind, 2011).

- ◆ Estadio 0: Son procesos tumorales en los que no ha habido una invasión a otros tejidos. Esta enfermedad es *in situ*, siendo el CDIS el que engloba la mayoría de los diagnósticos.
- ◆ Estadio 1: Se aprecia en este punto el cáncer, pero está definido en el tejido mamario o bien en un linfonodo cercano al seno. Se trata de una de las fases más tempranas del cáncer de mama. A su vez, puede dividirse en estadio 1A cuando el tumor es ≤ 2 cm y no hay afectación más allá del seno mamario; y en estadio 1B cuando hay afectación de linfonodos cercanos a la mama y en el seno no hay tumor o uno ≤ 2 cm.
- ◆ Estadio 2: En esta ocasión el cáncer está tanto en el seno como en los linfonodos cercanos a él. Continuamos dentro de las fases iniciales del proceso cancerígeno y, del mismo

modo que en apartado anterior, habrá una subclasificación en: estadio 2A si $2\text{ cm} \leq \text{tumor} \leq 5\text{ cm}$ y no hay afectación en ningún linfonodo, o bien, no hay tumor o tumor $\leq 2\text{ cm}$ junto con afectación de 1-3 linfonodos axilares y/o próximos al esternón; estadio 2B si tumor $\geq 5\text{ cm}$ sin afectación de ningún linfonodo, o si $2\text{ cm} \leq \text{tumor} \leq 5$ afectándose de 1-3 linfonodos axilares y/o próximos al esternón.

- ◆ **Estadio 3:** Se podría explicar cómo una fase progresiva y localizada del cáncer, es decir, existe un avance del proceso tumoral afectando a regiones adyacentes como linfonodos del propio seno, piel de la mama o pared torácica. En este caso también vamos a subclasificar este proceso en 3 subgrupos. En el estadio 3A se incluyen los procesos tumorales en los que no se ha detectado tumor en el seno, pero hay afectación de entre 4-9 linfonodos axilares y/o adyacentes al esternón, o aquellos procesos con un tamaño tumor ≥ 5 con afección de linfonodos axilares y/o adyacentes al esternón. Nos hallaremos en el subestadio 3B si el tumor ha invadido la piel de la mama o la pared torácica (costillas, músculos, piel o tejido conectivo). Pueden aparecer hinchazón, inflamaciones y úlceras, como en los casos de cáncer de mama inflamatorio (CMI). También puede presentar afectación de hasta 9 linfonodos circundantes. El siguiente subgrupo es el subestadio 3C al detectarse un tumor de cualquier tamaño en el seno, o no detectarse (CMI), unido a hinchazón/úlceras en la mama (puede haber afectación de las estructuras de la pared torácica) y tener, además, una de estas afecciones: ≥ 10 linfonodos axilares afectados, linfonodos afectados alrededor de la clavícula o afectación de linfonodos axilares y cerca del esternón.
- ◆ **Estadio 4:** Fase final de la enfermedad. En este punto se ha producido una extensión del tumor a otras regiones corporales distantes. Se le denomina cáncer avanzado, cáncer mamario secundario o cáncer de mama metastático. En esta fase, el cáncer se considera incurable y podemos encontrar tumores de cualquier tamaño, linfonodos en mayor o menor grado de afectación y metástasis en otras partes del cuerpo, normalmente cerebro, pulmón, hígado y hueso.

A continuación, se presenta la tasa de supervivencia durante los 5 años consecutivos al diagnóstico de cáncer de mama de una población de mujeres de Reino Unido desde 2013 hasta 2017 en la “*Figura 8. Tasa de supervivencia a 5 años desde su diagnóstico de una población de mujeres en Reino Unido*” (Cancer Statistics in the UK, 2020).

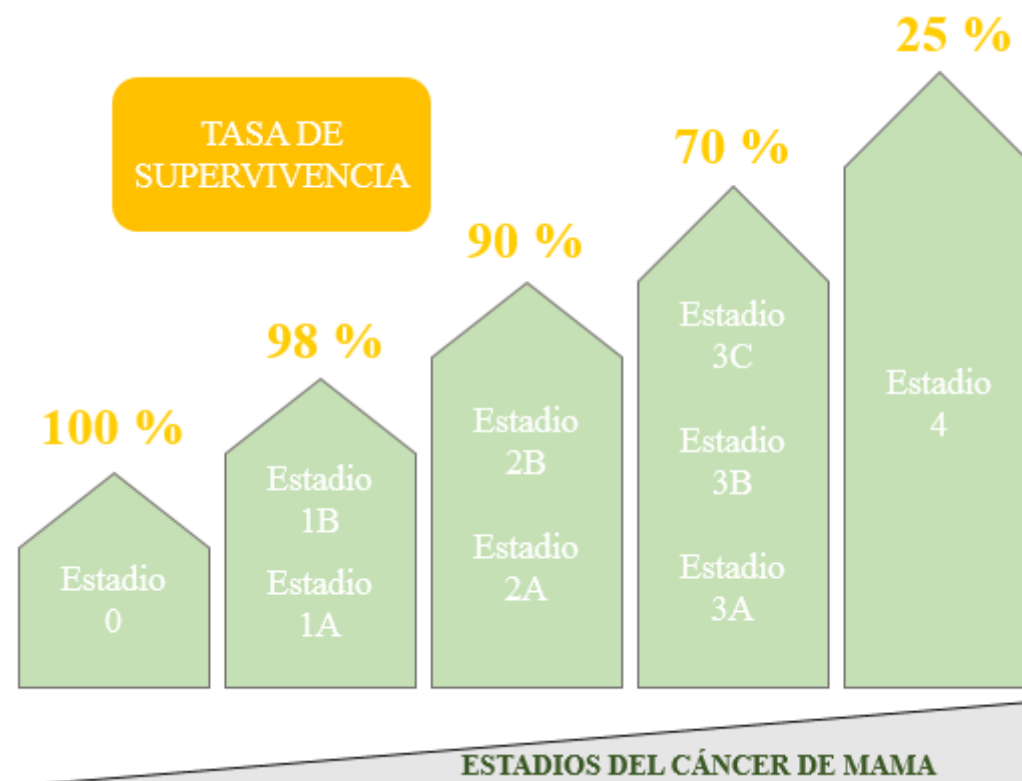


Figura 8. Tasa de supervivencia a 5 años desde su diagnóstico de una población de mujeres en Reino Unido (Cancer Statistics in the UK, 2020).

2.2. HOMEOSTASIS DEL ION CALCIO (Ca^{2+}) INTRACELULAR.

El Ca^{2+} es uno de los mensajeros intracelulares más universales que interviene en el control de la célula desde el proceso de fertilización hasta la muerte celular programada o apoptosis. Entre estos dos momentos, está directa o indirectamente implicado en otros procesos como el crecimiento celular, la proliferación, la expresión génica, la motilidad celular, la contracción muscular, el metabolismo y actividad enzimática, la regulación de ATPasas y citoesqueleto, la secreción y agregación plaquetaria y procesos de quimiotaxis (Berridge, Bootman and Roderick, 2003; Parkash and Asotra, 2010; Berridge, 2012; Islam, 2020). Para un número cada vez mayor de procesos biológicos, se han encontrado cambios espaciotemporales definidos por las concentraciones de Ca^{2+} citoplasmático y/o en orgánulos celulares. En las células eucariotas, es uno de los segundos mensajeros intracelulares ubicuos más abundante y secretados como consecuencia de diferentes procesos asociados a su transporte en la membrana plasmática o en los orgánulos intracelulares, aunque también puede intervenir como primer mensajero en señalizaciones intracelulares de calcio.

La concentración de calcio citoplasmático $[\text{Ca}^{2+}]_c$ es hasta 20.000 veces menor que la existente en el exterior celular (Bagur and Hajnóczky, 2017). Debido a la acción en la membrana plasmática

de ATPasas transportadoras de Ca^{2+} (PMCA), los intercambiadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) y las proteínas de unión a Ca^{2+} , las concentraciones de Ca^{2+} citoplasmáticas en células no excitables se sitúan en torno a 10-100 nM, muy por debajo de la concentración sanguínea (5 mM) (Berg, Tymoczko and Stryer, 2002) y extracelular (~ 1.2 mM) (Bygrave and Benedetti, 1996). Determinados estímulos externos hacen responder a las células mediante un aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_e$ en forma de oscilaciones de Ca^{2+} que regulan, a su vez, diferentes proteínas y desencadenan números procesos (Figura 9. Principales mecanismos celulares implicados en la regulación del Ca^{2+} intracelular).

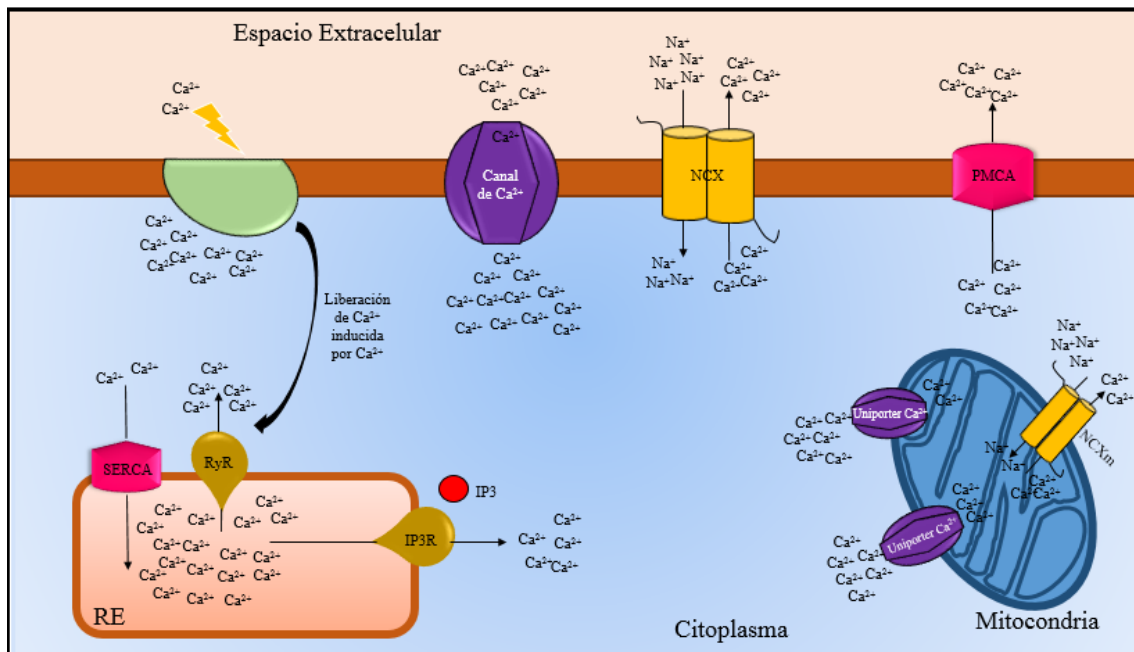


Figura 9. Principales mecanismos celulares implicados en la regulación del Ca^{2+} intracelular.

La concentración intracelular de Ca^{2+} varía según su localización. Así, la concentración citoplasmática en células en reposo es del orden de 10-100 nM, similar a las encontradas en la matriz nuclear y mitocondrial – hasta 0.5-1 mM en el interior mitocondrial según (Montero *et al.*, 2000; De La Fuente *et al.*, 2012) –. Sin embargo, existen pequeños reservorios de Ca^{2+} que pueden almacenar y mantener altas concentración de este ion en el interior celular en valores de 0.5-2 mM (De la Fuente *et al.*, 2013). El principal reservorio es el retículo endoplásmico (RE) y, en células musculares, el retículo sarcoplásmico (Morgan *et al.*, 2011), aunque también pueden encontrarse en mitocondria, gránulos de secreción y núcleo (Putney, 1999). Si se eleva la $[\text{Ca}^{2+}]_e$, la ATPasa del retículo sarcoendoplásmico (SERCA) rellena los reservorios de Ca^{2+} reticulares y, en menor medida, el uniportador mitocondrial de Ca^{2+} (MCU) aumenta la concentración de Ca^{2+} en la mitocondria, manteniéndose bajo control la homeostasis de la $[\text{Ca}^{2+}]_e$.

No obstante, una gran variedad de estímulos (despolarizaciones de membrana, moléculas de señalización extracelular, mensajeros intracelulares...) pueden promover un incremento súbito en

la $[Ca^{2+}]_c$ desde 10-100 nM hasta $\geq 1 \mu M$ (Bagur and Hajnóczky, 2017). Esta subida se caracteriza por la entrada masiva de iones Ca^{2+} del medio extracelular, vía canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática (MP), o bien mediada por los reservorios intracelulares, vía receptor 1,4,5-trifosfato (IP_3R) y receptor de rianodina (RyR), mayoritariamente desde el retículo endoplásmico (RE). El aumento en la $[Ca^{2+}]_c$ suele ser abrupto, seguido de una disminución en la $[Ca^{2+}]_c$, mediante múltiples mecanismos de retroalimentación positiva y negativa que armonizan, en perfecta sincronía, la homeostasis de Ca^{2+} hasta sus valores iniciales. Las proteínas implicadas en este proceso van a presentar diferentes umbrales de actividad dependiendo de su función. Así, por ejemplo, las bombas PMCA y SERCA responden a moderadas elevaciones de la $[Ca^{2+}]_c$ y restablecen las concentraciones en reposo, ya que presentan alta afinidad por el ion Ca^{2+} y baja tasa de bombeo (~ 30 y ~ 10 Hz, respectivamente) (Lytton *et al.*, 1992; Juhaszova *et al.*, 2000), mientras que NCX y MCU muestran menor afinidad para el Ca^{2+} y mayor bombeo, 150-300 Hz para NCX (Boyman *et al.*, 2009), limitando amplias oscilaciones en la $[Ca^{2+}]_c$. Cada tipo celular presenta, por consiguiente, una combinación única y definida de canales y bombas para caracterizar una señal de Ca^{2+} intracelular adaptada a sus necesidades fisiológicas (Berridge, Lipp and Bootman, 2000).

La vía más común que ejerce un incremento en la $[Ca^{2+}]_c$ es la activación de la fosfolipasa C (PLC) como se muestra en la *figura 10*. Son varios los receptores de la superficie celular, receptores acoplados a proteínas G y receptores tirosina cinasa (RTK), los que activan a distintas isoformas de la PLC. Tras su activación, la PLC hidroliza el fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP_2) dando lugar a los segundos mensajeros inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG) (Michell, 1975; Berridge, 1984) que activan la proteína cinasa C (PKC) (Nishizuka, 1992). El inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) activa el receptor del 1,4,5-trifosfato y se libera Ca^{2+} desde el RE. El Ca^{2+} se une al dominio C2 de los subtipos $PKC\alpha$, $\beta 1$, $\beta 2$ y γ e inicia una translocación a la membrana para coincidir en el sitio activo de unión de DAG en la PKC (Maeda, Niinobe and Mikoshiba, 1990). La DAG cinasa (DGK), fosforila a DAG en ácido fosfatídico y la fosfolipasa A2 (PLA2), por su parte, puede liberar al ácido araquidónico (AA) de la MP, generándose, entre otras, una gran cantidad de moléculas bioactivas (Berridge, 2012). Además de mediar la liberación de calcio en estas células, los receptores 1,4,5-trifosfato forman homotetrámeros y heterotetrámeros para interactuar con más de 100 proteínas y moléculas de señalización, entrelazando diferentes vías integradas en procesos de apoptosis, autofagia y desarrollo del cáncer.

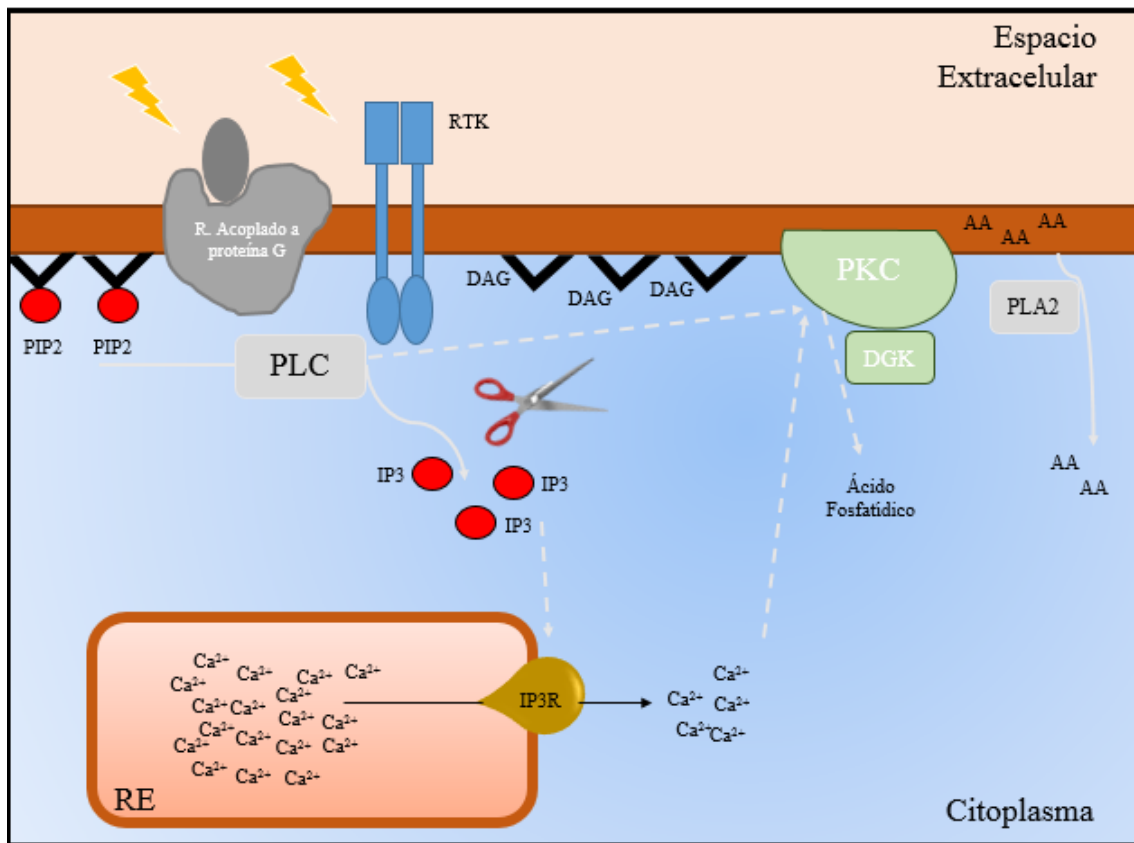


Figura 10. Representación esquemática de la vía de activación de la fosfolipasa C (PLC) en la célula.

La ruta de señalización de Ca^{2+} comprende los siguientes pasos: estímulo de partida que iniciará la señalización de Ca^{2+} , activación sucesiva de los diferentes mecanismos que aumentan la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, activación de los procesos celulares asociados a tal aumento y, finalmente, la activación de los mecanismos que ayudan a restablecer la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (Berridge, 2001). El incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ presenta una gran variabilidad en cuanto a la velocidad, amplitud y patrón espacio-temporal, aportando una infinidad de respuestas celulares (Bootman *et al.*, 2001) que, junto con los mecanismos de restauración de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, se integrarán en la biología celular.

2.2.1. – Mecanismos que aumentan la $[\text{Ca}^{2+}]_c$.

Gracias a una serie de canales de membranas, entre otros, van a existir mecanismos que contribuyen a la entrada del ion Ca^{2+} desde el medio extracelular hasta el citoplasma o bien desde reservorios internos. Pueden aparecer sobreexpresados en la mayoría de tipos celulares, especialmente en los tejidos excitables. Comprenden una gran familia de genes, todos ellos altamente relacionados entre sí y sumamente complejos. A su vez, estos mecanismos pueden dividirse en dos grandes grupos, aquellos que aumentan la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ desde el exterior celular o bien lo hacen desde los reservorios intracelulares.

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

La entrada de calcio desde el medio extracelular a través de canales de membrana es esencial para las diferentes actividades fisiológicas de la célula. En muchas ocasiones, la liberación por parte de los reservorios intracelulares es insuficiente y la suma del gradiente, abrupto y súbito, por parte de los mecanismos de membrana es primordial. Cada uno de estos mecanismos presenta unas propiedades biofísicas propias y nos permiten clasificarlos a continuación: (*Figura 11. Mecanismos responsables de la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular*):

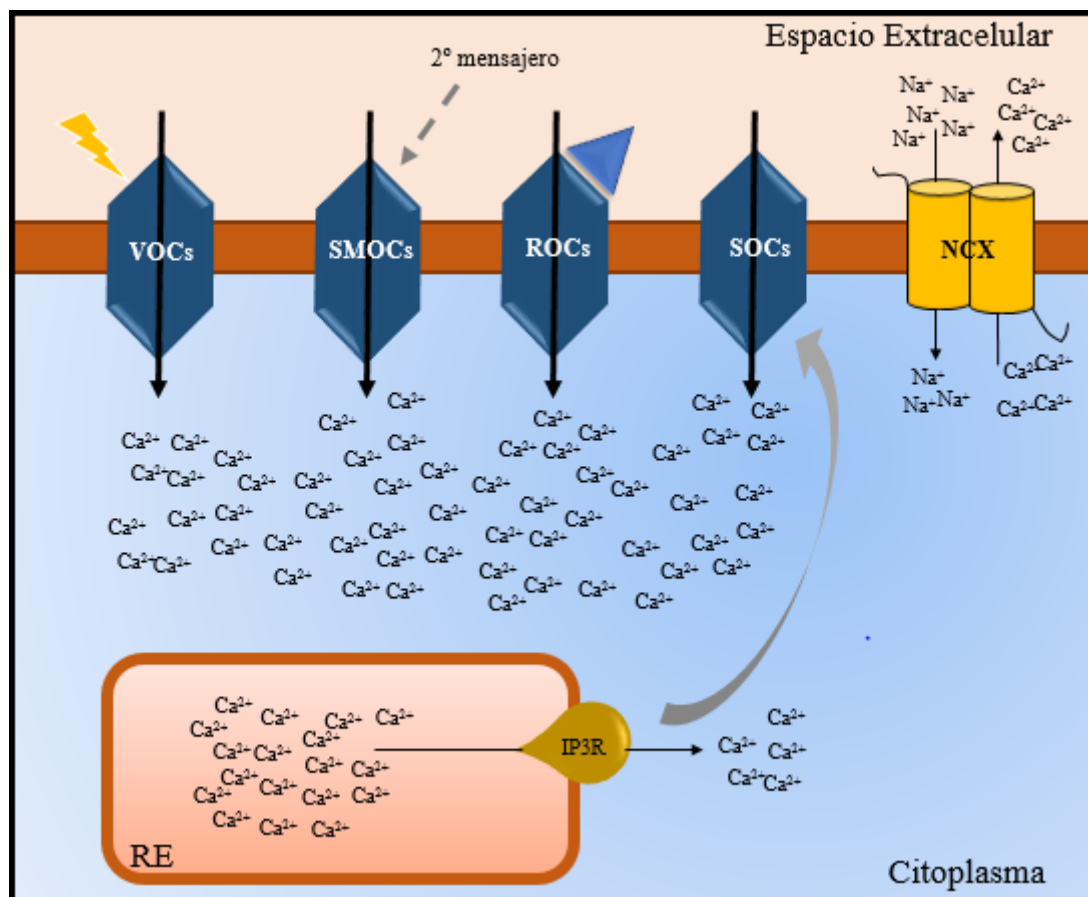


Figura 11. Mecanismos responsables de la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular.

◆ Entrada de Ca^{2+} a través de canales iónicos activados por voltaje (VOCs).

Una vez se produce la despolarización de la membrana, el Ca^{2+} que ingresa a la célula a través de canales de Ca^{2+} activados por voltaje sirve como el segundo mensajero de la señalización eléctrica, iniciando muchos eventos celulares diferentes (Catterall, 2011). Estos canales son efectores muy necesarios para los incrementos transitorios del Ca^{2+} en el interior celular. Abundan y están muy bien caracterizados. Se definen por ser altamente selectivos al Ca^{2+} , lo que hace que sean más permeables si se compara con otros iones del entorno (Na^+ y K^+). Forman complejos de 5 subunidades ($\alpha 1$, $\alpha 2$, β y δ) codificadas por diferentes genes y se dividen en subfamilias cuyas funciones varían según su implicación biológica (Dolphin, 2006; Catterall, 2010; Brini *et al.*,

2013). Se ha observado que los VOCs tipo T (Cav3.1) integran parte de la proliferación y apoptosis en un tipo de células luminal B (Ohkubo and Yamazaki, 2012). Otros miembros de esta familia, Cav1.2, se han asociado a la apertura de los canales implicados en el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} , regulado por la región SOAR de STIM1 (Wang *et al.*, 2010). En células no excitables, los VOCs generalmente están ausentes (Parekh and Penner, 1997; Parekh and Putney, 2005) y la entrada de Ca^{2+} se produce a través de canales iónicos activados por segundos mensajeros (SMOC), por receptor (ROC) o por el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} (SOC). Muchos de estos canales pertenecen a la familia de los receptores de potencial transitorio (TRPs) (Clapham, Runnels and Strübing, 2001; Minke and Cook, 2002; Montell, Birnbaumer and Flockerzi, 2002; Vennekens *et al.*, 2002). De ellos, algunos de los más importantes son: la subfamilia canónica (TRPC), la subfamilia vaniloide (TRPV) y la subfamilia de melastatina (TRPM). En general, estos TRP tienden a tener conductancias bajas, actuando de manera prolongada y sostenida en el tiempo sin aumentar abrupta y exponencialmente la concentración de Ca^{2+} en el interior celular (Berridge, Bootman and Roderick, 2003).

◆ Entrada de Ca^{2+} a través de canales iónicos activados por segundos mensajeros (SMOCs).

La apertura del canal está controlada por un mensajero citosólico cuya producción es el resultado de la interacción previa ligando-receptor (Meldolesi and Pozzan, 1987). Fisiológicamente podemos encontrar algunos ejemplos, como son los canales dependientes de nucleótidos cíclicos que se encuentran en los sistemas sensoriales (Motiani, Stolwijk, *et al.*, 2013) o la activación de canales Orai regulado por la señalización intracelular del ácido araquidónico (Newton, Bootman and Scott, 2016). De la misma forma, actuarían el IP_4 en células endoteliales, la PKC en plaquetas o el DAG en diversos modelos celulares (Irvine, McNulty and Schell, 1999; Rosado and Sage, 2000). Este último induce la apertura de canales TRPC3 y TRPC6 tras la activación previa de receptores de membrana.

◆ Entrada de Ca^{2+} a través de canales iónicos activados por receptor (ROCs).

En ella participan los canales que se abren directamente como respuesta a la unión de un ligando externo y, además, permiten la entrada de Ca^{2+} . Aunque su activación es directa, sin la intervención de un segundo mensajero citosólico, la modulación/regulación por otros mensajeros no puede ser excluida. Este tipo de respuesta es rápida, como ocurre en la transmisión sináptica (Tsien and Tsien, 1990). Alguno de los ejemplos fisiológicos más relevantes son los siguientes: los receptores ionotrópicos para el glutamato (Kennedy, 2016), los receptores purinérgicos, tales como los que expresan las plaquetas (P-2X₁ y P-2X₇) que se abren al ser activados por ADP o ATP (Berridge, Bootman and Roderick, 2003; Gachet, 2008) y los receptores nicotínicos de la acetilcolina (nAChRs) que lo hacen al unirse a acetilcolina o nicotina, entre otros agonistas

conocidos (Purves *et al.*, 2008). Los receptores ionotrópicos para el glutamato son de vital importancia en la transmisión de la excitación nerviosa en el cerebro de los mamíferos. El glutamato activa dos tipos de receptores, los receptores metabotrópicos (mGluRs) y los ionotrópicos (iGluRs). Estos últimos, iGluRs, son canales catiónicos ligando-receptor no selectivos clasificados según la afinidad a distintos ligandos además del glutamato: AMPA (ácido 2-amino-3-hidroxi-5-letil-4-isoxazolepropiónico), NMDA (N-metil-D-aspartato) y KA (kainato) (Brini *et al.*, 2013).

- ◆ Entrada de Ca^{2+} a través de canales iónicos activados por el vaciamiento de los depósitos intracelulares (SOCs).

Es un mecanismo ubicuo que permite la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana desde el medio extracelular como respuesta a una depleción previa de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} , principalmente del RE. Este mecanismo fue inicialmente descrito en células no excitables, pero también se encuentran en algunas excitables como neuronas y células del músculo esquelético. En células no excitables es el mayor mecanismo de entrada de Ca^{2+} al interior celular y, como tal, será analizado en profundidad más adelante.

2.2.1.b. Salida de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares.

Las células presentan una variedad de canales, bombas y efectores que mantienen la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en ~ 100 nM. En muchos casos, se producirá un incremento por la apertura de canales presentes en los reservorios celulares. Esta liberación caracteriza a la célula con uno de los principales mecanismos de señalización metabólica controlada por el Ca^{2+} *per se* o por una variedad de segundos mensajeros (Bootman, Berridge and Roderick, 2002) como el IP_3 , ADP ribosa cíclica (cADPR), nicotinato de adenina dinucleótido fosfato (NAADP) y esfingosina-1-fosfato (S1P), que tanto estimulan como modulan la liberación desde canales situados en los reservorios internos, principalmente localizados en RE, Golgi y organelas acídicas del sistema endosomal (Bootman, Berridge and Roderick, 2002). Estos canales incluyen desde IP_3 Rs que responden a IP_3 (previa hidrólisis de PIP_2) (Parys and De Smedt, 2012), RyR (Belevych *et al.*, 2013), y los canales que responden a nicotinato de adenina dinucleótido fosfato (NAADP) (Galione, 2011), entre otros (ver *Figura 12. Mecanismos responsables de la entrada de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares*).

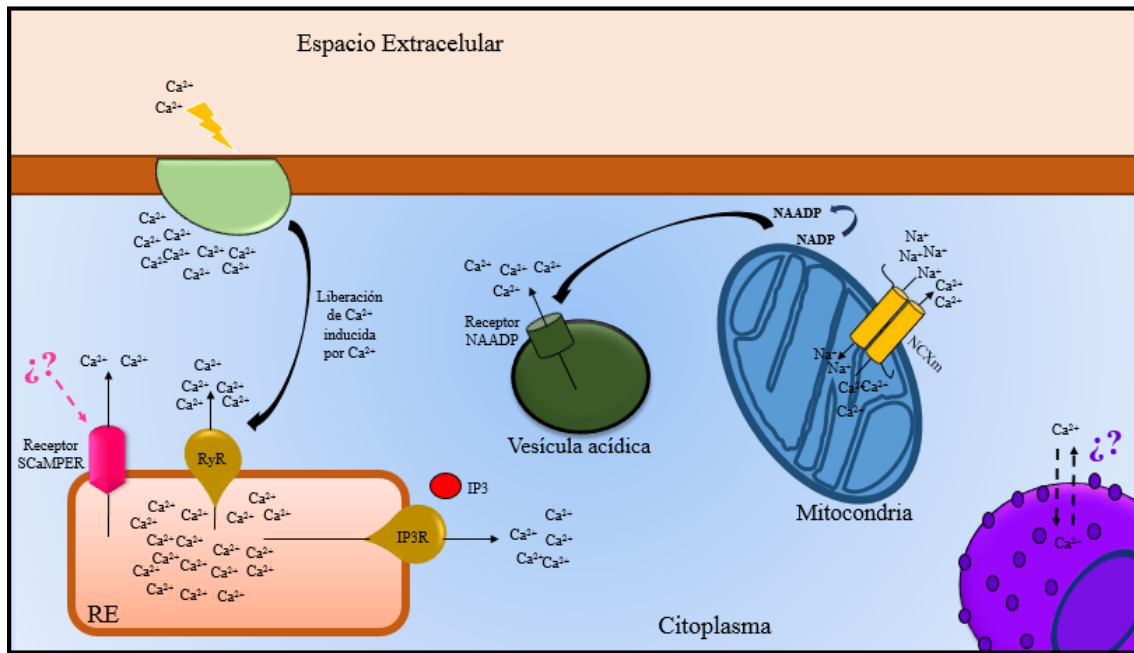


Figura 12. Mecanismos responsables de la entrada de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares.

◆ Receptor IP_3 (IP_3R).

La señal inicial se desencadena desde receptores acoplados a proteína G (p.ej. receptores de histamina) y receptores con actividad tirosina cinasa (RKT) (p.ej. receptores de factor de crecimiento epidermal). Esto resulta en una activación de distintas isoformas de la PLC que escinde fosfolípidos de membrana para generar IP_3 y DAG. En el caso de la señal desencadenada por el receptor asociado a proteína G, la hidrólisis lipídica es mediada por la $PLC\beta$; mientras que en la desencadenada por los RKT, la hidrólisis la lleva a cabo la $PLC\gamma$. Si el lípido hidrolizado es PIP_2 , se produce IP_3 (Tsui and York, 2010). El sensor de DAG es un pequeño dominio globular denominado C1, originalmente identificado en la PKC (Colón-González and Kazanietz, 2006). La familia PKC está codificada en 15 genes en humanos y se agrupa en 5 subfamilias (clásicas, nuevas, atípicas, asociadas a PKD y asociadas a PKN) (Mellor and Parker, 1998). Las isoformas convencionales de la PKC requieren la presencia coordinada del Ca^{2+} (dominio C2) y el DAG (dominio C1) para su activación. Así, la hidrólisis de PIP_2 proporciona Ca^{2+} que se une al dominio C2 y recluta PKC citosólica hasta la membrana plasmática, donde se le une el segundo mensajero DAG incrustado en la membrana a través de su dominio C1, permitiendo que PKC fosforile sustratos y transmita señales (Newton, Bootman and Scott, 2016).

El IP_3R se encuentra localizado en la membrana del RE y, en menor medida, en la membrana nuclear, en el aparato de Golgi y en vesículas secretoras ácidas. Está codificado por 3 genes y constituido por homo o heterotetrámeros de gran tamaño (2700 residuos) (1.2×10^6 Da) que se incrustan en la membrana con una región hidrofóbica formada por seis hélices responsables de la

agregación de las cuatro subunidades necesarias para formar el canal activo (Chadwick, Saito and Fleischer, 1990; Taylor and Richardson, 1991; Bosanac *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2010). Consta de un dominio de unión N-terminal (≈ 500 residuos), un dominio de regulación (≈ 1600 residuos) que contiene, entre otros, dos sitios de unión de ATP y los dominios de unión para la calmodulina y la proteína de unión a FK-506, y un dominio iónico C-terminal (≈ 450 residuos) que une al receptor IP_3 a la membrana plasmática (Wu *et al.*, 2002). La región N-terminal y C-terminal de la proteína están en la cara citosólica (Brini *et al.*, 2013). La mitad de los canales se abren con concentraciones de $IP_3 < 1 \mu M$. Además, los IP_3R también están regulados por ATP de manera bifásica ya que bajas concentraciones de ATP disminuyen la actividad del canal y altas concentraciones la aumentan (Betzenhauser *et al.*, 2008). Con respecto a la calmodulina y a FK-506 muestra estrechas uniones y también han sido relacionadas directamente con canales activados por el vaciamiento de los depósitos de Ca^{2+} (Yule, 2001; Schuster, Marhl and Höfer, 2002).

◆ Receptor de rianodina (RyR).

El receptor de rianodina (RyR) funciona como un canal de liberación intracelular de Ca^{2+} que responde a incrementos locales en la concentración de Ca^{2+} . Están codificados por tres genes diferentes con un patrón de expresión variable. Así, RyR1 se expresa en el músculo esquelético, RyR2 en el corazón, neuronas de Purkinje (cerebelo) y córtex cerebral, y RyR3 es más ubiqüo. En general se presentan en RE con una estructura y función similar a IP_3R . RyR forma homotretámeros conformando un gran canal ($> 2 \times 10^6$ Da) (Zalk *et al.*, 2015; Bai *et al.*, 2016; des Georges *et al.*, 2016). El dominio C-terminal forma el poro y una región citosólica contiene el sitio de unión de los diferentes moduladores de RyR. Su actividad va a estar regulada por una gran variedad de moléculas como rianodina (altas concentraciones), cADPR, cafeína, PKA, proteínas de unión FK506, calmodulina, proteína cinasa II calmodulina-dependiente/ Ca^{2+} , calsequestrina, triadina, junctina, Mg^{2+} , ATP y Ca^{2+} *per se* (liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} -CICR-) (Fill and Copello, 2002; Brini *et al.*, 2013). El Ca^{2+} es el agonista clásico de los RyRs. La $[Ca^{2+}]_c$ modula su activación; así, está inactivado a muy bajas concentraciones de Ca^{2+} ($\sim nM$), activo a bajas concentraciones (1-10 μM) e inactivo a altas concentraciones ($> 1 mM$) (Bezprozvanny, Watras and Ehrlich, 1991).

◆ Canal proteico de liberación de Ca^{2+} mediado por esfingolípidos en el RE (SCaMPER).

Canal localizado en el sistema sarcotubular y RE que responde a derivados de esfingolípidos como la esfingosina-1-fosfato y la esfingosilfosforilcolina (Kindman *et al.*, 1994) y libera Ca^{2+} desde el RE independiente de la generación de IP_3 (Mao *et al.*, 1996). Este canal de calcio está compuesto por 181aa abarcando dos dominios transmembrana, difiriendo estructuralmente de

IP₃R y RyR. No obstante, gran parte de su funcionamiento requiere un mayor estudio al no conocerse con exactitud las condiciones fisiológicas que lo rigen (Young *et al.*, 2000).

◆ Intercambiadores de Na⁺ / Ca²⁺ mitocondriales (NCXm).

La concentración libre de Ca²⁺ dentro de la matriz mitocondrial controla la producción de ATP y otros procesos sensibles a la variación de Ca²⁺. Para alcanzar las concentraciones óptimas, existe un balance entre el flujo de Ca²⁺ hacia el interior a través del uniportador mitocondrial (MCU) y el intercambiador de Na⁺ / Ca²⁺ mitocondrial (NCXm) donde el ratio de transporte del ion Ca²⁺ a través del NCXm es significativamente menor que por el uniportador (Wingrove and Gunter, 1986a, 1986b). En 2010, se identificó un canal de la membrana interna mitocondrial de 60 kDa responsable del intercambio Na⁺ / Ca²⁺ capaz de liberar al exterior un ion Ca²⁺ e introducir tres iones Na⁺ o Li⁺ (Palty *et al.*, 2010; Marinelli *et al.*, 2014; Tsai *et al.*, 2014). No obstante, cambios en la polarización mitocondrial podrían revertir la dirección de los iones, introduciendo Ca²⁺ al interior (Samanta, Mirams and Parekh, 2018).

◆ Receptores del nicotinato de adenina dinucleótido fosfato (NAADP).

Los reservorios ácidos se componen de organelas del aparato endolisosomal y Golgi que aparecen como importantes reservorios de Ca²⁺ (Morgan *et al.*, 2011). Tanto es así que, durante su formación, pueden pasar de concentrar desde 30 μM (Morgan *et al.*, 2011) hasta los 500 – 600 μM (Christensen, Myers and Swanson, 2002; Lloyd-Evans *et al.*, 2008; Morgan *et al.*, 2011). El NAADP libera Ca²⁺ desde estos lisosomas y endosomas (Zhu *et al.*, 2010; Galione, Parrington and Funnell, 2011; Patel *et al.*, 2011; Lee, 2012) actuando a concentraciones muy bajas (~ nM) (Chini, Beers and Dousa, 1995; Hon Cheung Lee and Aarhus, 1995). El NAADP es un derivado desaminado del nicotinadenín dinucleótido fosfato (NADP) sintetizado en las mitocondrias (Liang *et al.*, 1999) que actúa de manera independiente a mecanismos asociados a CIRC (Chini and Dousa, 1996) a través de su receptor, el canal de doble poro. Este canal está compuesto por dos dominios homólogos (DI y DII), cada uno contiene 6 α-hélices transmembrana con un poro de entrada entre la quinta y la sexta (Ishibashi, Suzuki and Imai, 2000; Calcraft *et al.*, 2009). Además, estudios complementarios sugieren dos sitios de unión para el NAADP, uno inhibidor de alta afinidad y otro activador de baja afinidad (Rosen *et al.*, 2009). También se ha sugerido la participación de un intermediario entre el NAADP y sus receptores (Lee, 2012).

◆ Receptores nucleares.

La envoltura nuclear engloba a la extensión del nucleoplasma hacia el citosol y en ella se hayan presentes numerosos poros nucleares. Estas estructuras complejas forman aberturas con un

diámetro de 9 nm aproximadamente que permiten el paso de ácidos nucleicos, proteínas y otras macromoléculas. Si no existiese ningún mecanismo de cierre temporal, las concentraciones de Ca^{2+} nuclear y citosólicas se igualarían inmediatamente. Son varias las investigaciones que han comprobado la señalización de Ca^{2+} utilizando diversos indicadores (Brini *et al.*, 1993; Allbritton *et al.*, 1994) y han demostrado que la cinéticas para los aumentos de Ca^{2+} nuclear y citosólico eran indistinguibles, lo cual sugiere una difusión libre de Ca^{2+} a través de la envoltura nuclear. Además, otros grupos han encontrado IP_3R y RyR en la envoltura nuclear (Hennager, Welsh and DeLisle, 1995; Santella and Kyojuka, 1997), bombas de Ca^{2+} y la mayoría de enzimas presentes en el ciclo del IP_3 (Divecha, Banfić and Irvine, 1993; Martelli *et al.*, 2001), e incluso se ha demostrado el papel del Ca^{2+} en su liberación del nucleoplasma (Echevarria *et al.*, 2003; Guatimosim *et al.*, 2008). Sin embargo, deben realizarse más estudios para comprender todas las condiciones fisiológicas que rigen la homeostasis del Ca^{2+} en este punto.

En las células, además de estos receptores, van a coexistir un conjunto de proteínas de unión a calcio que modulan en cierta medida tanto sus concentraciones en los compartimentos intracelulares como su señalización. Así, los agregados de parvalbúmina y calbindina D-28k tienen una elevada afinidad por el Ca^{2+} y modulan la señalización cálcica intracelular de manera espacio-temporal (Schwaller, 2010). Las proteínas de unión de Ca^{2+} del RE (p. ej. calsecuestrina, calreticulina, GRP78 y GRP94) facilitan la acumulación de grandes cantidades de este ion, necesarias para una señalización celular rápida (Prins and Michalak, 2011). También la mitocondria puede amortiguar, en mayor o menor medida, incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ a través de su uniportador (MCU) que desarrollaremos más adelante (Rizzuto and Pozzan, 2006). Este incremento del ion Ca^{2+} en el interior de la matriz mitocondrial estimula el ciclo del ácido cítrico para producir más ATP. Aunque la carga de Ca^{2+} en la mitocondria se asocia a la prevención de procesos autofágicos, excesivas sobrecargas de este ion pueden inducir apoptosis (Baumgartner *et al.*, 2009).

2.2.2. – Mecanismos que restablecen la $[\text{Ca}^{2+}]_c$.

Para mantener la correcta homeostasis del Ca^{2+} citosólico, la célula cuenta con una batería de mecanismos de expulsión de este ion cuyo propósito es finalizar con la señal desencadenada por el estímulo inicial. Así, tras la entrada en la célula de Ca^{2+} exterior y/o liberación desde los reservorios intracelulares, una serie de bombas, canales e intercambiadores iónicos se activarán para retornar a los valores normales de $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Estos sistemas de expulsión se pueden dividir en los albergados en la membrana celular y en aquellos que se presentan en las membranas de las organelas internas, representados en la “Figura 13. Principales mecanismos de restablecimiento de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ”.

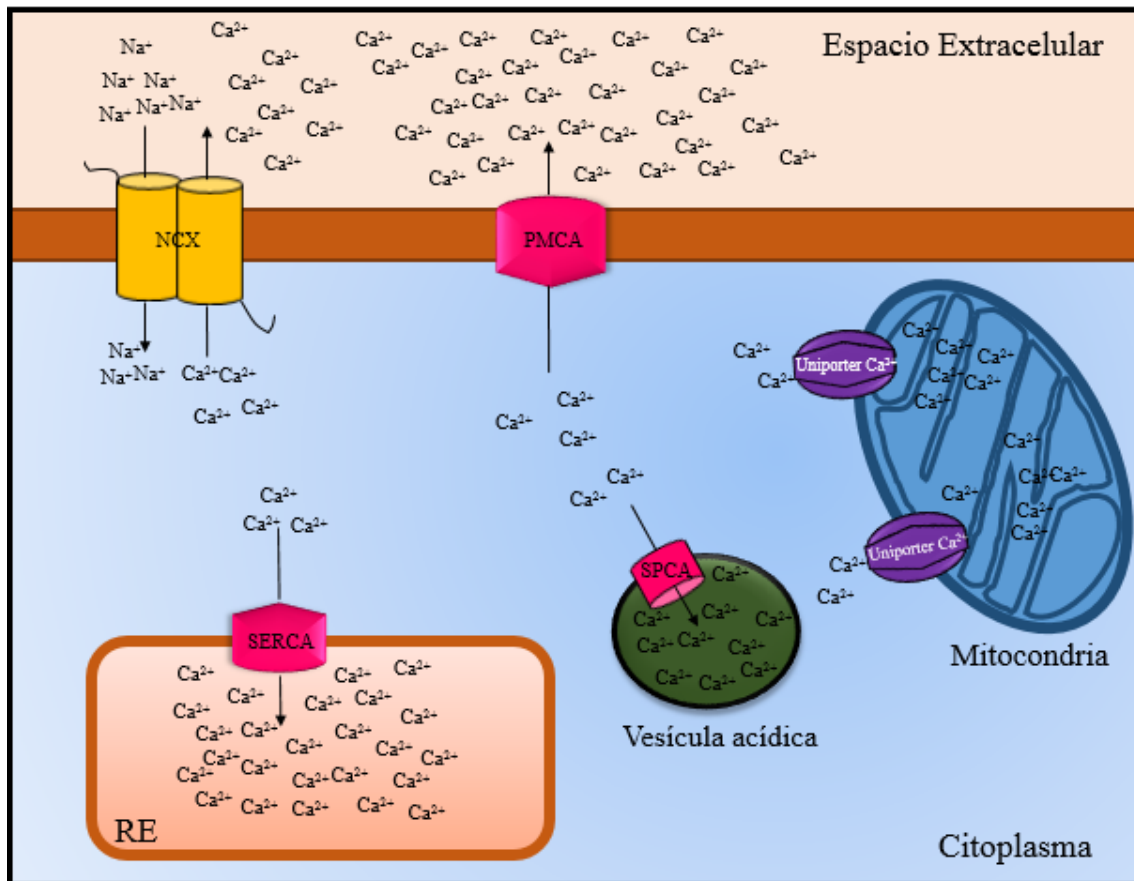


Figura 13. Principales mecanismos de restablecimiento de $[Ca^{2+}]_c$.

2.2.2.a. Sistemas de expulsión de Ca^{2+} de membrana plasmática.

◆ Bomba ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA).

Esta ATPasa está ampliamente expresada en la mayoría de tejidos y es esencial para mantener bajas las $[Ca^{2+}]_c$ previo al estímulo en todas las células eucariotas (Bruce, 2018). La PMCA está codificada por cuatro genes diferentes dando lugar a cuatro isoformas (PMCA1-4), presentando una localización y función variable según la isoforma predominante (Neyses, Reinlib and Carafoli, 1985; Furukawa, Tawada and Shigekawa, 1988; Smallwood, Gügi and Rasmussen, 1988; Monteith, Wanigasekara and Roufogalis, 1998; Zylinska *et al.*, 1998; Strehler and Zacharias, 2001) PMCA1 y PMCA4 son las isoformas más distribuidas en todas las células eucariotas mientras que PMCA2 y PMCA3 se presentan principalmente en células excitables (Greeb and Shull, 1989). La PMCA mantiene las $[Ca^{2+}]_c$ por debajo de los 300 nM (~100 nM) gracias a su elevada afinidad por el ion Ca^{2+} ($k_d \sim 0.2 \mu M$) (Szász *et al.*, 1978; Carafoli, 1991, 1994) y, en células no excitables, es el mayor mecanismo de flujo de Ca^{2+} (Muallem, Beeker and Pandolfi, 1988). Estructuralmente, la PMCA se compone de 10 dominios transmembrana con dos

bucles y ambos extremos (N- y C-terminal) citosólicos. (Monteith, Wanigasekara and Roufogalis, 1998; Strehler and Zacharias, 2001)

El dominio N-terminal es muy variable dependiendo de la isoforma (Stauffer, Guerini and Carafoli, 1995) y presenta una región 14-3-3 de unión inhibitoria (Rimessi *et al.*, 2005; Linde *et al.*, 2008). El primer bucle citosólico se aloja entre el segundo y el tercer dominio transmembrana y, además de contar con una región estimuladora de unión a fosfolípidos (Zvaritch *et al.*, 1990; Brodin *et al.*, 1992), forma parte del subdominio inhibitorio de unión a calmodulina (CaM) (Falchetto, Vorherr and Carafoli, 1992). El segundo de los bucles se sitúa entre el cuarto y quinto dominio y contiene el lugar de unión al ATP y, a su vez, presenta la segunda parte del subdominio inhibitorio de unión a CaM, conformándose en su totalidad con la región correspondiente del dominio C-terminal (James *et al.*, 1988; Falchetto *et al.*, 1991). Así, cuando la $[Ca^{2+}]_c$ aumenta, la unión del ion Ca^{2+} al sitio de unión inhibitorio de la CaM induce un cambio conformacional que favorece el paso de estos iones a través de la PMCA (Carafoli, 1994). El dominio C-terminal también contiene sitios de unión adicionales a Ca^{2+} (Hofmann *et al.*, 1993) y sitios de unión a fosfolípidos (Niggli and Adunyahffj, 1981; Niggli, Adunyahs and Carafoli, 1981) que incrementan la afinidad de la PMCA por ATP e iones Ca^{2+} . El PIP_2 es un importante estimulante de la PMCA e induce aproximadamente el 50% de su actividad (Carafoli, 1991, 1994). (Figura 14. Estructura de la bomba ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA)).

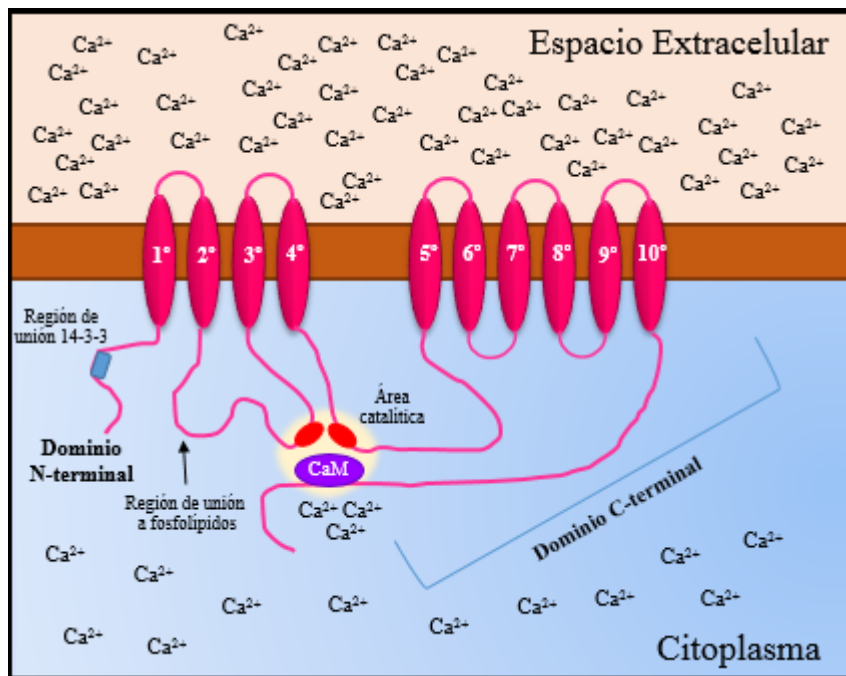


Figura 14. Estructura de la bomba ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA).

◆ Intercambiadores Na^+ / Ca^{2+} de membrana plasmática (NCX).

En muchos tipos celulares la reducción de la $[Ca^{2+}]_c$ vía membrana plasmática se lleva a cabo por los intercambiadores Na^+ / Ca^{2+} de membrana que, junto a la PMCA, se encargan de mantener las condiciones idóneas para las distintas funciones celulares (Hille, 1992; Berridge, Bootman and Roderick, 2003; Khananshveli, 2013, 2014). EL NCX es un sistema proteico antiportador que envía al exterior iones Ca^{2+} desde el interior celular. Para ello, usa energía asociada a un gradiente electroquímico favorable de paso de iones Na^+ a través de membrana para transportar en contra de gradiente iones Ca^{2+} (Yu and Choi, 1997). Exactamente, introduce al interior celular 3 iones Na^+ para expulsar al exterior un solo ion Ca^{2+} (Reeves and Hale, 1984; Blaustein and Lederer, 1999; DiPolo and Beaugé, 2006; Khananshveli, 2013, 2014) en un proceso durante el cual ambos tipos de iones encadenan pasos consecutivos a través del conjunto proteico del NCX (Khananshveli, 1990). En mamíferos, se agrupan genéticamente en tres isoformas (NCX1-3) conformando hasta 17 variantes expresadas en tejidos diferentes (Blaustein and Lederer, 1999; Philipson and Nicoll, 2000). Estructuralmente, se creía que se componía de 9 dominios hélices transmembrana (Nicoll, Ottolia and Philipson, 2006) pero estudios cristalográficos posteriores describen 10 hélices transmembrana con dos mitades pseudosimétricas (Giladi *et al.*, 2016), en las cuales se insertan bucles (dominios reguladores) (Matsuoka *et al.*, 1993) responsables de la regulación cálcica (Nicoll *et al.*, 2006; Besserer *et al.*, 2007).

Una pequeña mención para nombrar a los intercambiadores $Na^+ / K^+ / Ca^{2+}$ (NCKX). Los NCKX difieren de los NCX en su capacidad de intercambiar un ion Ca^{2+} y un ion K^+ por 4 iones de Na^+ . Aunque estructuralmente comparten muchas similitudes con los NCX, estos intercambiadores están compuestos por 11 dominios transmembrana y muestran un bucle citosólico entre TM5 y TM6 (Altimimi and Schnetkamp, 2007).

2.2.2.b. Sistemas de captación de Ca^{2+} de reservorios internos.

◆ Bomba ATPasa de Ca^{2+} del RE (SERCA).

La ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarco(endo)plásmico (SERCA) media el transporte de Ca^{2+} citosólico en contra de gradiente e impulsado por ATP hacia los reservorios intracelulares de Ca^{2+} , como el retículo sarcoplásmico y endoplásmico (Meis and Vianna, 1979; Inesi, Sumbilla and Kirtley, 1990; MacLennan, Rice and Green, 1997; Lee and East, 2001). La bomba SERCA pertenece a las familias de las ATPasas tipo-P que incluyen la PMCA, Na^+ / K^+ ATPasa y H^+ / K^+ ATPasa. Todas ellas se distinguen del resto por la formación obligatoria de un intermediario aspartil fosforilado como parte de su ciclo catalítico (Toyoshima and Inesi, 2004; Bublitz, Preben Morth and Nissen, 2011). Se presenta como un único polipéptido de 110 kDa localizado en la membrana del RE. Este tipo de ATPasas tipo-P transfieren un grupo fosfato proveniente del ATP hasta un residuo aspartato en su dominio catalítico, produciéndose un cambio conformacional.

Esta hidrólisis de una molécula de ATP es aprovechada para el transporte, en contra de gradiente, de 2 iones Ca^{2+} a través de las membranas biológicas. Durante este proceso, una parte de la energía química se desprende en forma de calor (Olesen *et al.*, 2004, 2007; Sørensen, Møller and Nissen, 2004; Toyoshima and Mizutani, 2004; Toyoshima, Nomura and Tsuda, 2004; Toyoshima, 2008). A lo largo de este proceso se van a producir, secuencialmente, diferentes transiciones. Inicialmente, el Ca^{2+} se dirige a su sitio de unión altamente específico localizado en la cara citosólica. Una vez unido, se desencadena la fosforilación del ATP para, a través de una serie de cambios conformacionales, transportar Ca^{2+} mediante el RE. Debido a que esta bomba está ampliamente expresada en el RE, la recaptación de Ca^{2+} se produce en unos pocos milisegundos permitiendo, en tejido muscular, tasas de relajación más rápidas en pequeños mamíferos que tienen frecuencias cardíacas más altas (de hasta 500 latidos por minutos encontradas en ratones) (Periasamy and Kalyanasundaram, 2007). Estructuralmente, SERCA se compone en una única cadena polipeptídica con una región transmembrana (TM) y una amplia región citosólica compuesta, a su vez, por tres dominios diferentes: dominio de unión a ATP o nucleótido (N), dominio P (P) que se fosforila con el γ -fosfato del ATP, y dominio de actuación (A) donde se une el Ca^{2+} y que coordina la fosforilación (Toyoshima and Inesi, 2004; Møller *et al.*, 2010). Exactamente, la transferencia del grupo γ -fosforilo del ATP se traspasa al Asp351 del dominio de fosforilación (P). La región transmembrana (TM) se conforma de 10 α -hélices (M1-M10) de longitud variable asociadas a dominios citosólicos. Pero existe, además, una porción extendida de 49 aa en el extremo C-terminal de SERCA2b, altamente hidrofóbica y que conforma el dominio transmembrana 11 (Verboomen *et al.*, 1994), confiriéndole alta afinidad al Ca^{2+} y baja tasa de reposición catalítica (Lytton *et al.*, 1992; Dode *et al.*, 2003). Hasta 10 isoformas de SERCA se codifican en 3 genes diferentes (ATP2A1, ATP2A2 y ATP2A3) (Lyttons and MacLennanq, 1988; Zhang *et al.*, 1995; Dode *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 2002; Gélébart *et al.*, 2003). SERCA1 se expresa significativamente en el músculo esquelético de contracción rápida y presenta, según el inicio de su transcripto, SERCA1a en adultos (994 aa) y SERCA1b en neonatos (1011 aa). Por su parte, SERCA2 se codifica en SERCA2a (997 aa) presente predominantemente en músculo cardíaco y músculo esquelético de contracción lenta, y en SERCA2b (1042 aa) limitadamente expresado en todos los tejidos tanto en células musculares como no musculares. Tanto SERCA2a como SERCA2b son sensibles a la regulación por la proteína de membrana fosfolamban cuya actividad es dependiente, a su vez, de PKA y calmodulina, entre otras. SERCA3, al contrario, se expresa altamente en varios tejidos no musculares y, en menor medida, en músculo (Periasamy and Kalyanasundaram, 2007). Cabe resaltar el hecho de que la estructura primaria está altamente conservada entre las tres isoformas. Así, SERCA1 comparte el 84% de su estructura con SERCA2a y cerca del 75% con SERCA3, presentando en todos los casos TM y estructuras terciarias muy parecidas entre sí e ilustradas en la *figura 15*.

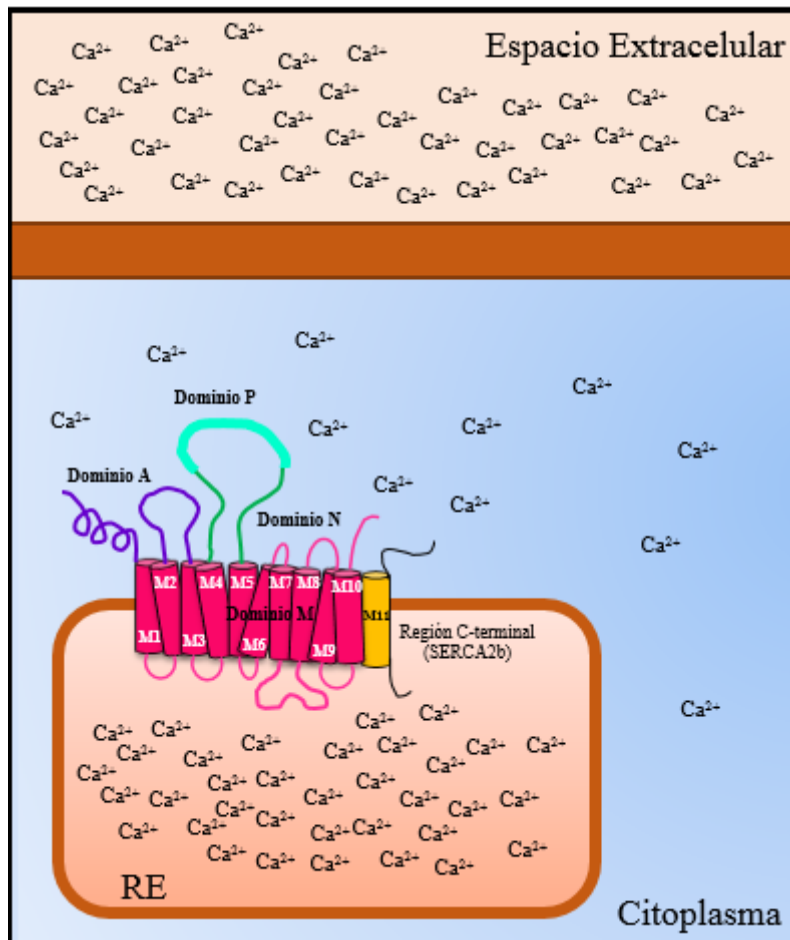


Figura 15. Estructura de la bomba ATPasa de Ca^{2+} del RE (SERCA).

◆ Bomba ATPasa de Ca^{2+} de la vía secretora (SPCA).

Bomba ATPasa presente en el aparato de Golgi y en vesículas de secreción (Van *et al.*, 2004) que transporta Ca^{2+} y Mn^{2+} al interior del lumen de estas estructuras contribuyendo a la homeostasis necesaria para la correcta funcionalidad celular. Durante mucho tiempo, la gran mayoría de la información sobre estas bombas derivaba de los estudios de su homólogo en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, denominada ATPasa relacionada con la membrana plasmática (PMR1) (Rudolph *et al.*, 1989). En humanos, parece que son dos genes, ATP2C1 (Hu *et al.*, 2000; Owens *et al.*, 2007) y ATP2C2 (Uccelletti *et al.*, 2005; Xiang, Mohamalawari and Rao, 2005) los que codifican a SPCA1 y SPCA2 respectivamente. Aunque SPCA1 sea más activo que SPCA2 (Wootton *et al.*, 2004), ambos comparten el 64% de su estructura. Son cuatro las isoformas alternativas de SPCA1 que se han descubierto (SPCA1a-d) (Fairclough *et al.*, 2003). En general SPCA está ampliamente distribuida en el cerebro (He and Hu, 2012) y se estructura como una única cadena proteica integrada en la membrana. En este macrocomplejo polipeptídico podemos diferenciar: un dominio de actuación (A), uno de unión a nucleótido (N), otro de fosforilación (P), así como 10 estructuras α -hélices (M1-10) incrustadas en la membrana como se pretende

representar en la *figura 16*. Las uniones entre los diferentes dominios son flexibles para permitir los cambios conformacionales necesarios para el transporte de iones. En esta bomba SPCA, los residuos M4 y M6 son los únicos implicados en la unión del ion Ca^{2+} (sitio II de unión), sugiriendo una única localización posible para el Ca^{2+} en SPCA1 (Wei *et al.*, 2000). El extremo N-terminal presenta un dominio *EF-hand* de unión a Ca^{2+} . Esta ATPasa es capaz de transportar un solo ion Ca^{2+} o Mn^{2+} por cada ATP utilizado, con la misma afinidad por ambos (Dode *et al.*, 2005, 2006). Común a todas las ATPasas tipo P, van a presentar un aspartato fosforilado como intermediario durante su reacción. Así, en el estado inicial el ion Ca^{2+} se une con alta afinidad por la cara citoplasmática (~ 10 nM para SPCA1 y < 10 nM para SPCA2) (Dode *et al.*, 2005, 2006; Brini *et al.*, 2013). Se produce la fosforilación en el residuo aspartato induciéndose un cambio conformacional. El ion Ca^{2+} pierde, entonces, su afinidad y se libera en el lumen del RE. La hidrólisis inmediata hace que se recupere su conformación inicial. SPCA1 va a estar ampliamente distribuida por todos los tejidos (Hu *et al.*, 2000; Wootton *et al.*, 2004) siendo aún más presente en queratinocitos epidermales humanos (Hu *et al.*, 2000). En células animales, SPCA1 se localiza eminentemente en las membranas del Golgi (Wootton *et al.*, 2004) y, en clínica, se ha visto en cantidades muy por encima de lo normal en subtipos de células de cáncer de mama (Grice *et al.*, 2010). Contrariamente a SPCA1, la distribución de SPCA2 está más restringida a ciertos tejidos y órganos (Vanoevelen *et al.*, 2005) como son: todos los tejidos del tracto digestivo (Vanoevelen *et al.*, 2005), próstata, pulmones, tráquea, neutrófilos (Baron *et al.*, 2009), médula ósea y neuronas del hipocampo (Xiang, Mohamalawari and Rao, 2005). Tanto en acinos de secreción de glándula mamaria de ratón (Faddy *et al.*, 2008) como, desde un punto de vista más clínico, en células humanas de cáncer de mama (Feng *et al.*, 2010).

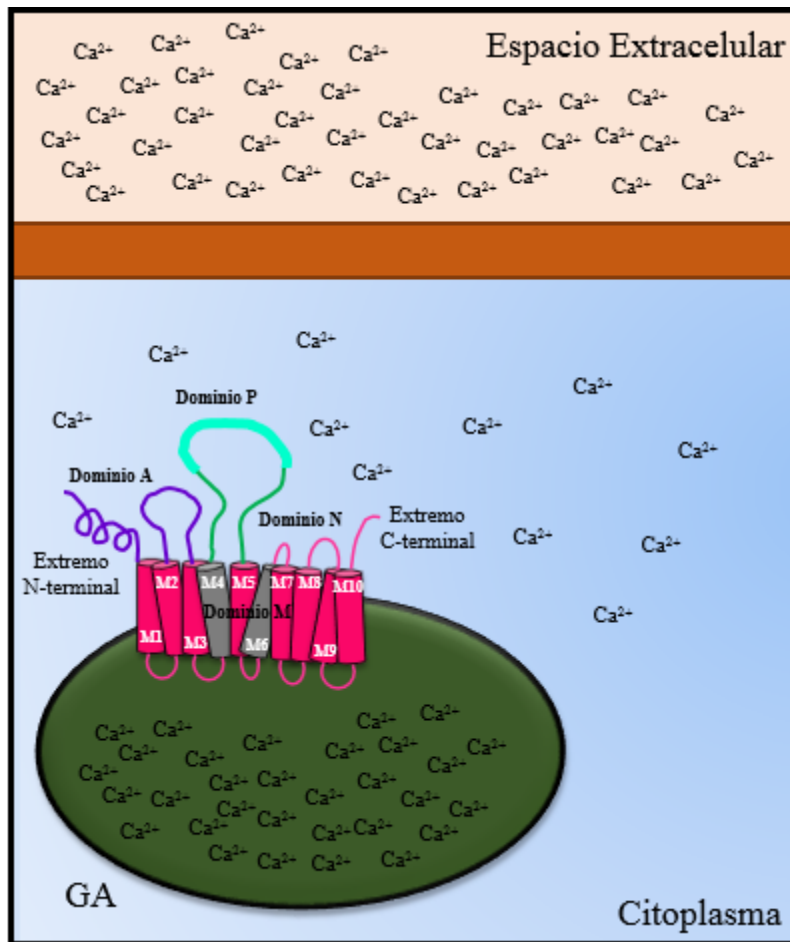


Figura 16. Estructura de la bomba ATPasa de Ca^{2+} de vías secretoras (SPCA).

◆ Uniportador mitocondrial de Ca^{2+} (MCU).

Es un canal que se localiza en la membrana mitocondrial interna y capta Ca^{2+} del citosol para internalizarlo en la matriz mitocondrial (Berridge, Bootman and Roderick, 2003). Se trata de un mecanismo de células eucariotas que une Ca^{2+} con alta afinidad ($K_d \leq 2 \text{ nM}$) permitiendo su especificidad frente a otros iones presentes en el citoplasma, como Mg^{2+} y K^+ (Kirichok, Krapivinsky and Clapham, 2004). Inicialmente, el Ca^{2+} ingresa en el espacio mitocondrial externo a través del canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) (Shoshan-Barmatz and De, 2017) para, a medida que aumenta su concentración, introducirse en la matriz mitocondrial interna a través del MCU (Rizzuto, Bernardi and Pozzan, 2000). La fuerza impulsora que permite la entrada de Ca^{2+} a través del uniportador proviene del potencial de membrana mitocondrial, de -150 a -200 mV con respecto al citosol (Duchen, 2000). Representa, por tanto, el mecanismo dominante de internalización de Ca^{2+} hacia la matriz mitocondrial, aunque se han identificado otros (Pathak and Trebak, 2018). Se compone estructuralmente de al menos 4 subunidades principales: subunidad formadora de poro (MCU) capaz de oligomerizarse con otras estructuras, subunidad reguladora MCU (EMRE), y dos subunidades sensibles a Ca^{2+} (MICU1 y MICU2) (Oxenoid *et*

al., 2016; Y. Wang *et al.*, 2019). MCU se estructura en 351 aa de 40 kDa y forma un tetrámero, cada una de estas estructuras, a su vez, se relaciona con 3 dominios diferentes: dominio transmembrana hidrofóbico (TMD), dominio N-terminal (NTD) y dominio en espiral (CCD). También existe MCU_b de 336 aa y 40 kDa que comparte hasta el 48.77% de su estructura con MCU. La subunidad reguladora MICU1 consiste en 476 aa (54 kDa). Con concentraciones bajas de Ca²⁺, MICU1 inhibe las corrientes de Ca²⁺; a altas concentraciones, el sitio de unión de MCU en MICU1 está bloqueado con los iones Ca²⁺ y el poro restablece su permeabilidad (Kamer, Grabarek and Mootha, 2017). MICU2 contiene 434 aa y 50 kDa (Kamer *et al.*, 2019). MICU3 tiene 530 aa y una masa molecular de 60 kDa. Tanto MICU1, 2 y 3 contienen en su estructura un dominio funcional *EF-hand* (Plovanich *et al.*, 2013). EMRE, también conocido como SMDT1, tiene un total de 107 aa, posee en torno a 11 kDa y un conjunto de residuos ácidos expuestos hacia la matriz mitocondrial que funcionan como un sensor de Ca²⁺ (Vais *et al.*, 2016). En condiciones de reposo, la interacción MCU con MICU evita la captación mitocondrial de Ca²⁺ (Mallilankaraman *et al.*, 2012; Csordás *et al.*, 2013; Patron *et al.*, 2014). No obstante, una liberación de Ca²⁺ promovida por IP₃R produce un incremento en la interfaz ER-mitocondrial del orden de 10 μM que promueve la apertura del poro MCU, previo cambio conformacional de MICU (Bagur and Hajnóczky, 2017). Esto, a su vez, activa deshidrogenasas sensibles a Ca²⁺ (PDH, α-KGDH and ICDH), glicerol-3-fosfato deshidrogenasa como también ATPsintasas que aumentan la producción de ATP y satisfacen las demandas energéticas de las células (Tarasov, Griffiths and Rutter, 2012). Ver “Figura 17. Estructura del uniportador mitocondrial (MCU)”.

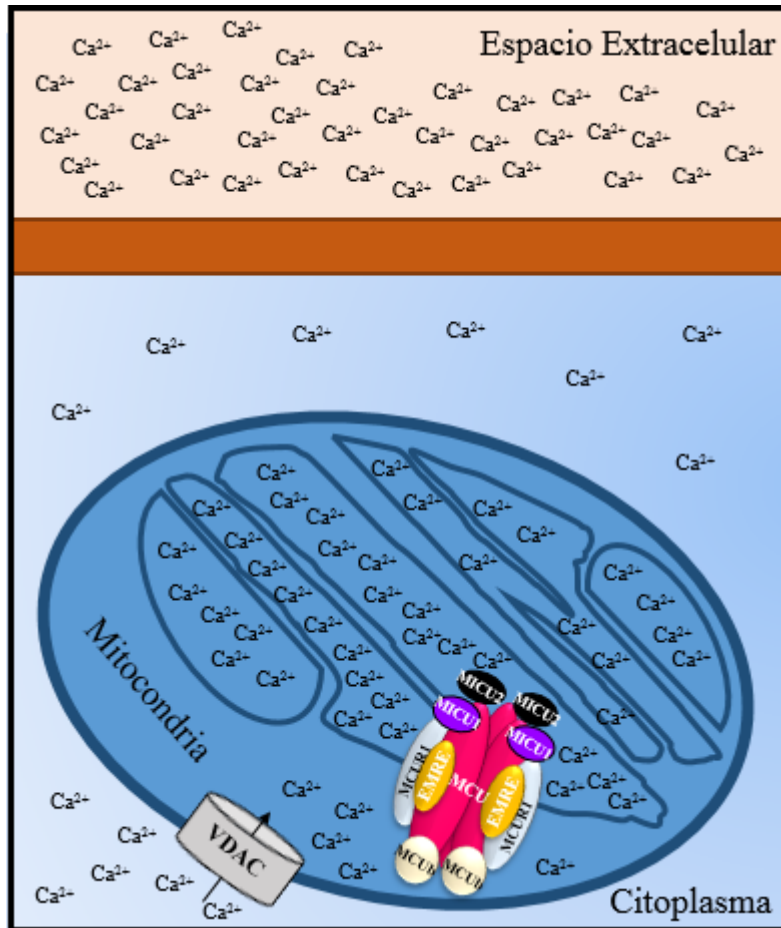


Figura 17. Estructura del uniportador mitocondrial (MCU).

2.2.3. – Entrada Capacitativa de Ca^{2+} (ECC).

La liberación de Ca^{2+} del RE mediada por IP_3R como estímulo para la entrada masiva de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática desde el medio extracelular fue un proceso denominado como entrada de calcio operada por depósito (Putney, 2005). La primera referencia en torno a este mecanismo aparecería por primera vez en 1986 cuando se describió una entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática como consecuencia del vaciado de los depósitos internos cuyo fin era rellenar las reservas celulares de calcio (Putney, 1986). Se trata de uno de los principales mecanismos de entrada de Ca^{2+} en células no excitables y, en menor medida, en algunas células excitables (Domínguez-Rodríguez *et al.*, 2012; Koss *et al.*, 2013; Xia *et al.*, 2014).

Tan pronto como se descubrió que el IP_3 desencadenaba la liberación del Ca^{2+} desde el RE uniéndose a su receptor IP_3R (Streb *et al.*, 1983; Berridge, 1993), se indagó más en profundidad en el mecanismo subyacente de entrada de Ca^{2+} . Fueron varios estudios los que sugirieron que la permeabilidad de la membrana plasmática hacia el Ca^{2+} estaba más relacionada con la cantidad de calcio presente en los depósitos que con la unión de algún agonista y/o las concentraciones de IP_3 . En este sentido, algunos autores (Casteels and Droogmans, 1981; Putney, 1986) propusieron

que el vaciamiento de los depósitos de Ca^{2+} , más que el propio IP_3 , era el responsable de la corriente de calcio. A este proceso se le denominó como “Entrada Capacitativa de Ca^{2+} ” (ECC), asumiendo que el RE estaba conectado directamente con el medio extracelular. Experimentos posteriores demostraron que el Ca^{2+} realmente entraba al citosol previo a su recaptación por los depósitos internos, lo que supuso una modificación sustancial al modelo anterior (Putney, 1990). Sin embargo, no fue hasta 1995 cuando la ECC no se renombró como “entrada de Ca^{2+} por los depósitos” (SOCE, del inglés Store-Operated Calcium Entry) distinguiéndose de otras activaciones de canales de Ca^{2+} producidas por ligandos y/o voltaje (Prakriya and Lewis, 2015).

Una de las herramientas experimentales que más ha contribuido al estudio de las corrientes de Ca^{2+} y SOCE han sido los inhibidores de SERCA, especialmente la tapsigargina (TG). La TG es un lactona derivada de plantas que inhibe con alta especificidad y potentemente a la familia de ATPasas SERCA en SE/RE (Thastrup *et al.*, 1989), diferenciándose de otros inhibidores menos selectivos como el ácido ciclopiazónico y la terbutilhidroquinona y permitiendo el vaciamiento total de estos reservorios. Sumado a la aparición de fura-2 y otros marcadores fluorescentes de Ca^{2+} (Grynkiewicz, Poenie and Tsien, 1985) fue posible detectar la liberación total de este ion desde los reservorios al estimularse con TG y cuantificar la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular a través de SOCs (una vez añadido Ca^{2+} al medio extracelular), lo que dio lugar a la aparición exponencial de una batería experimental en torno a SOCE y células no excitables, como también en algunas excitables (Putney and Bird, 1993; Parekh and Penner, 1997). De entre todas las aportaciones acaecidas, merece destacar la de Takemura *et al.*, (Takemura *et al.*, 1989) al demostrar que el IP_3 y la TG no presentaban efectos adicionales sobre la reentrada de Ca^{2+} en la célula, esto es, la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática sólo dependía del vaciamiento previo de los reservorios intracelulares. Poco después se identificó en mastocitos la corriente capacitativa de Ca^{2+} activada por EGTA, IP_3 o ionomicina denominándose corriente CRAC o I_{CRAC} , del inglés *Calcium Release-Activated Current* (Hoth and Penner, 1992).

La señalización de calcio en células no excitables se inicia principalmente con la activación de receptores de membrana externa acoplados a la fosfolipasa C (PLC) (Bird *et al.*, 2005). Diferentes enfoques ayudaron a definir los procesos de entrada de Ca^{2+} subyacentes como SOCE (I_{CRAC} o I_{SOC}) y no SOCE (I_{ARC}), y la participación de otras familias de proteínas como Orai y los receptores de potencial transitorio (TRPs). En la última década, varios han sido los estudios que han contribuido a identificar a los protagonistas moleculares responsables de la entrada de Ca^{2+} acoplada a PLC como son los sensores de Ca^{2+} citosólicos (STIM1 y STIM2) y las subunidades proteicas formadoras del canal SOCE (Orai1, Orai2 y Orai3) (Prakriya and Lewis, 2015).

Los canales CRAC, compuestos por STIM1 y Orai1, se activan por TPEN (quelante de Ca^{2+} permeable a la membrana) (Hofer, Fasolato and Pozzan, 1998), así como por TG e ionomicina

(ionóforo de membrana que transporta Ca^{2+} fuera del RE) cuando se aplica en presencia de altas concentraciones de Ca^{2+} intracelular (Fasolato, Hoth and Pennerq, 1993; Zweifach and Lewis, 1993). Representa el canal operado por depósito más ampliamente caracterizado y está compuesto por la subunidad formadora de poros Orai1, Orai2 u Orai3. Se caracteriza por tener una baja conductancia, no activada por voltaje y altamente selectiva a Ca^{2+} (~ 1.000 veces más selectiva para Ca^{2+} que para Na^+) (Hoth and Penner, 1993; Zweifach and Lewis, 1993; Hoth, 1995). I_{SOC} se caracteriza como un canal SOCE menos selectivo a Ca^{2+} , es decir, canales permeables a cationes que generan otro tipo de corriente capacitativa no selectiva para Ca^{2+} (Rosado, 2017) que, además de subunidades Orai, se combina con miembros de la familia TRPC. I_{ARC} , por su parte, se presenta como una corriente no activada por depósito sino por AA e involucra a Orai1, Orai3 y STIM1. Además, en los últimos años se han descubierto dos isoformas de Orai1 (Orai1 α y Orai1 β) (Fukushima *et al.*, 2012), asociándose ambas a la formación de canales CRAC y SOC, pero tan sólo Orai1 α para la formación de canales ARC (Desai *et al.*, 2015).

2.2.3.a. Mecanismos implicados en la ECC.

El principal mecanismo de entrada de Ca^{2+} extracelular en células no excitables es la entrada capacitativa de Ca^{2+} (ECC), modulada por las familias de proteínas STIM, Orai y TRPC. Esta señalización se desencadena inicialmente por la activación de receptores de superficie de membrana acoplados a fosfolipasa C (Bird *et al.*, 2005) y conduce a la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato en DAG e IP_3 (Berridge and Irvine, 1984). Esto, a su vez, dará como resultado un proceso bifásico constituido por una movilización de Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares, y por la activación de entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática, proceso denominado SOCE.

Más detalladamente, la porción luminal de STIM1, su extremo N-terminal, contiene un dominio *EF-hand* seguido de un dominio α -estéril (SAM) (Stathopoulos *et al.*, 2006, 2008; Stathopoulos and Ikura, 2010). El dominio *EF-hand* se estructura como hélice-bucle-hélice con residuos cargados negativamente (Asp y Glu) con alta afinidad para el Ca^{2+} ($K_d \sim 200\text{--}600 \mu\text{M}$). La liberación y vaciamiento de Ca^{2+} del RE produce la disociación del Ca^{2+} de su dominio *EF-hand*, desestabilizando a *EF-hand* y SAM, y desencadenando un cambio conformacional (Stathopoulos *et al.*, 2006). Estructuralmente, STIM2 es muy parecido a STIM1 pero existen ciertas diferencias entre sus dominios *EF-hand* y SAM lo que revela distintos grados de estabilidad estructural y explicaría la activación de STIM2, y no de STIM1, ante ligeras disminuciones de la concentración de Ca^{2+} en RE (Brandman *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2011). Es importante destacar que el dominio transmembrana de STIM1 contiene tres glicinas que le otorgan una flexibilidad crucial para los cambios conformacionales que se han descrito (Dong *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2015). La parte citosólica de STIM1, extremo C-terminal, incluye tres regiones CC (*coiled-coil*) (CC1, CC2,

CC3) (activan a Orai1), un dominio modulador CRAC (CMD), una región rica en prolina/serina (activa a TRPC1) y una región rica en lisina (Fahrner, Schindl and Romanin, 2018). STIM1 forma dímeros entre sí (homómeros) o junto a STIM2 (heterómeros) implicando a los dominios SAM y *EF-hand* y localizándose en las regiones *punctae*, separadas ~ 100-300 nm (Hogan, 2015) y muy próximas al RE y membrana plasmática (Baba *et al.*, 2006; Smyth *et al.*, 2008). Se necesita el extremo C-terminal de STIM1 para activar Orai1 (Huang *et al.*, 2006; Muik *et al.*, 2008) y, específicamente, unos dominios responsable de su activación que fueron identificados casi simultáneamente por cuatro grupos de investigación: CAD (dominio de activación CRAC; aa342-448), SOAR (región activadora STIM-Orai; aa344-442), OASF (fragmento corto de activación de Orai; aa233-450) y Ccb9 (aa339-444) (Kawasaki, Lange and Feske, 2009; Muik *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2009). Fueron Yang *et al.*, los que finalmente demostraron el mayor efecto activador de Orai1 por la región SOAR de STIM1 (Yang *et al.*, 2012) permitiendo así la entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular (ver “Figura 18. Secuencia de activación de la ECC entre STIM y Orai1”). Aunque las secuencias de eventos en la activación de STIM1 tras el vaciamiento de los depósitos de Ca^{2+} siguen siendo investigados, se han descubierto interesantes revelaciones sobre su funcionamiento. En este sentido, las regiones ricas en lisina del extremo C-terminal estabilizan las uniones con proteínas de membrana además de activar canales TRPC1 y TRPC3 mediante interacciones electrostáticas (Yuan *et al.*, 2007, 2009). Además de su activación con los canales CRAC, se ha demostrado que STIM1 desempeña un rol imprescindible junto con el AA tanto en los canales de Ca^{2+} estimulados por leucotrienos C4 (Zhang *et al.*, 2014) como en la regulación de los canales TRP (Worley *et al.*, 2007; Prakriya and Lewis, 2015).

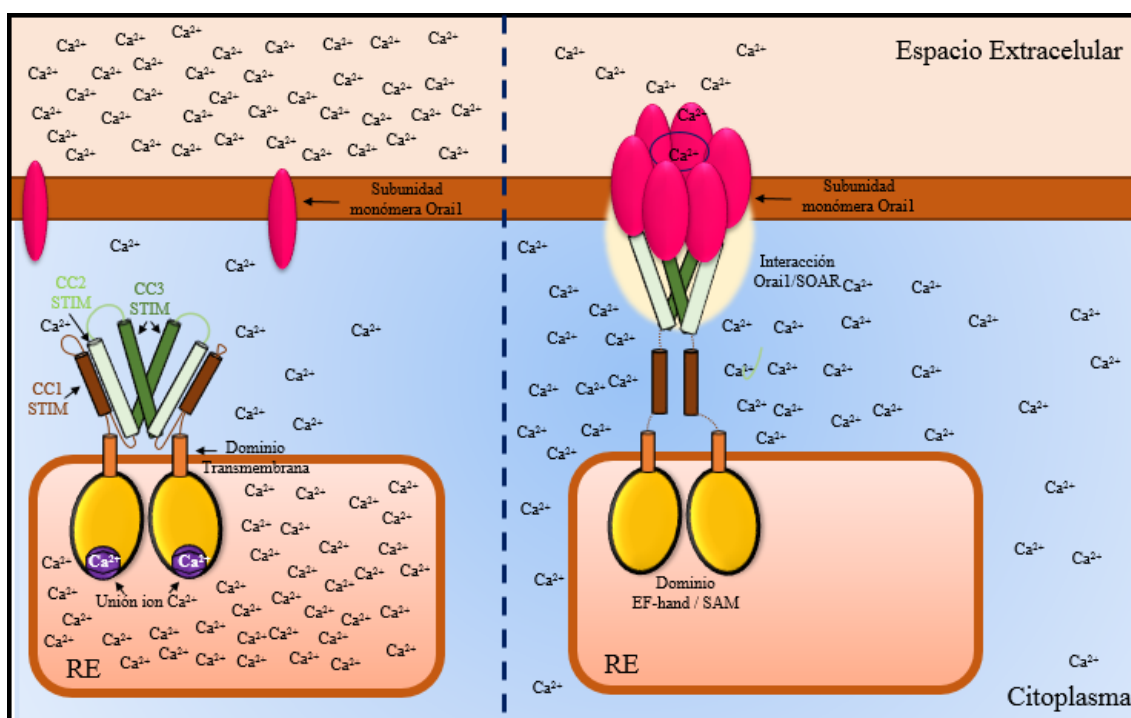


Figura 18. Secuencia de activación de la ECC entre STIM y Orai1.

2.2.3.b. STIM1 (Stromal Interaction Molecule 1).

STIM1 es un sensor de Ca^{2+} del RE que se activa tras el vaciamiento del ion Ca^{2+} del RE formando multímeros en la unión RE-MP (Soboloff *et al.*, 2012), donde activa canales Orai desencadenando una cascada de diversas funciones efectoras (Hooper *et al.*, 2013). No fue hasta 2005 cuando STIM1 se identificó como un componente necesario de este proceso basado en dos estudios simultáneos con ARN de interferencia (Liou *et al.*, 2005; Roos *et al.*, 2005). Esta proteína presenta un único dominio transmembrana con el extremo N-terminal hacia el lumen del RE y el C-terminal orientado hacia el citosol. Su extremo reticular funciona como sensor del Ca^{2+} y contiene, entre otras, un dominio *EF-hand* seguido de un dominio TM α -hélice. La parte citosólica, mucho más grande, se encarga del acoplamiento y activación de los canales Orai (Li *et al.*, 2007; Muik *et al.*, 2008; Soboloff *et al.*, 2012; Fahrner *et al.*, 2013; Stathopoulos and Ikura, 2013). De manera más detallada, las diferentes regiones y dominios se describen a continuación (“Figura 19. Estructura de STIM1 (Stromal Interaction Molecule 1)”).

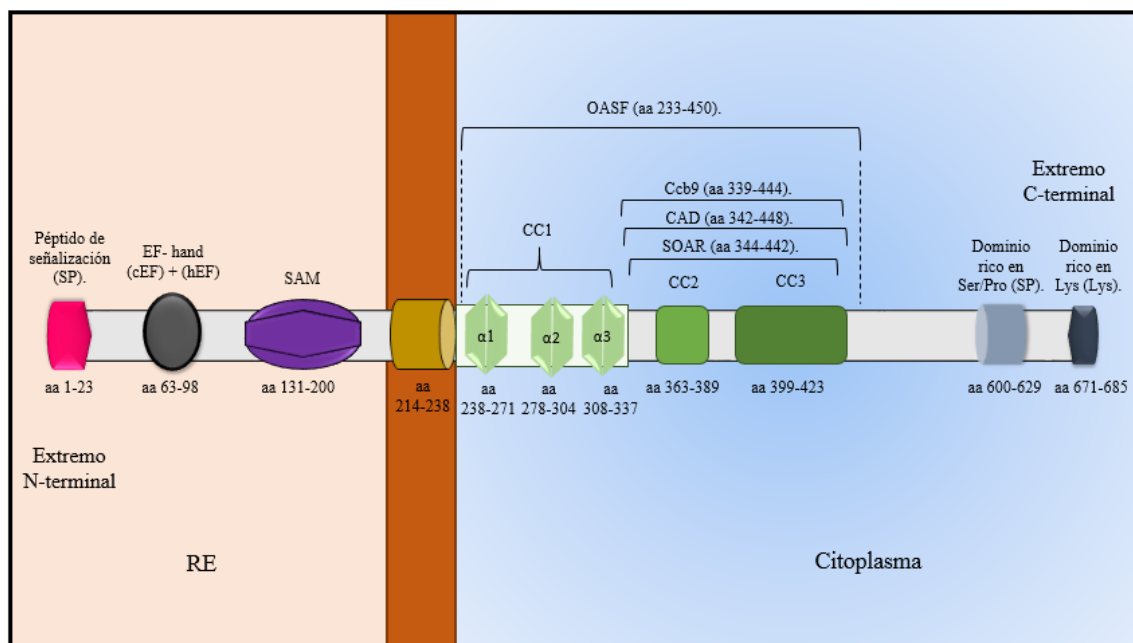


Figura 19. Estructura de STIM1 (Stromal Interaction Molecule 1).

El **péptido de señalización (SP)** es hidrolizado durante la traducción. El extremo luminal N-terminal incluye un par de Cys conservadas, un dominio canónico *EF-hand* de unión a Ca^{2+} (cEF), un dominio oculto *EF-hand* de no-unión a Ca^{2+} (hEF) y un dominio α -estéril (SAM) (Soboloff *et al.*, 2012).

Los **dominios canónico (cEF) y oculto (hEF) *EF-hand*** de unión a Ca^{2+} continúan con SAM (Stathopoulos *et al.*, 2006, 2008; Stathopoulos and Ikura, 2010). Este dominio *EF-hand* situado entre aa 63-98 se estructura como hélice-bucle-hélice cargándose negativamente en los residuos (Asp y Glu) que están unidos a Ca^{2+} ($K_d \sim 200-600 \mu\text{M}$) cuando las concentraciones de Ca^{2+}

intrareticulares son elevadas. Al producirse el vaciamiento, y la concentración disminuye, se disocian para desestabilizar el dímero *EF-hand*/SAM (Stathopoulos *et al.*, 2006) favoreciendo la activación de canales de membrana. Mutaciones en los residuos ácidos del dominio cEF disminuyen su afinidad por el Ca^{2+} provocando oligomerizaciones de STIM1 muy parecidas a las encontradas si las concentraciones luminales de Ca^{2+} estuvieran disminuidas (Stathopoulos *et al.*, 2008). Estas mismas mutaciones generan uniones y canales CRAC constitutivamente activos (Zhang *et al.*, 2005; Soboloff *et al.*, 2006; Spassova *et al.*, 2006) llegando incluso a producir un efecto letal para la célula (Deng *et al.*, 2009). Análogamente, mutaciones en el dominio hEF también provocaría una oligomerización similar y entrada constitutiva de Ca^{2+} (Stathopoulos *et al.*, 2008).

El **dominio α -estéril (SAM)** es una región situada en aa 131-200 que, junto con los dominios *EF-hand*, permite detectar pequeños cambios en las concentraciones luminales de Ca^{2+} y, además, desencadenar las interacciones intermoleculares necesarias para producir los cambios conformacionales de STIM1. Conjuntamente, van a realizar estas funciones estructurándose en 5 hélices α (Stathopoulos *et al.*, 2006, 2008; Zheng *et al.*, 2008, 2011; Stathopoulos, Zheng and Ikura, 2009).

STIM1 presenta un único **dominio transmembrana (TM)** α -hélice altamente conservado (Stathopoulos *et al.*, 2006) y situado en aa 214-238. Contiene tres Gli (223, 225 y 226) que le confieren una gran flexibilidad y le permiten la ejecución de los cambios conformacionales necesarios para la transmisión de la señal desde el extremo N-terminal hasta el C-terminal (Dong *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2015). Dicho segmento se va a continuar con la sección citosólica de STIM1 que incluye 3 regiones *coiled-coil* (CC), una región activadores de Orail-STIM (SOAR), un dominio de activación de Ca^{2+} sensible a la liberación de Ca^{2+} -CRAC- (CAD), un fragmento pequeño de activación Orail (OASF), otro dominio pequeño (Ccb9), un dominio inhibidor ácido (ID), un dominio de interacción de microtúbulos (TRIP), un dominio rico en Prolina/Serina (PS) y un dominio rico en lisina (Lys).

Los **dominios *coiled-coil* (CC)** son 3: CC1 aa238-343, CC2 aa363-389 y CC3 aa399-423 (Muik *et al.*, 2011) y juegan un papel esencial en la oligomerización de STIM1 (Luik *et al.*, 2008). El dominio CC1, a su vez, incluye tres segmentos α -hélices (CC1 α 1 aa238-271, CC1 α 2 aa278-304 y CC1 α 3 aa308-337) también necesarios para el mantenimiento de STIM1 en una conformación estable e inactiva cuando los reservorios están completos. A la vez que intervienen en la dí/oligomerización y liberación de la región SOAR cuando éstos se vacían (Muik *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2013; Fahrner *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2015). La región CC1 α 3 alberga una hélice que inhibe la funcionalidad de SOAR pero que requiere la activación previa de una

región ácida EEELE (aa 318–322) (Calloway, Holowka and Baird, 2010; Korzeniowski *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2012).

La **región activadora de Orai-STIM (SOAR)** es la contigua al tercer segmento CC de ~ 100aa. Se estructura en 4 α -hélices (Sa1, Sa2, Sa3 y Sa4) (Yang *et al.*, 2012) y es la región mínima necesaria para la activación de Orai1 (Yuan *et al.*, 2009). Incluye una región polibásica con una secuencia KIKKKR (aa 382–387) que es crucial para la interacción con Orai1 (Calloway, Holowka and Baird, 2010; Korzeniowski *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2012).

El **dominio activador de Ca²⁺ sensible a la liberación de Ca²⁺ -CRAC- (CAD)** (Park *et al.*, 2009) y el **fragmento pequeño activador de Orai1 (OASF)** (Muik *et al.*, 2009) son de mayor tamaño que SOAR, están contenidos en la región CC1 y también activan a Orai1. A continuación de SOAR, existe un **dominio ácido inhibitorio (ID)** o **dominio modulador de CRAC (CMD)** (aa470-491) que median la inactivación rápida de Orai1 dependiente de Ca²⁺ (Derler *et al.*, 2009; Kyu *et al.*, 2009; Mullins *et al.*, 2009) al interactuar con el sitio de unión a calmodulina en el extremo N-terminal de Orai1 (Mullins *et al.*, 2009).

Por último, en el extremo más distante del C-terminal, STIM1 va a presentar un **dominio rico en Prolina/Serina (PS)** (aa 600-629), un **dominio de interacción de microtúbulos (TRIP)** y un **dominio rico en Lisinas (Lys)** (aa 671-685) responsables de la interacción con fosfolípidos de membrana (Soboloff *et al.*, 2012); además, en este último se ha visto que activa la apertura de los canales TRPC (Huang *et al.*, 2006).

Aunque el vaciamiento de los depósitos de Ca²⁺ del RE es una de las mayores condiciones de estrés reticular y produce la activación de la proteína STIM1 como componente fundamental en I_{CRAC} , existen otras condiciones que también la activan (Soboloff, Madesh and Gill, 2011) como son estrés oxidativo (Hawkins *et al.*, 2010), cambios de temperatura (Mancarella, Wang and Gill, 2011; Xiao *et al.*, 2011) hipoxia y acidificación del medio (Mancarella *et al.*, 2011). Además, STIM1 interactúa en la unión RE-MP con una serie de bombas, canales y varias proteínas del citoesqueleto sugiriendo un rol en otras funciones ajenas a Orai. En este sentido, la familia de los canales TRPCs se ha vinculado a SOC (Deng *et al.*, 2009) mostrando estrechas conexiones entre TRPC1, TRPC3 y la maquinaria STIM-Orai, con la entrada posterior de Ca²⁺ extracelular (Yuan *et al.*, 2009; Cheng *et al.*, 2011). Las proteínas STIM también controlan la función e interactúan con los canales de Ca²⁺ operados por voltaje Cav1.2 (Park, Shcheglovitov and Dolmetsch, 2010; Wang *et al.*, 2010). Los canales ARC no se activan por el vaciamiento de los depósitos y responden a la unión con AA en la que STIM1 interactúa con pentámeros de 3 subunidades Orai1 y 2 de Orai3 (Mignen, Thompson and Shuttleworth, 2007, 2008, 2009; Zhang *et al.*, 2014). También interactúa con macroestructuras como pueden ser SERCA (Jousset, Frieden and Demarex, 2007) y/o PMCA (Quintana *et al.*, 2011) y media interacciones de las adenilato

ciclasas de membrana (AC8) (Lefkimiatis *et al.*, 2009; Sanchez-Collado *et al.*, 2019) y chaperonas como calnexina (Saitoh *et al.*, 2011) y ERp57 (Prins *et al.*, 2011).

2.2.3.c. STIM2 (Stromal Interaction Molecule 2).

STIM2 se encuentra exclusivamente expresado en el RE mientras que STIM1 presenta ~ 5–10% en la MP. Son reguladores de canales SOC actuando como sensores de Ca^{2+} a través de su dominio *EF-hand* en el medio extracelular (Spasova *et al.*, 2006). En vertebrados, ambos están presentes de manera ubicua en la mayoría de tejidos, siendo STIM2 inferior en número en todos ellos (Williams *et al.*, 2001; Oh-hora *et al.*, 2008) salvo en el cerebro (Berna-Erro *et al.*, 2009) y en células dendríticas (Bandyopadhyay, Pingle and Ahern, 2011). Tanto STIM1 como STIM2 van a compartir gran parte de su estructura; no obstante, pequeñas variaciones aparecen a lo largo de su dominio N- y C-terminal. Así, se aprecian diferencias estructurales en el dominio de unión a Ca^{2+} *EF-hand* y el dominio SAM en el extremo N-terminal, encontrándose las mayores a partir de los dominios CC del extremo C-terminal (Johnstone, Graham and Dziadek, 2010; Soboloff *et al.*, 2012). A pesar de que STIM2 es un activador de los canales Orai más débil que STIM1, es capaz de detectar variaciones menores del Ca^{2+} luminal con una $K_d \sim 400 \mu\text{M}$ (2 veces mayor que STIM1) (Brandman *et al.*, 2007). Además, se han encontrado tres isoformas de STIM2 (STIM2.1, STIM2.2 y STIM2.3) (representadas en la *figura 20*) con funciones opuestas ya que, mientras STIM2.2 se une y activa I_{CRAC} a través de su dominio SOAR, STIM2.1 tiene un efecto inhibitorio sobre SOCE al no activar canales Orai debido a una secuencia extra de 8 aa en la región SOAR (Miederer *et al.*, 2015). Aunque no está del todo esclarecido el papel que juega STIM2 (Avila-Medina *et al.*, 2018) algunos autores parecen asociar la variante STIM2.2 a una activación de SOCE (Rana *et al.*, 2015) mientras que otros relacionan STIM2.1 con su inactivación (Rosado *et al.*, 2016); además de mostrar asociaciones entre STIM2 y los canales Orai de manera constitutiva e independientes al Ca^{2+} (Soboloff *et al.*, 2006; Parvez *et al.*, 2008).

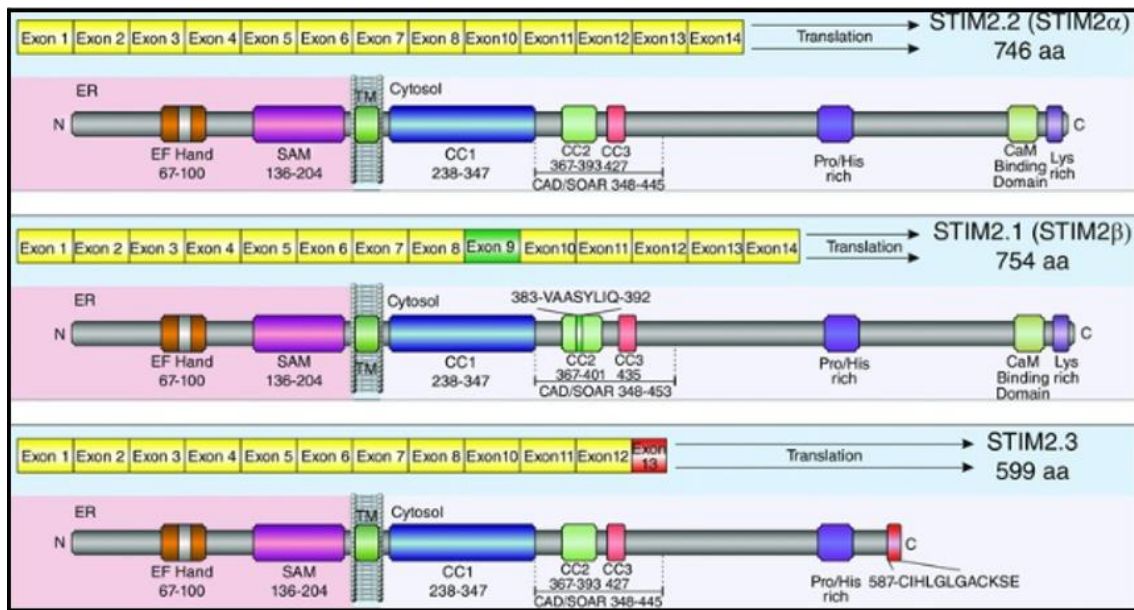


Figura 20. Estructura de las isoformas de STIM2 (STIM2.1; STIM2.2; STIM2.3) (Berna-Erro *et al.*, 2017).

2.2.3.d. Orai1 (CRACM1).

La proteína Orai1 (también conocida como CRACM1) es una proteína transmembrana de la membrana celular de ~ 33 kDa (Feske *et al.*, 2006; Vig *et al.*, 2006). En mamíferos, la familia Orai tiene tres isoformas (Orai1, Orai2 y Orai3), siendo la isoforma Orai1 la principal proteína de la familia que contribuye a la formación de poro y entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular. Estas variantes secuenciales conservan grandes similitudes entre sus dominios transmembrana y presentan ambos dominios, N- y C-terminal, orientados hacia el citoplasma (Prakriya *et al.*, 2006; Yeromin *et al.*, 2006; Gwack *et al.*, 2007). Se estructuran además en 4 dominios transmembrana en hélice conectados entre sí por 2 bucles extracelulares y uno citoplasmático (Prakriya and Lewis, 2015). En general, las proteínas Orai utilizan una carga negativa en un residuo de glutamato para unir Ca^{2+} selectivamente. El residuo E106 de la primera región transmembrana (TM1) es crucial para la selectividad a Ca^{2+} de Orai1 (Prakriya *et al.*, 2006; Vig *et al.*, 2006; Yeromin *et al.*, 2006).

Orai1 fue descrito en 2006 como integrante del poro del canal que media la corriente I_{CRAC} . Tanto su extremo N-terminal como C-terminal están involucrados en su activación e interacción funcional con STIM1 facilitando, consecuentemente, la apertura de canales Orai y la entrada de una corriente de Ca^{2+} de baja conductancia (Muik *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2009; Derler, Plenk, *et al.*, 2013; McNally *et al.*, 2013; Palty, Stanley and Isacoff, 2015).

Aunque inicialmente se sugirieron cuatro monómeros de Orai1 como la estructura funcional del poro selectivo para Ca^{2+} en el canal CRAC (Mignen, Thompson and Shuttleworth, 2008; Penna *et al.*, 2008; Madl *et al.*, 2010; Demuro *et al.*, 2011; Derler *et al.*, 2012) no fue hasta 2012, una

vez cristalizado el canal funcional en *Drosophila melanogaster*, cuando se reveló una agrupación hexamérica de subunidades Orai (Hou *et al.*, 2012). Según sus autores, se formaría una estructura cuaternaria de tres dímeros de Orai con sus dominios C-terminal interconectados donde el principal punto de unión/conducción de Ca^{2+} estaría formado por un **anillo principal** y céntrico constituido por los 6 TM1 de los respectivos Oraís. El punto de acceso hasta el residuo E106 y, por consiguiente, el acceso al canal Orai es extracelular, a través del bucle entre TM1 y TM2, una región altamente conservada con varios grupos aspartatos (Asp110, Asp112 y Asp114) (Hou *et al.*, 2012). Los dominios TM2 y TM3 conforman un **segundo anillo** adyacente que separa al anterior de la MP y el TM4, por su parte, constituye un **tercer anillo** íntimamente relacionado con los componentes de la MP (Hou *et al.*, 2012). En el extremo N-terminal destacan dos **dominios ricos en prolínas (Pro)** (aa3 y aa39), un **dominio rico en arginina (Arg)** (aa28), un **dominio rico en argininas/lisinas (Arg/Lys)** (aa78) y una **región “N-terminal de Orai1 transmembrana extendida” (ETON)** (aa73-90) en la que se incrusta un **dominio de unión a calmodulina** justo antes de TM1 (Mullins *et al.*, 2009). Este ETON es en realidad una extensión en α -hélice del TM1 que se incrusta en el citosol $\sim 20 \text{ \AA}$ (Derler, Plenk, *et al.*, 2013). Los dominios en hélice de TM2 y TM3 también se expanden hacia el citosol y se interconectan mediante un bucle citoplasmático (aa140-174). La extensión citosólica del dominio TM4 finaliza en el extremo C-terminal con una región flexible altamente conservada que le permite la dimerización con otro Orai en el hexámero (Hou *et al.*, 2012; Stathopoulos *et al.*, 2013), además de presentar un **dominio coiled-coil (CC)** de unión al extremo carboxilo de STIM1 (Muik *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2009). El **pequeño fragmento de activación Orai-STIM (CAD)** es uno de los puntos de mayor anclaje entre ambas proteínas presente en el extremo C-terminal de Orai1 (Park *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2009). Ver “Figura 21. Estructura de Orai1 (CRACM1)”.

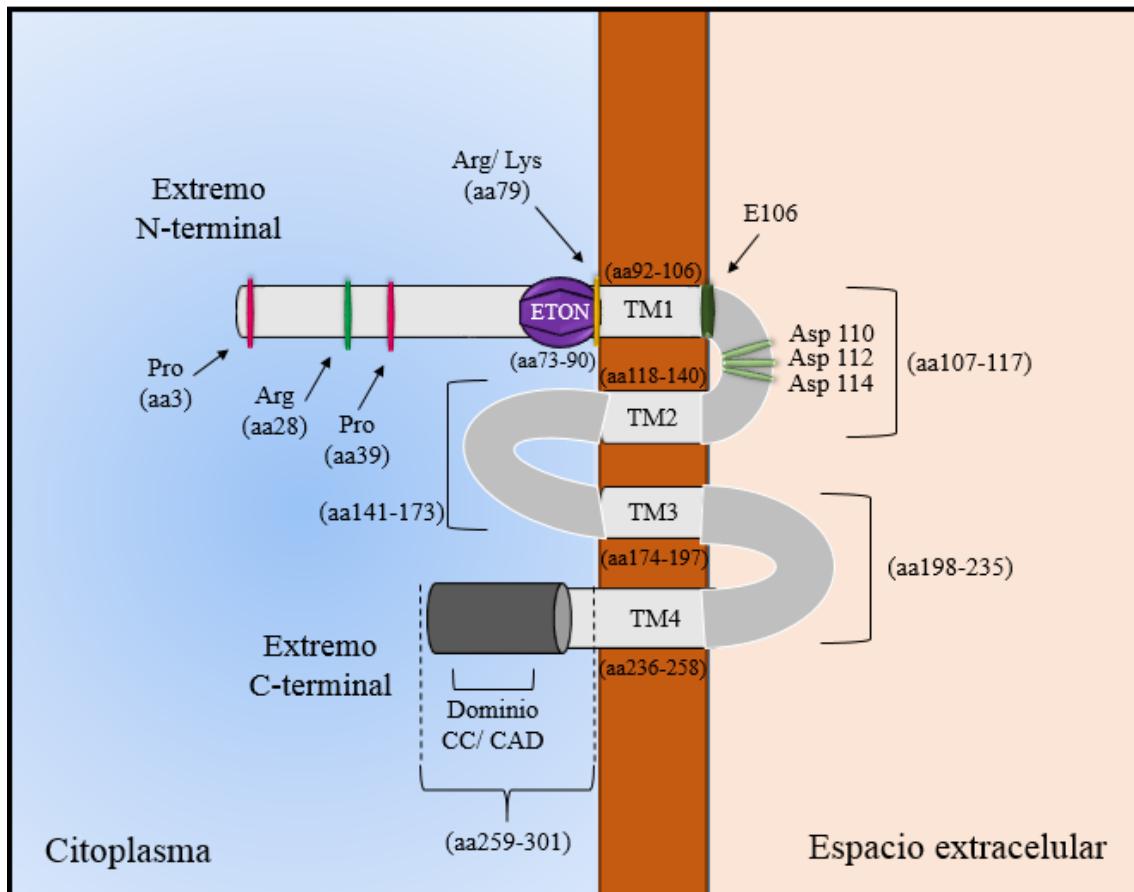


Figura 21. Estructura de Orai1 (CRACM1).

Orai1 presenta dos variantes formadas como consecuencia de un sitio alternativo de iniciación en la transcripción del ARNm, una forma “larga” con un dominio mayor N-terminal (+ 63 aa) denominado Orai1 α , y otra “corta” (que se inicia en la metionina 64) denominado Orai1 β (Fukushima *et al.*, 2012). La variante Orai1 β aparece al iniciar su traducción en la metionina 64, y posiblemente en la 71, de la variante Orai1 α . Ambas se expresan de forma ubicua, presentan una distribución celular pareja y se han visto en células humanas HEK293, T Jurkats, HeLa, así como en otras tumorales como las H441 de pulmón o las T84 colonorrectales (Fukushima *et al.*, 2012). Funcionalmente, los 63 aminoácidos que diferencian a Orai1 β (~ 23 kDa) de Orai1 α (~33 kDa) contienen: una región rica en prolina al inicio de su transcripción que sugiere una funcionalidad mediadora en la activación de STIM1 (Takahashi *et al.*, 2007), una secuencia rica en arginina que está involucrada en la interacción con PIP₂ en la membrana así como con la proteína caveolina (Calloway *et al.*, 2011; Fukushima *et al.*, 2012), y un dominio de interacción con AC8 que se solapa con tres residuos de serina susceptibles de fosforilación por PKC (Ser-27 y Ser-30) y PKA (Ser-34) (Trebak and Putney, 2017). Se ha demostrado que ambas isoformas se asocian a STIM1 para constituir canales CRAC y SOC. La mayor diferencia entre ambas radica en el hecho de que Orai1 α es capaz de formar canales independientes de los depósitos de Ca²⁺, constituyendo canales ARC/LRC a partir de heterómeros junto a Orai3 (Desai *et al.*, 2015). No obstante, la implicación en estos procesos biológicos de ambas variantes suscita ciertas

discrepancias entre los investigadores y, en la actualidad, es necesario un mayor desarrollo molecular de los procesos hasta ahora mencionados.

2.2.3.e. Orai2 (CRACM2).

Mientras que Orai1 ha sido ampliamente estudiado e implicado en su papel en SOCE (entre otros) y Orai3 parece asociarse más a mecanismos de entrada de Ca^{2+} independientes al vaciamiento de los depósitos intracelulares, Orai2 es la isoforma más desconocida. En 2006, Mercer *et al.*, definieron a Orai2 como canal CRAC al demostrar su activación tras el vaciamiento de los depósitos, siendo estos canales más selectivo para Ca^{2+} que para Na^+ (Mercer *et al.*, 2006) ejerciendo un papel mucho menor como regulador de las corrientes de Ca^{2+} operadas por depósito si se compara con Orai1 y Orai3 (Gwack *et al.*, 2007).

Orai2, de manera muy similar a Orai1, va a estar presente de manera ubicua en una gran variedad de tipos celulares, incluyendo células B (Wissenbach *et al.*, 2007), células dendríticas (Bandyopadhyay, Pingle and Ahern, 2011; Yan *et al.*, 2015), macrófagos (Gao *et al.*, 2010), plaquetas (Berna-Erro *et al.*, 2012), células del músculo liso (Baryshnikov *et al.*, 2009), células HEK (Gross *et al.*, 2007) y melanocitos (Stanisz *et al.*, 2012). Es frecuente localizarlo en cerebro, corazón, pulmón, hígado, testículos, intestino y músculo esquelético (Gross *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2007).

Tanto STIM1 como p45 (CRACR2A) co-inmunoprecipitan con Orai1, Orai2 y Orai3, sugiriendo un mecanismo de unión altamente conservado en los distintos miembros de la familia Orai y en los canales Orai. Tanto es así que las isoformas se encuentran ampliamente presentes en los vertebrados, mostrando 4 dominios transmembrana conectados mediante un bucle intracelular y dos extracelulares, además de orientar ambos extremos (N- y C-terminal) hacia el citosol (Feske *et al.*, 2006; Feske, Skolnik and Prakriya, 2012; Hoth and Niemeyer, 2013). Varios son los estudios que han detallado la variabilidad entre estas estructuras, mostrando hasta ~ 60% de la secuencia de aa homóloga entre Orai2 y Orai1 (Hewavitharana *et al.*, 2007; Feske, 2009), ~ 66% con Orai3; y aumentando al 93.8% entre ORAI2-ORAI3 y 92.5% entre ORAI2 and ORAI1 si nos ceñimos a los dominios transmembrana (Feske *et al.*, 2006; Hewavitharana *et al.*, 2007; Feske, 2009). Aunque la región ETON permanece intacta en los tres miembros de la familia, existen pequeñas variaciones que están presentes en el extremo N-terminal. Si comparamos el extremo C-terminal, tres glutamatos permanecen comunes en Orai2 y Orai3, faltando uno de ellos en Orai1 (Frischauf *et al.*, 2009). Esta característica se ha asociado con fenómenos de inactivación rápida que explicarían la inactivación reducida encontrada en Orai1 en comparación con Orai2 y Orai3 (Lis *et al.*, 2007; Frischauf *et al.*, 2009), además de presentar pequeñas señales de SOCE mediadas por Orai2 u Orai3 aun silenciando la expresión de Orai1 (Gwack *et al.*, 2007, 2008). También se

ha demostrado que la probabilidad de formar dominios CC en el extremo C-terminal en Orai1 es 17 veces menor que en Orai2 y Orai3, existiendo diferencias entre uniones STIM1-Orai, postulándose una mayor sensibilidad de Orai2 y Orai3 sobre Orai1 (Frischauf *et al.*, 2009).

Tanto en la especie humana como en ratón vamos a encontrar dos variantes de Orai2 debido a *splicing* alternativo: una forma larga (Orai2L) y otra corta (Orai2S). Orai2S está fuertemente asociada a la inactivación por Ca^{2+} intracelular y juega un papel negativo en la formación de canales de Ca^{2+} cuando se co-expresa con Orai1 (Gross *et al.*, 2007; Wissenbach *et al.*, 2007; Fukushima *et al.*, 2012). Ver “Figura 22. Estructura de Orai2 (CRACM2)”.

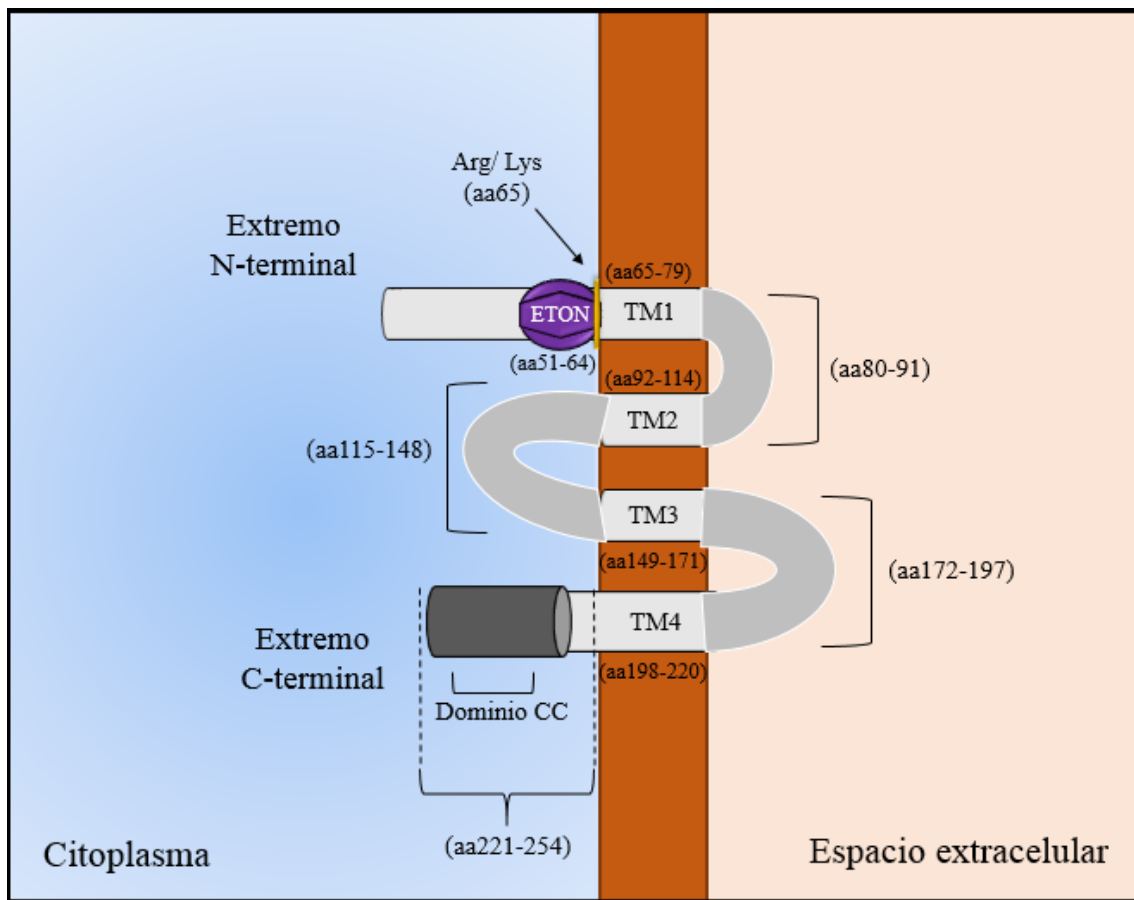


Figura 22. Estructura de Orai2 (CRACM2).

2.2.3.f. Orai3 (CRACM3).

Orai3 es otro miembro de la familia de proteínas Orai, descubierto en 2006 y descrito como un canal CRAC altamente selectivo a Ca^{2+} activado por el vaciamiento previo de los depósitos de Ca^{2+} intraluminales, que forma un poro de baja conductividad iónica (Feske *et al.*, 2006; Vig *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006).

Se encuentra expresado en todos los mamíferos (Cai, 2007) y ubicuamente en humano y ratón. Más específicamente, su transcrito (~ 2.2 kb) se ha encontrado en corazón, riñón, timo, pulmón,

bazo, músculo esquelético, intestino delgado, médula ósea, células endoteliales, placenta, testículos (Gwack *et al.*, 2007; Motiani, Zhang, *et al.*, 2013), músculo liso vascular (Trebak, 2012) y tejido muscular liso de vías respiratorias (Peel, Liu and Hall, 2008). Destaca su alta expresión, en comparación con resto de miembros de Orai, en cerebro (Gwack *et al.*, 2007).

Orai3 comparte hasta el 63% de la estructura de Orai1, conservando idénticamente a Orai1 el 34% del dominio N-terminal y el 46% del C-terminal (Mignen, Thompson and Shuttleworth, 2008; Shuttleworth, 2012). Estas variaciones en su secuencia de aminoácidos explicarían algunas de las propiedades únicas que lo diferencian del resto de isoformas (Shuttleworth, 2012). Como el resto de miembros de su familia, presenta 4 dominios transmembrana (TM1, TM2, TM3 y TM4) con un dominio de unión a calmodulina en el extremo N-terminal y un dominio CC en el extremo C-terminal. El extremo N-terminal comprende ~ 65 aa y carece de las regiones ricas en prolinas y regiones ricas en argininas presentes en Orai1 (Takahashi *et al.*, 2007; Frischauf *et al.*, 2008). Este dominio, además, juega un papel crucial en la regulación de los canales activados por AA (Thompson, Mignen and Shuttleworth, 2010) aunque también se ha demostrado que la interacción entre el dominio CC2 de STIM1 y el extremo C-terminal de Orai3 es decisivo para la activación por leucotrieno C4 (LTC4) de los canales activados por leucotrieno C4 (LCR) (Zhang *et al.*, 2013). Orai3 tiene el bucle extracelular TM3-TM4 mucho más largo que en el resto de isoformas (~72 aa en Orai3 comparados con 38 aa en Orai1), compartiendo escasamente el 21% de homología con el mismo bucle de Orai1. A diferencia de Orai1, Orai3 carece del residuo de asparagina localizado entre TM3 y TM4 necesario para su glicosilación (Prakriya *et al.*, 2006; Frischauf *et al.*, 2008) pero alberga tres regiones intracelulares potencialmente accesibles para su fosforilación por proteínas cinasas: el extremo N-terminal, el bucle intracelular TM2-TM3 y el extremo C-terminal. Adicionalmente, Orai3 conserva tres glutamatos en su extremo C-terminal a los que se les atribuye la inactivación rápida dependiente de Ca^{2+} (Kyu *et al.*, 2009).

Esta proteína se localiza en la membrana plasmática y regula la entrada selectiva de Ca^{2+} a través de canales iónicos (Feske *et al.*, 2006; Prakriya *et al.*, 2006; Vig *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006) por medio de un único poro y operado por los depósitos de Ca^{2+} , conformándose en heterómeros Orai1/Orai2/Orai3 (Ji *et al.*, 2008; Mignen, Thompson and Shuttleworth, 2008; Penna *et al.*, 2008; Maruyama *et al.*, 2009). También se ha demostrado que Orai3 media SOCE en un subconjunto de células de cáncer de mama positivas para receptores estrogénicos (Motiani, Abdullaev and Trebak, 2010; Motiani, Stolwijk, *et al.*, 2013; Motiani, Zhang, *et al.*, 2013). Incluso puede expresarse de manera conjunta con TRPC6 o TRPC3 en células HEK293, al igual que Orai1 (Liao *et al.*, 2007). Por otra parte, es la única isoforma que ejerce un papel en la entrada de Ca^{2+} activada por AA independiente a los depósitos de Ca^{2+} intracelulares (ARC) (Mignen and Shuttleworth, 2000) y entrada de Ca^{2+} activada por leucotrieno C4 independiente a los depósitos de Ca^{2+} intracelulares (LRC) (Zhang *et al.*, 2013). Para mediar la entrada en los canales ARC, se agregan

pentámeros de 3 Orai1 y 2 Orai3 (organizados como 31113 o 31311) (Mignen, Thompson and Shuttleworth, 2008; Thompson, Mignen and Shuttleworth, 2010) sensibles a bajas concentraciones de AA (2-8 μM) (Mignen, Thompson and Shuttleworth, 2009). Para ARC y LAR los protagonistas requeridos son STIM1, Orai1 y Orai3 (Zhang *et al.*, 2013).

Tanto los residuos E81 (TM1) y E165 (TM3) presentes en los dominios transmembrana como los E85, D87 y E89 presentes en el bucle TM1-TM2 determinan la alta afinidad por el Ca^{2+} en Orai3. La calmodulina y STIM son estructuras que interaccionan con Orai3 pero no son las únicas; así, CRACR2A/B forma uniones con esta proteína (Srikanth *et al.*, 2010). De manera indirecta, además, la bibliografía recoge una variedad de moléculas que modulan Orai3 a través de su unión con STIM1, siendo alguna de ellas las siguientes: SARAF (Palty *et al.*, 2012), MS4A4B (Howie *et al.*, 2009), Golli (Walsh, Doherty, *et al.*, 2010), AC8 (Martin *et al.*, 2009), policistina-1 (Woodward *et al.*, 2010), caveolina (Yu, Sun and Machaca, 2010), canales Cav1.2 (Wang *et al.*, 2010) o PIP_2 y PIP_3 (Korzeniowski *et al.*, 2009; Walsh, Chvanov, *et al.*, 2010). Ver “Figura 23. Estructura de Orai3 (CRACM3)”.

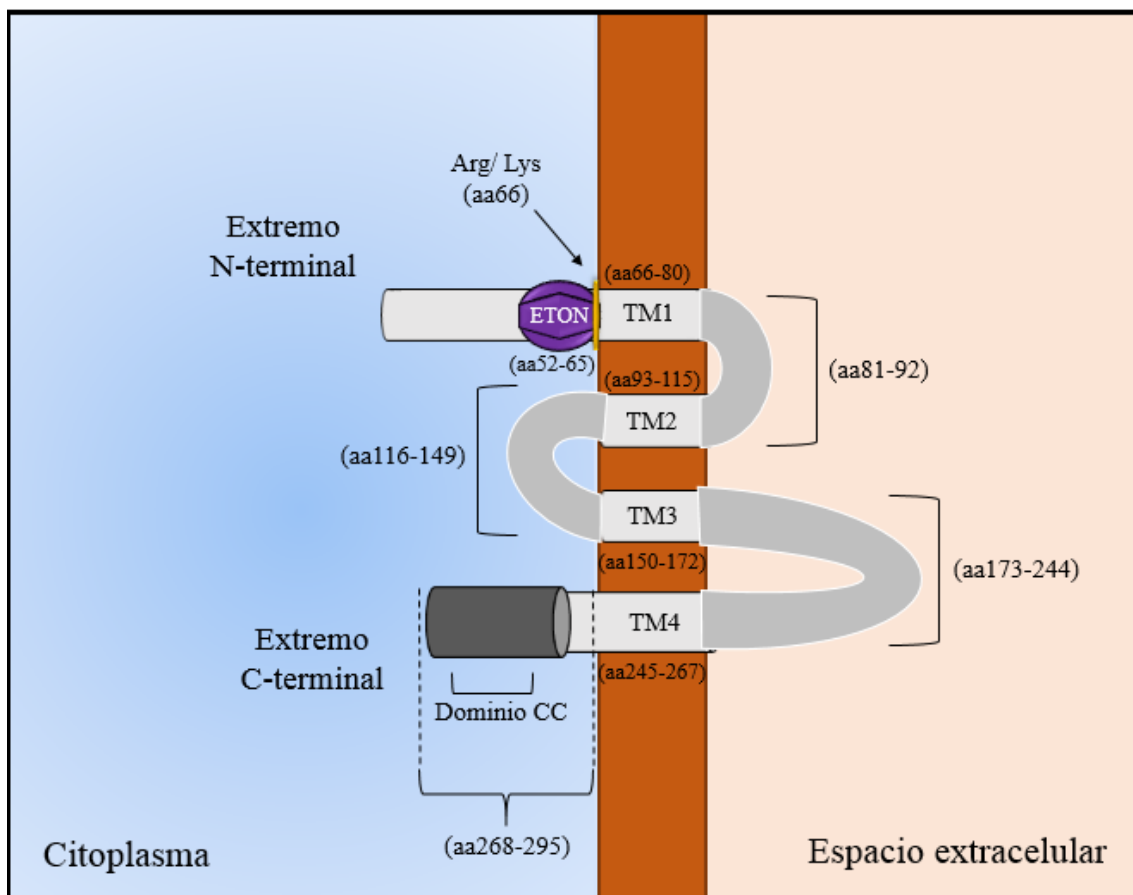


Figura 23. Estructura de Orai3 (CRACM3).

2.2.3.g. Canales TRP (Transient Receptor Potential channels).

Desde finales de los años 90 y hasta los primeros años de este siglo, la búsqueda de los mecanismos responsables del acoplamiento y regulación de SOCE fue intenso (Parekh and Putney, 2005). En este escenario, los receptores de potencial transitorio (TRP) se presentaron como los protagonistas más plausibles gracias a estudios previos que los relacionaban con la activación de fotorreceptores en *Drosophila melanogaster* (Xu *et al.*, 1997), incluyendo, entre otros, a TRPC1, TRPC3 y TRPV6 (Yue *et al.*, 2001; Cui *et al.*, 2002; Mori *et al.*, 2002; Philipp *et al.*, 2003). En *Drosophila spp.* una mutación en el canal TRP ocasionaba una despolarización transitoria durante la exposición a la luz en los fotorreceptores a diferencia de la despolarización sostenida producida por la entrada de iones Ca^{2+} y Na^+ observada en los especímenes silvestres (Hardie and Minke, 1992). Aunque estos canales modulan flujos de Ca^{2+} a través de la MP, constituyen una familia muy extensa con una amplia variabilidad funcional presentes tanto en células excitables como en células no excitables. Son canales que contribuyen a la homeostasis del Ca^{2+} intracelular ya sea directamente modulando su entrada o bien indirectamente a través de la polaridad de membrana (Brini *et al.*, 2013). Pueden ser activados por PIP_2 (Qin, 2007) y generar corrientes de Ca^{2+} reguladas mediante mecanismos de retroalimentación positivos y negativos. Existen distintos canales, la mayoría de ellos presentes en mamíferos, que se agrupan en 7 familias: TRPC (canónico), TRPV (vaniloide), TRPM (melastatina), TRPN (no-mecanorreceptor potencial C), TRPA (anquirina), TRPP (policisteína) y TRPML (mucolipina) (Gees, Colsoul and Nilius, 2010) (Colletti and Kiselyov, 2011) representadas en la “figura 24”. La estructura básica de todos ellos consiste en 6 dominios transmembrana (TM1, TM2, TM3, TM4, TM5 y TM6) con un único poro localizado en el bucle TM5-TM6 y con ambos extremos (N-terminal y C-terminal) orientados hacia el citosol. Los canales TRP tienden a tetramerizar formando megaestructuras de 24 α -hélices con diferentes dominios funcionales, entre ellos una región rica en anquirina presente en el extremo N-terminal (TRPC, TRPV y TRPA) involucrada en las interacciones proteicas (Schaefer, 2005; Venkatachalam and Montell, 2007; Hellmich and Gaudet, 2014). Aunque la mayoría carecen del complemento cargado en TM4 que le confiere una dependencia a canales operados por voltaje, un gran número sí que pueden ser activados por voltaje (Reaves and Wolstenholme, 2007). Varios miembros de la familia TRPM presentan un dominio cinasa en su extremo C-terminal. TRPC y TRPM albergan un “dominio TRP” adyacente a TM6 asociado a la reorganización de canales y la traducción proteica (Gregorio-Teruel *et al.*, 2014). Una parte, solo los presentes en mamíferos, contienen dominios CC en su extremo N-terminal y/o C-terminal (Baez-Nieto *et al.*, 2011), así como TRPC interacciona con STIM1 (Lee *et al.*, 2014).

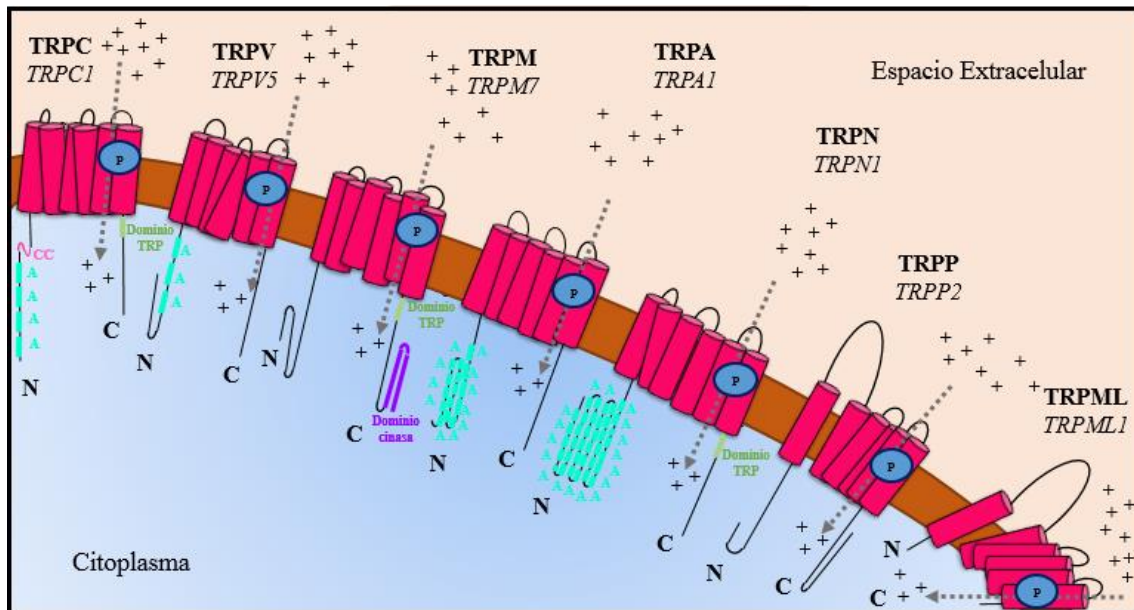


Figura 24. Familia de canales TRP (Transient Receptor Potential).

Los canales TRPC, fundamentalmente TRPC1 (Jardin *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009; Guéguinou *et al.*, 2016; Ambudkar, de Souza and Ong, 2017), y también en menor medida TRPC4 (Fatherazi *et al.*, 2007; Sundivakkam *et al.*, 2012) y TRPC6 (Brécharde *et al.*, 2008; Jardín *et al.*, 2008; Selli *et al.*, 2009), están citados en la bibliografía como reguladores de Ca^{2+} tras el vaciamiento previo de los depósitos intracelulares. Otros miembros de otras familias también se han relacionado con los canales SOC, como es el caso de los TRPV4 (Goldenberg *et al.*, 2015; Jernigan, 2015) y TRPV6 (Derler, Schindl, *et al.*, 2013).

A diferencia de lo que ocurre en I_{CRAC} , los canales TRPC presentan una selectividad media hacia el ion Ca^{2+} . No obstante, bajo ciertas condiciones parecen actuar como receptores activados por el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} . En esta situación, dependen de Orai1 y STIM1 (Ong *et al.*, 2007; Kwong *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2011). Durante algún tiempo se barajaron uno o varios participantes como partes constituyentes del propio canal (Birnbaumer *et al.*, 1996). Son siete los canales TRPC presentes en mamíferos (TRPC1-TRPC7), homólogos en *Drosophila spp.*, y activados por receptores unidos a fosfolipasa C y a la producción de IP_3 (Putney, 2004). Hay autores que muestran la activación de TRPC1, TRPC4 y TRPC5 por STIM1 pero no en TRPC3 y TRPC6 (Asanov *et al.*, 2015). Parece generalizarse, por tanto, su mayor o menor implicación como moduladores de Orai1 en la regulación de STIM1 (Ambudkar *et al.*, 2007; Liao *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2010) y son varios los canales TRPC que se han propuesto como SOCs (Ambudkar *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007; Worley *et al.*, 2007). En este sentido, Zeng *et al.*, postularon un modelo de interacción electrostática para la activación de TRPC1 por STIM1 (Zeng *et al.*, 2008). Uno de los rasgos más característicos de los integrantes de la familia TRPC

es la presencia de un dominio CaM y dominio de unión a IP₃R en su extremo C-terminal, necesarios para la estructuración del canal TRPC (Wedel *et al.*, 2003; Dionisio *et al.*, 2011).

La proteína TRPC1 es la más estudiada de entre todos los miembros de la familia TRPC. Se trata de un polipéptido de 793 aa que está altamente expresado en los tejidos humanos (cardiomiocitos, megacariocitos, mioblastos, fibroblastos o plaquetas, etc.) donde se ha demostrado que modula la ECC (Xu and Beech, 2001; Rosado, Brownlow and Sage, 2002; Ohba *et al.*, 2007; Galán *et al.*, 2009; Oláh *et al.*, 2011; Almirza *et al.*, 2012; López *et al.*, 2013) . No obstante, otros autores muestran que la expresión nativa de esta proteína no tiene efecto sobre el Ca²⁺ (Sinkins, Estacion and Schilling, 1998), sugiriendo un rol de TRPC1 en la ECC asociado a la línea celular en cuestión. Ver “Figura 25. Modelo de integración interactiva entre TRPC1 y STIM1/Orai1 en la ECC”.

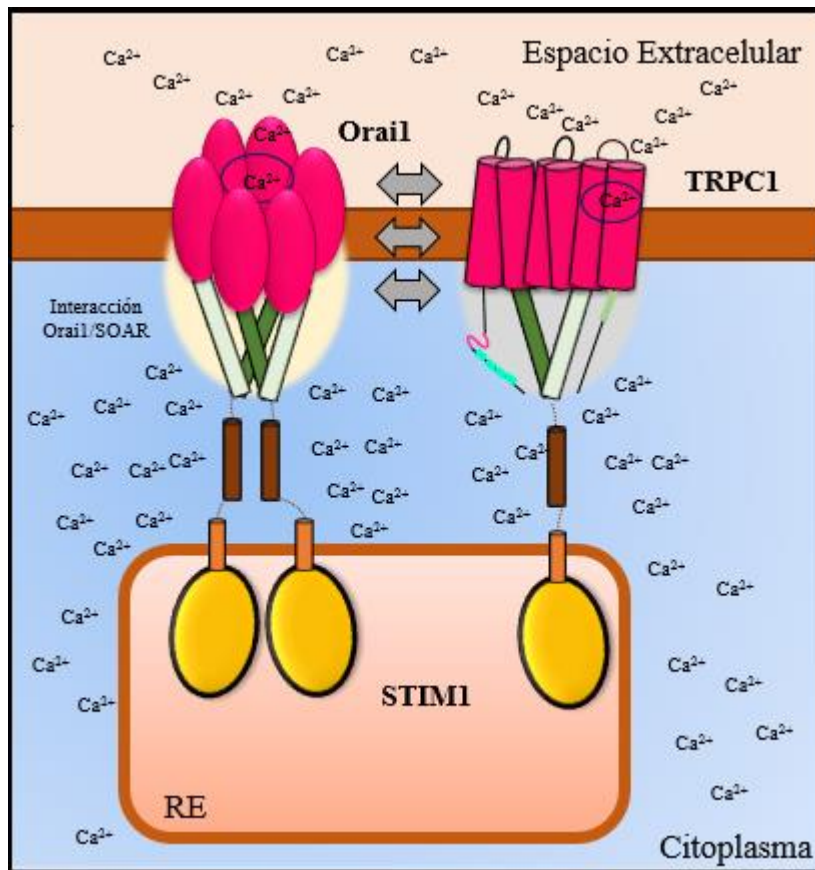


Figura 25. Modelo de integración interactiva entre TRPC1 y STIM1/Orai1 en la ECC.

2.3. CÁNCER DE MAMA Y HOMEOSTASIS INTRACELULAR DEL Ca^{2+} .

2.3.1. – Regulación de ECC en los procesos de cáncer de mama.

Como se ha comentado en los apartados previos, el cáncer de mama es uno de los cánceres con mayor prevalencia (Siegel, Naishadham and Jemal, 2013) que se presenta como la principal causa de muerte por cáncer en mujeres en todo el mundo (Polyak and Metzger Filho, 2012). En las células de cáncer de mama, la regulación del $[\text{Ca}^{2+}]_c$ tiene un papel fundamental en el desarrollo de diferentes aspectos de la patología, como son el crecimiento celular, la proliferación, la migración, la metástasis y la resistencia apoptótica (Cross *et al.*, 2014). El conocimiento de la expresión de las distintas proteínas responsables del transporte de Ca^{2+} presentes en los pacientes juega un valor clínico trascendental asociado a la supervivencia y eficacia de los tratamientos (McAndrew *et al.*, 2011; Azimi, Roberts-Thomson and Monteith, 2014; Peters *et al.*, 2016). En este sentido, existe una gran variedad de canales de Ca^{2+} que están más o menos expresados en las distintas líneas celulares de cáncer de mama y tejido tumoral, como son Orai1, Orai3, TRPC6, TRPV6 y TRPM8, entre otros (Bolanz, Hediger and Landowski, 2008; Chodon *et al.*, 2010; Faouzi *et al.*, 2011; McAndrew *et al.*, 2011). Un ejemplo de cómo esta regulación del $[\text{Ca}^{2+}]_c$ modula algunos de los aspectos más importantes del cáncer es, por ejemplo, el desencadenado por el AA en células endoteliales extraídas de carcinoma mamario humano. Aquí, el AA produce un aumento de la entrada de Ca^{2+} , disminuyendo la respuesta SOCE, para favorecer la progresión del cáncer en las primeras fases de la angiogénesis (proliferación células endoteliales y tubulogénesis) (Fiorio Pla *et al.*, 2008).

Dentro de la comunidad científica, está más que aceptado que la evolución del cáncer lleva implícito una serie de características malignas intrínsecas a las propias células en los procesos de proliferación, migración, invasión y/o metástasis (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011). Estudios, cada vez más numerosos, han demostrado como SOCE, orquestado por miembros de las familias STIM y Orai, como coordinadores de las señales intracelulares de Ca^{2+} , regulan una plétora de procesos cancerígenos (Soboloff *et al.*, 2012; Prevarskaya *et al.*, 2014; Fiorio Pla, Kondratska and Prevarskaya, 2016). Son muchos los autores que han contribuido a este conocimiento en cáncer de mama. Ya en 1995, Yeh *et al.*, demostraron como el flavonoide quercetina y el carboxiamidotriazol (bloqueante de canales Ca^{2+}) disminuían la entrada de Ca^{2+} en células MDA-MB-435 e impedían el crecimiento celular (Albert Yen, Herenyiova and Weber, 1995). Cabe destacar que análisis más actuales han revelado que la línea MDA-MB-435 es una línea celular de tipo melanoma, aunque hasta hace poco se encasillaba dentro de los modelos más representativos del tipo cáncer de mama (Prasad and Gopalan, 2015).

SOCE también se ha asociado con el metabolismo de las células de cáncer de mama. Estudios realizados en el MCU por Tang *et al.*, establecieron una estrecha relación metabólica entre SOCE y MCU y, tras el silenciamiento de la expresión de MCU, muestran una reducción de SOCE con la consecuente pérdida de la función de migración en células TNBC MDA-MB-231 (Tang *et al.*, 2015). En este contexto, los canales Orai son uno de los más estudiados y sobreexpresados en las líneas de cáncer de mama, tanto en líneas ER+ (MCF7) como líneas TNBC (MDA-MB-231) (McAndrew *et al.*, 2011; Jardin, Diez-Bello, *et al.*, 2018). Específicamente, Orai3 está altamente expresado, en su ARNm como a nivel proteico, en muestras clínicas humanas y líneas celulares de cáncer de mama ER+ (Motiani, Abdullaev and Trebak, 2010; Faouzi *et al.*, 2011; Chalmers and Monteith, 2018; Jardin, Diez-Bello, *et al.*, 2018). A rasgos generales, se podría decir que Orai1 y STIM1 en muestras de tejido tumoral se encuentran sobreexpresados en comparación con su expresión en tejidos pre- o no cancerígenos de pacientes (So *et al.*, 2019). Un estudio de *microarrays* de expresión correlacionó los subtipos más agresivos de cáncer de mama y de peor pronóstico con los perfiles más elevados de expresión STIM1/STIM2 asociados a SOCE aumentado, presentando una evidencia más de la importancia de miembros de la familia STIM en el cáncer de mama (McAndrew *et al.*, 2011). No obstante, la presencia de STIM1 *per se* entre los diferentes subtipos de líneas celulares de cáncer de mama difiere entre sí, encontrándose variables los valores de sobreexpresión en líneas TNBC. Aparece en mayor medida (sobreexpresión) en tipo celular BT20 en comparación con MDA-MB-231 o HCC1937 (valores normales) (Motiani, Abdullaev and Trebak, 2010). En paralelo, en modelos ER+, STIM1 muestra una expresión normal en HCC1500 y ZR751, y reducida en MCF7, T47D y BT474 (Motiani, Abdullaev and Trebak, 2010). Si, además, se compara su expresión con la de STIM2, se aprecia un aumento entre 2 y 5 veces de STIM1, exceptuando la línea HER2+ SK-BR-3 que presenta concentraciones > 10 veces superiores a STIM2. Esta tendencia se mantiene entre las distintas muestras de cáncer de mama estudiadas en pacientes (McAndrew *et al.*, 2011). Análisis complementarios del perfil génico de expresión de TRPC1 han demostrado que esta proteína se encuentra moderadamente sobre-regulada en las líneas basales de cáncer de mama (MDA-MB-231) en comparación con otros subtipos o líneas no tumorales (Azimi *et al.*, 2017). Más recientemente, el TRPC6 se ha encontrado expresado tanto en subtipos ER+ (MCF7) como TNBC (MDA-MB-231) (Jardin, Diez-Bello, *et al.*, 2018), donde se le ha asociado a SOCE (Brécharde *et al.*, 2008; Jardín *et al.*, 2008; Jardin *et al.*, 2009). Además de éstas, otras isoformas de la familia TRP (TRPC3, TRPM7, TRPM8 y TRPV6) se han correlacionado con la progresión de cáncer de mama (Chen *et al.*, 2014).

2.3.2. – Proliferación en cáncer de mama.

2.3.2.a. STIM.

La importancia que presentan STIM/Orai como mediadores de SOCE en la proliferación de las células de cáncer de mama ha sido estudiada en numerosas ocasiones. Ambas proteínas median microdominios de Ca^{2+} que controlan la fase G1/S del ciclo celular y la actividad SOCE puede fluctuar dependiendo la progresión del ciclo y el subtipo celular. Farmacológicamente, bloqueantes o silenciamientos de STIM1 y/o Orai1 reducen las fosforilaciones de cinasas dependientes de ciclinas (CDK2) y paran la fase G1/S del ciclo celular con la consiguiente transición a autofagia. El silenciamiento de STIM1 *per se* ralentizaría la proliferación por falta de continuidad del ciclo celular (G0/G1) atribuido a su regulación por CDK4, ciclina D1 y p21 (Chen *et al.*, 2016). Relacionado con esto, Emeriau *et al.*, en 2018, demostraron en varias líneas de cáncer de mama que aquellos inhibidores de tirosinas cinasas que fueron capaces de disminuir la respuesta SOCE, como el lapatinib y el CP-724714, tuvieron un efecto antiproliferativo mayor que aquellos inhibidores que no afectaron a SOCE (Emeriau *et al.*, 2018). Además de efectos en la proliferación, otros inhibidores farmacológicos de SOCE, como Synta66 y YM58482 (también llamado BTP2), ejercen un efecto anti-migración en células MDA-MB-468 inducido por agonistas como ATP, tripsina y EGF (Azimi *et al.*, 2018). A través del silenciamiento de STIM1, y la menor respuesta de SOCE, se han demostrado efectos anticancerígenos en células de cáncer triple negativas inducidas por el femindol. Este derivado indólico sintético disminuye la colocalización y coinmunoprecipitación de STIM1-Orai1 en células MDA-MB-231, disminuyendo la supervivencia de las mismas (Chakraborty *et al.*, 2016). Tanto en un subtipo TNBC (MDA-MB-231) como en otro ER+ (MCF7), la proliferación de estas líneas celulares se detiene como consecuencia del silenciamiento de STIM1 (disminución SOCE) inducido por el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) que actúa impidiendo el progreso de la fase G0/G1 del ciclo celular (Cheng, Wang and Feng, 2016).

2.3.2.b. Orai.

Mientras que SOCE está mediado por Orai1/STIM1 en los subtipos ER-, Orai3 a través de STIM1/STIM2 parece ser el encargado de hacerlo en las ER+ (Motiani, Abdullaev and Trebak, 2010; Motiani, Stolwijk, *et al.*, 2013). La falta de Orai1 en la línea tumoral MCF7 reflejó una disminución de la proliferación y del crecimiento tumoral en experimentos *in vitro* e *in vivo* (Feng *et al.*, 2010), lo que sugiere una cierta regulación de la entrada de Ca^{2+} mediada por la activación de los depósitos intracelulares aún presente en los subtipos ER+ (McAndrew *et al.*, 2011). Por su parte, una vez silenciada la expresión de Orai3 en la misma línea MCF7, se redujo el crecimiento *in vitro* y el crecimiento xenográfico del tumor *in vivo*, asemejándose a los resultados obtenidos con el siOrai1 (Motiani, Zhang, *et al.*, 2013). Los efectos del silenciamiento del Orai3 en esta línea celular se asociaron a la disminución en la actividad ERK1/2, cinasa de adhesión focal y

factor de transcripción nuclear NFAT (Motiani, Zhang, *et al.*, 2013) además de la parada de la fase G1 del ciclo celular por una disminución del proto-oncogen c-myc y acumulación del factor de supresión tumoral p53 (Faouzi *et al.*, 2011, 2013). Estos mismos autores han descrito en detalle la importancia que tiene Orai3 en cáncer de mama y su papel en el ciclo celular y supervivencia, al demostrar cómo media la supervivencia de las células cancerígenas de mama pero no las de epitelio normal de mama (MCF10A) (Faouzi *et al.*, 2011), correlacionando Orai3 y el oncogen c-myc en muestras humanas de cáncer de mama (Faouzi *et al.*, 2013). No hay muchas evidencias sobre estudios en profundidad de Orai2 y su papel en la proliferación en las líneas de cáncer de mama, aunque su ARNm está ampliamente distribuido e incluso elevado en algunas de ellas (McAndrew *et al.*, 2011).

Finalmente, se ha asociado un efecto pro-proliferativo entre SPCA2-Orai1 a través del aumento en la $[Ca^{2+}]_c$ que activa la ruta Ras-ERK (Torii *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2010), así como una interacción funcional con los canales Kv10.1 involucrados en la supervivencia celular del cáncer de mama promovida por colágeno-1 (Badaoui *et al.*, 2018). Ambos mecanismos son fundamentales para la propagación del proceso tumoral y promueven una vía independiente de SOCE.

2.3.2.c. TRP.

Varios estudios han confirmado una expresión elevada de TRPC6 (ARNm) en diferentes muestras de tumor de cáncer de mama (Aydar *et al.*, 2009; Dhennin-Duthille *et al.*, 2011). Recientemente Jardín *et al.*, en 2018, han presentado la sobreexpresión de esta proteína en una línea tumoral de mama ER+ (MCF7) y TNBC (MDA-MB-231), demostrando su implicación esencial en la activación de SOCE y su papel proliferativo, migratorio e invasivo (Jardín, Diez-Bello, *et al.*, 2018). Otros autores ya publicaron anteriormente cómo el silenciamiento de TRPC6 resulta en una disminución en el crecimiento de MDA-MB-231, pero no así en líneas celulares no cancerígenas de mama (Aydar *et al.*, 2009). Estos autores sugieren que TRPC3 y TRPC6 se estructuran en un canal heteromultímero en la línea epitelial triple negativa MDA-MB-231 y pueden ser activados por PIP₂ para regular la proliferación celular (Aydar *et al.*, 2009). TRPC3 está más expresado en la línea triple negativa MDA-MB-231 en comparación con la línea luminal MCF7, donde su inhibición reduce la proliferación y aumenta la apoptosis celular (Wang *et al.*, 2019). Del mismo modo, en la línea ER+ MCF7 se han propuesto canales heteromultímeros entre TRPC6 y TRPC1 (Hiani *et al.*, 2006), donde TRPC1 es necesario para la fosforilación de ERK1/2 y la entrada de Ca²⁺, favoreciendo efectos proliferativos en estas células. La expresión de TRPC1 también se ha visto aumentada en muestras de adenocarcinoma ductal humano en comparación con tejido sano, además de mostrar correlaciones con el tamaño tumoral y el índice proliferativo Ki67, entre otros (Dhennin-Duthille *et al.*, 2011). Adicionalmente, para TRPC1 se ha descrito una

cooperación funcional con KCa3.1 que regula entrada de Ca^{2+} en MCF7 involucrada en la proliferación celular (Faouzi *et al.*, 2016).

TRPV6, por su parte, está altamente presente tanto en cáncer de mama como de próstata, tiroides, colon y ovario (Zhuang *et al.*, 2002; Lehen'kyi, Raphaël and Prevarskaya, 2012). Además está muy presente en muestras de biopsias de cáncer de mama (Bolanz, Hediger and Landowski, 2008; Dhennin-Duthille *et al.*, 2011) asociadas sobre todo al grupo de receptores negativos de estrógenos (ER-) (Peters *et al.*, 2012). En la línea celular T47D, el silenciamiento de esta proteína reduce la proliferación celular como consecuencia de una disminución de la entrada de Ca^{2+} (Peters *et al.*, 2012). Esta disminución en el Ca^{2+} , a su vez, aumenta en gran medida el número de células en fase G1 del ciclo celular. Estudios posteriores, relacionando la interacción entre el supresor tumoral Numb 1 y TRPV6, sugieren una señalización dependiente de Ca^{2+} vía GSK3 β , MAP cinasa y AKT en células de cáncer de mama MCF7 y PC3 (Kim *et al.*, 2013).

De entre todas las proteínas presentes en la familia de TRPM, TRPM7 es la isoforma que se encuentra más expresada en los cánceres humanos de mama. Se la ha asociado a altas tasas de proliferación y se ha propuesto como un diana terapéutica para el control proliferativo de las células luminales MCF7 (Guilbert *et al.*, 2009).

2.3.3. – Migración, invasión y metástasis en cáncer de mama.

Las señales de Ca^{2+} intracelulares juegan un papel vital en los procesos de migración, tanto en células cancerígenas como no cancerígenas, siendo responsables de la reorganización del citoesqueleto, la placa de adhesión focal y la polaridad (Prevarskaya, Skryma and Shuba, 2011; Mayor and Etienne-Manneville, 2016). Los procesos de migración e invasión en las células cancerígenas requieren la metástasis y la diseminación del tumor primario a otros órganos o tejidos (Hanahan and Weinberg, 2011). Estos procesos conllevan, a su vez, otras funciones como la proteólisis de la matriz extracelular (ECM), colonización de tejidos adyacentes, intravasación al sistema linfático y/o capilar, y extravasación y colonización del tejido distante (Talmadge and Fidler, 2010).

2.3.3.a. STIM.

Poco tiempo después de que STIM1 y Orai1 se identificaran como participantes esenciales para la respuesta SOCE, Yang *et al.*, fueron de los primeros en demostrar cómo estos componentes, a través de SOCE, regulaban la migración en el cáncer de mama (Yang, Zhang and Huang, 2009). El silenciamiento de ambas proteínas redujo la migración en células MDA-MB-231 disminuyendo la reposición en la placa de adhesión focal y redujo el potencial metastático en estudios *in vivo*, a través de las pequeñas GPTasas Ras y Rac (Grunicke, 2009). Cuando

sobreexpresaron STIM1 en una línea control epitelial de mama (MCF10A) obtuvieron la respuesta contraria, aumentó la migración y capacidad de invasión (Yang, Zhang and Huang, 2009). Estudios recientes en células de cáncer de mama, y en otras como melanoma o fibroblastos embrionarios de ratón, han puesto de manifiesto la asociación cómplice entre las señales de Ca^{2+} mediadas por SOCE a través de STIM1 y la formación de podosomas en las células malignas, necesarios para la invasión (Y. W. Chen *et al.*, 2017). Otros autores también han visto cómo la ausencia de STIM1, utilizando en su caso un inhibidor para dicha proteína, disminuye la respuesta de SOCE sin alterar la expresión de Orai1. Dicho tratamiento, tanto en células tipo luminal (MCF7) como en TNBC (MDA-MB-231), produjo una considerable reducción en la expresión de integrina $\beta 1$ y en las fosforilaciones de cinasas de adhesión focal (FAK) y ERK1/2, inhibiéndose su migración y manteniéndose intacta la capacidad proliferativa. Este mismo inhibidor no tuvo ningún efecto sobre STIM1 y Orai1 en las células no tumorales de epitelio mamario MCF10A (Gueder *et al.*, 2017).

Anteriormente comentado en apartados previos, el ratio STIM1/STIM2 podría presentarse como un indicador de alta agresividad, potencial metastático y de supervivencia asociado a los tumores de cáncer de mama (McAndrew *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2013). En este sentido, la sobreexpresión de STIM1 sí está presente en las muestras de biopsias y se correlaciona, además, con bajas tasas de supervivencia (Yang *et al.*, 2017), relacionándose con su regulación a través de miR-223 y sugiriendo que la proliferación y metástasis podrían modularse vía STIM1 a través de miR-223, como objetivo biológico en el cáncer de mama (Yang *et al.*, 2018). Estos efectos estarían asociados a la transición epitelio mesénquima (EMT) y a STIM1/STIM2 como responsables de las corrientes de Ca^{2+} (Zhang *et al.*, 2017; Chen, Chen and Shen, 2019). Así, estudios más precisos detallan la asociación entre el eje enzima convertidora de angiotensina 2 / angiotensina (1-7) / Mas (componente importante del microambiente tumoral) con respecto a SOCE y la ruta PAK1/NF- κ B/Snail1, en los procesos de migración y metástasis (Yu *et al.*, 2016), como ya hicieron otros autores poniendo de manifiesto la importancia del aumento de SOCE en la activación del EMT como punto clave para la fase de metástasis en las células de cáncer de mama (Davis *et al.*, 2012). Adicionalmente, tanto STIM1 como Orai1 favorecen la externalización de enolasa-1, su anclaje a la membrana plasmática y remodelación de los componentes de la matriz extracelular, pasos previos para facilitar el proceso de migración celular en el cáncer (Didiasova *et al.*, 2015).

En las células de cáncer de mama MDA-MB-231 y Hs578t, el silenciamiento del uniportador mitocondrial (MCU) impide la acumulación de Ca^{2+} mitocondrial y atenúa SOCE, afectando a la capacidad migratoria de dichas células (Tang *et al.*, 2015; Prudent *et al.*, 2016).

2.3.3.b. Orai.

La proteína Orai1 se encuentra altamente regulada en las diferentes líneas de cáncer de mama, hallándose en los subtipos basales los valores más elevados (McAndrew *et al.*, 2011; Azimi *et al.*, 2019). Son varios los estudios que le otorgan una función notoria sobre la movilidad/migración de las células de cáncer de mama (Hammadi *et al.*, 2012; Malleter *et al.*, 2013; Didiasova *et al.*, 2015). Así, en células TNBC, la hipoxia vía Notch1, capacita a Orai1 y, consecuentemente a SOCE, para activar NFAT4 y modular la migración, invasión y angiogénesis (Liu *et al.*, 2018). Sin embargo, otros estudios muestran leves diferencias en la migración de células MDA-MB-468 de cáncer de mama al utilizar inhibidores farmacológicos específicos para SOCE (Azimi *et al.*, 2018). En este mismo modelo celular, Davis *et al* ya asociaron, en 2012, corrientes espontáneas de Ca^{2+} ligadas a Orai1 con la activación del EMT (Davis *et al.*, 2012). El silenciamiento de Orai1 reduce la migración celular e invasión *in vitro* e impide la metástasis en modelos experimentales *in vivo* (Yang, Zhang and Huang, 2009), atribuyéndose parte de estos efectos a cambios en la placa de adhesión focal. De modo opuesto, cuando sobreexpresaron Orai1 en una línea no tumoral epitelial como la MCF10A, se vio un incremento en la capacidad de migración e invasión (Yang, Zhang and Huang, 2009).

Orai3, independientemente, juega un papel vital tanto en la proliferación como en la invasión de células luminales ER+ MCF7. Estudios llevados a cabo en cámaras de *Boyden* y ensayos de colonias en agar, así como modelos xenográficos del proceso tumoral en ratón, evidenciaron el efecto dependiente de SOCE y Orai3 asociados a los efectores FAK y ERK (Faouzi *et al.*, 2011; Motiani, Zhang, *et al.*, 2013). Ciertamente, la presencia de Orai3 se correlaciona con la expresión del factor de transcripción oncogénico c-Myc, como se ha comentado con anterioridad, relacionándose a su vez con la vía MAPK y el ciclo celular (Faouzi *et al.*, 2013).

En varios modelos de cáncer, Orai1 se ha visto colocalizado con el canal de potasio de baja conductancia SK3, donde opera independientemente de STIM (Chantôme *et al.*, 2013). En la línea de cáncer de mama MDA-MB-435s, este complejo está regulado por AMPc, modulando una entrada de Ca^{2+} y contribuyendo a la migración en este subtipo celular (Clarysse *et al.*, 2014).

2.3.3.c. TRP.

Existen evidencias científicas del papel de TRPC1 y STIM1 como activadores del EMT en células de epitelio mamario de ratón (NMuMG) (Schaar *et al.*, 2016). TRPC1 está sobre-regulado en el cáncer de mama (Mandavilli, Singh and Sahmoun, 2012) y está involucrado en varias funciones específicas de la activación y modulación del EMT en las células de cáncer de mama. En el subtipo celular MDA-MB-468, por ejemplo, TRPC1 es necesario para la expresión del factor inducible por hipoxia 1 α (HIF1 α), proceso necesario para la fosforilación de Akt (Azimi *et al.*,

2017), confirmándose, además, esta misma función en otras líneas de cáncer de mama HER2+ (HCC1569) (Kaemmerer *et al.*, 2018). El silenciamiento de TRPC1 impidió la activación del EMT por estimulación de TGF β , mientras que su sobreexpresión produjo los resultados opuesto en células NMuMG (Schaar *et al.*, 2016). Aunque ya se discutió la necesidad de conocer más en profundidad el papel de TRPC1 en SOCE, no se puede descartar que parte de estos efectos sean atribuidos al vaciamiento previo de los depósitos intracelulares de Ca²⁺ y a la mediación, en mayor o menor medida, del TRPC1 (Kwong *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2011). Lo que sí se conoce es que la inducción del EMT en cáncer de mama es un proceso dependiente de Ca²⁺ (Davis *et al.*, 2014) y que son varios los estudios que asocian el TRPC1 con EMT.

Recientemente, otro miembro de la subfamilia TRPC, TRPC6, se ha encontrado sobreexpresado en la línea luminal MCF7 y la línea triple negativa MDA-MB-231, relacionándose con una función esencial para la activación de SOCE. Los autores muestran como esta simbiosis favorece la proliferación, migración e invasión celular (Jardin, Diez-Bello, *et al.*, 2018). También se ha relacionado a TRPC3 con una vía no dependiente de SOCE, regulada por ácidos grasos poliinsaturados y que favorece la migración en el subtipo celular ER+ MCF7 (Chantôme *et al.*, 2013).

2.3.4. – Angiogénesis en cáncer de mama.

2.3.4.a. Orai.

Liu *et al.*, en 2018, demostraron en células de cáncer de mama triple negativas MDA-MB-231 y MT549 la participación de Orai1 en la angiogénesis. Mediante estudios basados en la tubulogénesis (formación de estructuras tubulares en las células epiteliales como cuantificación del proceso de angiogénesis) observaron una disminución significativa en la formación de túbulos cuando se silenció la expresión de Orai1, atribuyendo la cualidad pro-angiogénica a la entrada SOCE mediada por Orai1 (Liu *et al.*, 2018).

Aunque no se ha investigado en profundidad cómo estos canales Orai1, mediadores de SOCE, pueden interactuar con otras estructuras para influir en la angiogénesis en cáncer de mama, el TRPV4 podría ser un buen candidato. Tal es así, que se encuentra muy expresado en células endoteliales derivadas de cáncer de mama y tiene un papel relevante en la migración (Fiorio Pla *et al.*, 2012). Además, su activación mejora la vascularización del tumor y podría aumentar la acumulación de potenciales quimioterápicos en el proceso tumoral (Adapala *et al.*, 2016).

2.3.5. – Apoptosis en cáncer de mama.

2.3.5.a. STIM.

El femindol, derivado sintético del indol, disminuye la expresión de STIM1 en las células triple negativas de cáncer de mama MDA-MB-231 produciendo una disminución de SOCE. Chakraborty *et al.*, presentaron este compuesto como un potente inductor de apoptosis en estas células que actúa por estrés reticular e inhibe marcadamente el crecimiento celular (Chakraborty *et al.*, 2016).

2.3.5.b. Orai.

Tanto Orai1 como Orai3 poseen efectos antiapoptóticos en las líneas de cáncer de mama ER+ MCF7 y T47D en condiciones de cultivo con matriz de colágeno (Badaoui *et al.*, 2018; Peretti *et al.*, 2019). Ya se ha discutido en apartados anteriores cómo la mediación de SOCE en las líneas ER+ se lleva a cabo mayoritariamente por Orai3 (Motiani, Abdullaev and Trebak, 2010), pero en estas líneas celulares el colágeno presente en el medio puede favorecer la expresión y translocación de Orai1 a la membrana para facilitar la entrada de Ca²⁺ desde el exterior y las fosforilaciones de ERK1/2 para inducir efectos antiapoptóticos. El silenciamiento de Orai1 puede revertir potencialmente el efecto del colágeno y, consecuentemente, las propiedades antiapoptóticas en las líneas ER+ MCF7 y T47D (Badaoui *et al.*, 2018).

Orai3 protege ambas líneas ER+ (MCF7 y T47D) de la apoptosis pero no lo hace en las epiteliales no tumorales de mama (MCF10A). El silenciamiento de esta proteína induce un mayor número de células apoptóticas correlacionadas con el ratio Bax/Bcl-2 (Faouzi *et al.*, 2011) y una parada del ciclo celular, que no ocurre en la línea control (MCF10A). La continuidad del ciclo celular dependiente de Orai3 se ha asociado al pro-oncogen c-myc en los tejido tumorales y en las células MCF7 a través de la ruta de señalización MAP cinasas (Faouzi *et al.*, 2013). En el subtipo celular T47D, además, la sobreexpresión de Orai3 se ha relacionado con un efecto antiapoptótico y de resistencia frente a inductores de muerte celular, como son la TG, estaurosporina, cisplatino, fluoracilo y paclitaxel (Hasna *et al.*, 2018). El mismo grupo de investigación asociaría poco después estas propiedades a la vía de p53, ya que este factor tuvo menor expresión en aquellos modelos sobre-expresados con Orai3 en comparación con sus controles sin sobre-expresión (Hasna *et al.*, 2018).

2.3.5.c. TRP.

Los canales TRP también parecen estar relacionados con los procesos de autofagia celular. En el subtipo TNBC MDA-MB-468, TRPC1 interviene en la expresión del factor inducible por hipoxia 1 α (HIF1 α), necesario para la fosforilación de Akt. Su silenciamiento suprime a LC3BII, marcador de autofagia celular inducido por hipoxia en esta línea celular (Azimi *et al.*, 2017).

2.3.6. – Farmacorresistencia en cáncer de mama.

Estímulos continuos con TG vaciarían de manera permanente los depósitos intracelulares de Ca^{2+} . Esta acción supondría una acumulación de proteínas mal plegadas por falta de actuación de la chaperona dependiente de Ca^{2+} y, por consiguiente, una activación de la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) asociada al estrés reticular (Osowski and Urano, 2011). Esta ruta UPR se ha investigado ampliamente en cáncer de mama como mecanismo de resistencia a distintos fármacos (Wang *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2015). Una vez activado SOCE se puede sobre-expresar la glucoproteína-P presente en la membrana plasmática transportando diversas moléculas hacia el exterior celular. Este mecanismo también ha sido estudiado en cáncer de mama (Callaghan, Luk and Bebawy, 2014; Babaer *et al.*, 2018). El Synta66 es un potente bloqueante selectivo de SOCE (Siaw *et al.*, 2008) capaz de impedir en la línea tumoral TNBC MDA-MB-468 la migración y proliferación en respuesta a EGF (Azimi *et al.*, 2018). Más recientemente, el carboxiamidotriazol, bloqueante de los canales de Ca^{2+} , entre ellos SOCE, se ha utilizado en varios tratamientos de tumores de cáncer de mama en fases de investigación avanzada (Xie *et al.*, 2016; Lodola *et al.*, 2017). Los canales Orai pueden estar involucrados en la resistencia a fármacos en el cáncer de mama. Así, Hansa *et al.*, a través de análisis inferenciales informatizados y experimentos laboratoriales, encontraron una asociación entre Orai3 y quimiorresistencia ligada a p53 (Hasna *et al.*, 2018). Y el silenciamiento de TRPC1 en células MDA-MB-468 bloquea la unión a la bomba exportadora ABCC3 mediada por EGF, promotora de resistencia a fármacos (Stewart *et al.*, 2015).

Otro enfoque completamente diferente en la farmacorresistencia es el que implica la evasión de la respuesta inmune. Los tumores desarrollan diferentes mecanismos y propiedades para impedir la infiltración de las células del sistema inmune en su microambiente (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011; Rabinovich, Gabrilovich and Sotomayor, 2007). Las señalizaciones de Ca^{2+} están directamente relacionadas con las respuestas inmunes y la deficiencia en SOCE (como alteraciones mutágenas presentes en los miembros de STIM y Orai) se ha asociado con defectos funcionales en varias células del sistema inmune como macrófagos, mastocitos, células dendríticas, neutrófilos, linfocitos B y T, células NK, causando, incluso, inmunodeficiencias en los pacientes (Feske *et al.*, 2006; Feske, 2009; Lacruz and Feske, 2015). El binomio STIM1/Orai1 y su regulación en SOCE participa en muchas funciones de los linfocitos T como la proliferación (Schwarz *et al.*, 2007), formación de la sinapsis immune (Lioudyno *et al.*, 2008) o procesos de exocitosis (Maul-Pavivic *et al.*, 2011). Más específicamente, los integrantes de la familia STIM (STIM1 y STIM2) y su papel en la función de los linfocitos T han sido estudiados en modelos *in vivo* de ratón por varios autores (Oh-hora *et al.*, 2008; Weidinger, Shaw and Feske, 2013). Otros, por su parte, defienden que la mediación de SOCE a través de Orai1 puede suprimir algunas vías del sistema inmune, células T CD8+ citotóxicas y NK (Bergmeier *et al.*, 2013) aunque una parte

de ellos, abogarían por un equilibrio entre el silenciamiento de Orai1 y la mayor eficiencia de los linfocitos T citotóxicos, como defienden Zhou *et al.*, (Zhou *et al.*, 2018).

Objetivos

3. OBJETIVOS.

1. Determinar el papel del receptor $\sigma 2$ /TMEM97 en SOCE, en la proliferación y migración de cáncer de mama triple negativo mediante el empleo del NO1 (ligando del receptor $\sigma 2$ /TMEM97).
2. Estudiar el papel del PGRMC1 en el efecto antiproliferativo de la progesterona en células de cáncer de mama.
3. Analizar el papel de los canales ARC en la proliferación de la línea de cáncer de mama triple negativo, MDA-MB-231.

3. OBJECTIVES.

1. To determine the role of σ_2R /TMEM97 in SOCE, proliferation and migration in triple negative breast cancer cells through the use of NO1 (σ_2 /TMEM97 receptor ligand).
2. To ascertain the role of PGRMC1 in the antiproliferative effect of progesterone in breast cancer cells.
3. To analyse the role of ARC channel in triple negative MDA-MB-231 breast cancer cell proliferation.

MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

Para la realización de los diferentes protocolos experimentales, los reactivos utilizados han sido ordenados alfabéticamente a continuación:

4.1. REACTIVOS.

1,4-ditiotreitol (DTT) ThermoFisher Scientific (Madrid, España).

1-Ciclohexil-4-[3-(1,2,3,4-tetrahidro-5-metoxi-1-naphtalenil) propil] piperazina dihidroclorida. (PB28) Agonista σ 2R. Tocris Bio-technie Brand (Madrid, España).

2-{6-[2-(3-(6,7-dimetoxi-3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)propil)-3,4-dihidroisoquinolin-1(2H)-one-5-iloxi] hexil}-5-(dimetilamino)indoline-1,3-dione. (NO1) Ligando σ 2R. Cedido por la Dr. C Abate (Universidad de Bari “Aldo Moro”; Bari, Italia).

2-Aminoetil-Difenilborinato (2-APB). Modulador intracelular de la liberación de Ca^{2+} inducida por IP_3 . Sigma-Aldrich (Madrid, España).

5,8,11,14-Ácido eicosatetraenoico (ETYA). Inhibidor no específico de ciclooxigenasas y lipooxigenasas. Sigma-Aldrich (Madrid, España).

Ácido araquidónico (AA). Abcam plc (Cambridge, UK).

Ácido bicinconínico (BCA). ThermoFisher Scientific (Madrid, España).

Ácido tetracético etilenglicol (EGTA). Sigma-Aldrich (Madrid, España).

Albúmina de suero bovino (BSA). Sigma-Aldrich (Madrid, España).

Bromodeoxiuridina (BrdU). BioVision Inc (Milpitas, EEUU).

Calceína acetoximetil éster (calceína-AM). Live/Dead Kit de viabilidad/citotoxicidad celular. Molecular Probes (Leiden, Holanda).

Cloruro cálcico ($CaCl_2$). ThermoFisher Scientific (Madrid, España).

DharmaFECT. Medio de transfección Cultek SL (Madrid, España).

Dimetil sulfóxido (DMSO). Sigma-Aldrich (Madrid, España).

Fura-2 acetoximetil éster (fura-2/AM). Fluoróforo. Molecular Probes (Leiden, Holanda).

Inhibidores de proteasas libres de EDTA. Roche (Madrid, España).

Kit apoptosis con BrdU. Abcam plc (Cambridge, UK).

Kit de evaluación de la proliferación celular con BrdU. BioVision Inc (Milpitas, EEUU).

Marcador de peso molecular. Bio Rad Laboratories Inc (Madrid, España).

MitoTracker Rojo CMXRos. Colorante fluorescente. Molecular Probes (Leiden, Holanda).

Nonidet P-40. Sigma-Aldrich (Madrid, España).

Penicilina/Estreptomocina. Antibióticos de amplio espectro. Lonza (Cologne, Alemania).

Progesterona (P₄). Hormona esteroidea. Sigma-Aldrich (Madrid, España).

Proteína agarosa A. Upstate Biotechnology Inc (Madrid, España).

Suero de caballo (HS). ThermoFisher Scientific (Madrid, España).

Suero fetal bovino (FBS). ThermoFisher Scientific (Madrid, España).

Sustrato fluorigénico de la caspasa-3. Sigma-Aldrich (Madrid, España).

Sustrato fluorigénico de la caspasa-8. Sigma-Aldrich (Madrid, España).

Sustrato fluorigénico de la caspasa-9. Sigma-Aldrich (Madrid, España).

Tapsigargina (TG). Ácido octanoico derivado de azuleno [4,5-b] furano. Inhibidor de la bomba de Ca²⁺ intracelular. Sigma-Aldrich (Madrid, España).

Tripsina 5% EDTA 10X. ThermoFisher Scientific (Madrid, España).

Tropanil(±)2-(4-clorophenoxi) butanoato maleato. (SM21 Maleato) Modulador colinérgico presináptico - ligando σ₂R. Tocris Bio-technie Brand (Madrid, España).

Tween-20. Sigma-Aldrich (Madrid, España).

Yoduro de propidio (PI). Colorante rojo nuclear y cromosomal fluorescente. Molecular Probes (Leiden, Holanda).

4.2. TAMPONES Y SOLUCIONES.

◆ Tampón Hepes Salino (HBS).

<i>REACTIVOS</i>	<i>CONCENTRACIÓN FINAL</i>	
HEPES	10 mM	Para los experimentos añadimos: - 1.8 mg/mL Glucosa. - 1 mg/mL BSA. pH = 7.4
NaCl	145 mM	
KCl	5 mM	
MgSO ₄	1 mM	
H ₂ O miliQ	-	

Tabla 7. Tampón Hepes Salino (HBS).

◆ Tampón Fosfato Salino (PBS).

<i>REACTIVOS</i>	<i>CONCENTRACIÓN FINAL</i>	
NaCl	137 mM	pH = 7.4
KCl	2.7 mM	
Na ₂ HPO ₄	5.62 mM	
NaH ₂ PO ₄	1.09 mM	
KH ₂ PO ₄	1.47 mM	
H ₂ O miliQ	-	

Tabla 8. Tampón Fosfato Salino (PBS).

◆ Tampón de lisis NP-40.

<i>REACTIVOS</i>	<i>CONCENTRACIÓN FINAL</i>	
Tris –trisaminometano- (HOCH ₂) ₃ CNH ₂ (Trizma base)	20 mM	Ajustar el pH antes de añadir el Glicerol. pH = 7.4
NaCl	137 mM	
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	2 mM	
Octilfenoxipolietoxietanol (IGEPAL CA-630)	1%	
Glicerol	10%	
H ₂ O miliQ	-	

Tabla 9. Tampón de lisis NP-40.

◆ Tampón de radioinmunoprecipitación (RIPA).

<i>REACTIVOS</i>	<i>CONCENTRACIÓN FINAL</i>	
Tris –trisaminometano- (HOCH ₂) ₃ CNH ₂ (Trizma base)	10 mM	pH = 7.4
NaCl	158 mM	
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	1 mM	
Deoxicolato sódico	1%	
Dodecil sulfato sódico (SDS)	0.1%	
Triton X-100	1%	
H ₂ O miliQ	-	

Tabla 10. Tampón de radioinmunoprecipitación (RIPA).

◆ Tampón de Laemmli.

<i>REACTIVOS</i>	<i>CONCENTRACIÓN FINAL</i>	
Tris –trisaminometano- (HOCH ₂) ₃ CNH ₂ (Trizma base)	70 mM	Disolver el Trizma base y ajustar el pH antes de añadir el resto de reactivos. pH = 7.4
Glicerol	10%	
Azul de bromofenol	0.002%	
Dodecil sulfato sódico (SDS)	2%	
H ₂ O miliQ	-	

Tabla 11. Tampón de Laemmli.

◆ Tampón Tris Salino con Tween (TBST).

<i>REACTIVOS</i>	<i>CONCENTRACIÓN FINAL</i>	
Tris –trisaminometano- (HOCH ₂) ₃ CNH ₂ (Trizma base)	20 mM	pH = 7.6
NaCl	0.137 M	
Tween 20	0.1%	
H ₂ O miliQ	-	

Tabla 12. Tampón Tris Salino con Tween (TBST).

◆ Geles de acrilamida/bisacrilamida (I).

<i>SOLUCIONES</i>	<i>REACTIVOS</i>	<i>CONCENTRACIÓN FINAL</i>	
Solución A	Acrilamida/ bisacrilamida	40%	-
Solución B	Tris –trisaminometano- (HOCH ₂) ₃ CNH ₂ (Trizma base)	1.5 M	pH = 8.8
Solución C	Dodecil sulfato sódico (SDS)	10%	-
Solución D	Tris –trisaminometano- (HOCH ₂) ₃ CNH ₂ (Trizma base)	0.5 M	pH = 6.8

Tabla 13. Geles de acrilamida/bisacrilamida (I).

◆ Geles de acrilamida/bisacrilamida (II).

<i>REACTIVOS</i>	<i>GEL 4%</i>	<i>GEL 8%</i>	<i>GEL 10%</i>	<i>GEL 12%</i>	<i>GEL 15%</i>
Solución A	1 mL	2.02 mL	2.50 mL	3 mL	3.75 mL
Solución B	-	2.50 mL	2.50 mL	2.50 mL	2.50 mL
Solución C	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Solución D	2.50 mL	-	-	-	-
Amonio persulfato (AMPS)	10 mg	5 mg	5 mg	5 mg	5 mg
H ₂ O miliQ	6.40 mL	5.38 mL	4.90 mL	4.40 mL	3.65 mL
(N,N,N',N'- tetrametil etilendiamina (TEMED)	10 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL

Tabla 14. Geles de acrilamida/bisacrilamida (II).

◆ Tampón de electroforesis.

<i>REACTIVOS</i>	<i>CONCENTRACIÓN FINAL</i>
Tris –trisaminometano- (HOCH ₂) ₃ CNH ₂ (Trizma base)	24.8 mM
Dodecil sulfato sódico (SDS)	0.1%
Glicina	252 mM
H ₂ O miliQ	-

Tabla 15. Tampón de electroforesis.

◆ Tampón de transferencia.

<i>REACTIVOS</i>	<i>CONCENTRACIÓN FINAL</i>	
Tris –trisaminometano- (HOCH ₂) ₃ CNH ₂ (Trizma base)	25 mM	Ajustar el pH antes de añadir MeOH: pH = 8.3
Glicina	150 mM	
Metanol (MeOH)	20%	
H ₂ O miliQ	-	

Tabla 16. Tampón de transferencia.

◆ Solución de bloqueo.

<i>REACTIVOS</i>	<i>CONCENTRACIÓN FINAL</i>
Albúmina de suero bovino (BSA)	10%
Azida sódica	0.02%
TBST	-

Tabla 17. Solución de bloqueo.

◆ Reactivos del kit de proliferación.

<i>REACTIVOS</i>	<i>CONCENTRACIÓN EXPERIMENTAL</i>
BrdU(5-bromo-2-deoxiuridina) 1000X	10X
Solución de Fijación/Desnaturalización	100 µL
Anticuerpo primario de detección de BrdU 300X	1X
Anticuerpo secundario de detección de anticuerpo primario 200X	1X
Solución diluyente del anticuerpo	-
Tampón de lavado 10X	1X
Sustrato tetrametilbencidina (TMB)	100 µL
Solución de parada de reacción	100 µL

Tabla 18. Reactivos del kit de proliferación BrdU.

El resto de materiales y reactivos utilizados han sido suministrados por Panreac Química SLU (Barcelona, España), Sanex SL (Badajoz, España) y Sigma-Aldrich (Madrid, España).

4.3. PLÁSMIDOS.

Plásmido control (shARN A). Santa Cruz Biotechnology Inc (Dallas, EEUU).
Plásmido de silenciamiento Orai1 (shOrai1). Cedido por el Dr. Zhang (Centro de Ciencias Cardiovasculares de la Universidad Médica de Albany. Albany, EEUU).
Plásmido de silenciamiento TRPC1 (shTRPC1). Cedido por el Dr. Woodard (Departamento de Cirugía de la Universidad de Ciencias de la Salud. Bethesda, EEUU).
Plásmido de sobreexpresión STIM1. Cedido por el Dr. Romanin (Universidad Johannes Kepler. Linz, Austria).
Plásmido de sobreexpresión TMEM97. Origene Inc (Maryland, EEUU).
Plásmido de sobreexpresión YFP-NFAT1-reporter. Cedido por el Dr. Romanin (Universidad Johannes Kepler; Linz; Austria).

4.4. ARN DE INTERFERENCIA.

ARN de interferencia para PGRMC1 (siPGRMC1). Santa Cruz Biotechnology Inc (Dallas, EEUU).
ARN de interferencia para STIM1 (esiARN STIM1). Invitrogen ThermoFisher Scientific (Madrid, España).
ARN de interferencia para STIM2 (esiARN STIM2). Invitrogen ThermoFisher Scientific (Madrid, España).
ARN de interferencia para TMEM97 (siARN TMEM97). Santa Cruz Biotechnology Inc (Dallas, EEUU).

4.5. ANTICUERPOS.

<i>ANTICUERPOS PRIMARIOS</i>
Anti-caspasa-9. Anticuerpo monoclonal de ratón. Cell signalling (Leiden, Holanda).
Anti-Fosfo-eIF2 α . Anticuerpo policlonal de conejo. Cell signalling (Leiden, Holanda).
Anti-LC3. Anticuerpo policlonal de conejo. Cell signaling (Leiden, Holanda).
Anti-Orai1. Anticuerpo policlonal de conejo. Sigma-Aldrich (Madrid, España).
Anti-Orai3. Anticuerpo monoclonal de ratón. Sigma-Aldrich (Madrid, España).
Anti-p53. Anticuerpo monoclonal de ratón. Sigma-Aldrich (Madrid, España).
Anti-PGRMC1. Anticuerpo monoclonal de ratón. Santa Cruz Biotechnology Inc (Dallas, EEUU).
Anti-STIM1. Anticuerpo monoclonal de ratón. BD-bioscience (Madrid, España).
Anti-STIM2. Anticuerpo policlonal de conejo. Cell signalling (Leiden, Holanda).
Anti-STIM2. Anticuerpo policlonal de conejo. Molecular Probes (Leiden; Holanda).
Anti-TMEM97. Anticuerpo policlonal de conejo. Origene Inc (Maryland, EEUU).
Anti- β -actina. Anticuerpo policlonal de conejo. Sigma-Aldrich (Madrid, España).

<i>ANTICUERPOS SECUNDARIOS</i>
Anti- Cy3 TM AffiniPure anti-IgG de conejo de cabra. Jackson Immunoresearch Europe Ltd (Cambridge, UK).
Anti-IgG de conejo conjugada con peroxidasa de rábano. Jackson Immunoresearch Europe Ltd (Cambridge, UK).
Anti-IgG de ratón conjugada con peroxidasa de rábano. Jackson Immunoresearch Europe Ltd (Cambridge, UK).

4.6. CULTIVO CELULAR.

◆ MCF10A.

La línea celular epitelial no tumorigénica MCF10A se obtuvo de la compañía ATCC (Manassas; EEUU) (*figura 26*). Se trata de una línea no tumoral con capacidad de crecimiento tridimensional en colágeno. Microscópicamente muestra características de células ductales luminales pero no de células mioepiteliales. La presencia de calcio en el medio ejerce un fuerte efecto sobre su morfología. Esta línea fue immortalizada a partir de una donante mujer caucásica de 31 años. Se mantiene en incubador bajo condiciones estables (37 °C, 95% de humedad y 5% de CO₂) y crecen en medio DMEM F-12 suplementado con los siguientes componentes para obtener las condiciones más óptimas: suero de caballo 5% (v/v), toxina colérica (1 ng/mL), insulina humana (10 μ g/mL), factor de crecimiento epidérmico (EGF) (10 ng/mL), hidrocortisona (0.5 μ g/mL), penicilina 100 U/mL y estreptomycin 100 μ g/mL. Algunas de sus características más importantes quedan recogidas en la “*Tabla 19. Resumen de las características principales de la línea celular no tumoral (MCF10A) y las tumorales de mama (MCF7, MDA-MB-231; MDA-MB-468)*”.

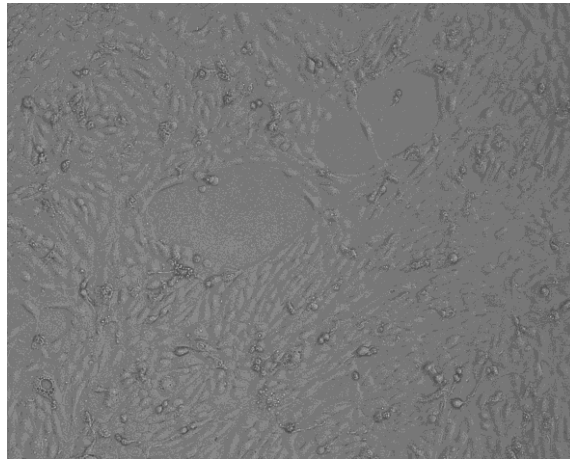


Figura 26. Adquisición por microscopía (40×) de células MCF10A en subcultivo. Imagen tomada por Invitrogen™ EVOS™ FL Auto 2 Imaging System.

◆ MCF7.

Línea celular obtenida por la compañía ATCC (Manassas, EEUU) (figura 27) y cultivadas en condiciones controladas en incubador (37 °C, 95% de humedad y 5% de CO₂). Procedente de una donante femenina, caucásica de 69 años. Los números de cromosomas de la línea madre oscilaron entre hipertriploidía e hipotetraploidía. Es una línea epitelial adherente que precisa de medio de cultivo DMEM, suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin para su crecimiento óptimo. Parte de sus propiedades quedan recogidas en la “Tabla 19. Resumen de las características principales de la línea celular no tumoral (MCF10A) y tumorales (MCF7, MDA-MB-231; MDA-MB-468) de mama”.

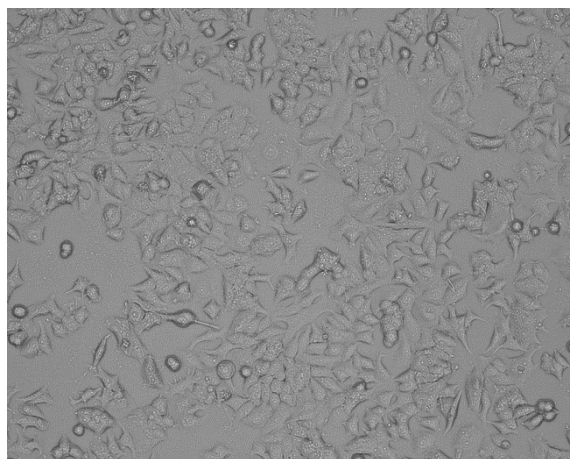


Figura 27. Adquisición por microscopía (40×) de células MCF7 en subcultivo. Imagen tomada por Invitrogen™ EVOS™ FL Auto 2 Imaging System.

◆ **MDA-MB-231.**

Esta línea tumoral se obtuvo de la compañía ATCC (Manassas; EEUU) (*figura 28*), procedente de una donante femenina caucásica de 51 años. La línea celular es aneuploide femenina con recuento cromosómico próximo al rango triploide. Se trata de células epiteliales adherentes cultivadas en incubador a 37 °C, 95% de humedad y 5% de CO₂. Utilizan DMEM como medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino al 10% (v/v), penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100 µg/mL). Parte de sus características bioquímicas quedan recogidas en la tabla resumen “*Tabla 19. Resumen de las características principales de la línea celular no tumoral (MCF10A) y tumorales (MCF7, MDA-MB-231; MDA-MB-468) de mama*”.

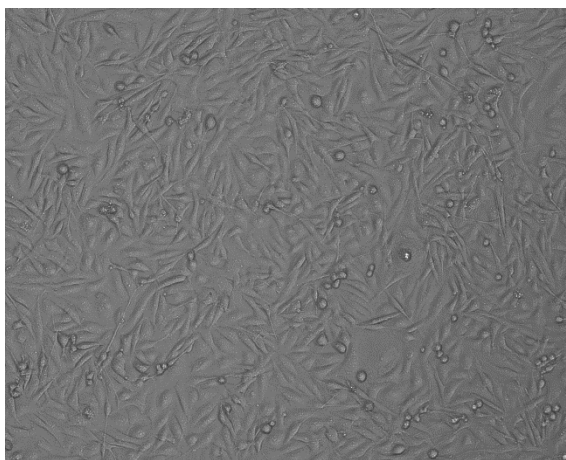


Figura 28. Adquisición por microscopía (40×) de células MDA-MB-231 en subcultivo. Imagen tomada por Invitrogen™ EVOS™ FL Auto 2 Imaging System.

◆ **MDA-MB-468.**

Línea adquirida a través de ATCC (Manassas; EEUU) (*figura 29*). Tiene su origen en una donante mujer, de raza negra, de 51 años de edad. Se trata de una línea celular aneuploide con parte de sus cromosomas en el rango triploide. Son células adherentes de epitelio mamario mantenidas en incubador a 37 °C, 95% de humedad y 5% de CO₂. Utilizan DMEM como medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino al 10% (v/v), 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin. Algunas de propiedades bioquímicas y características de importancia quedan recogidas en la “*Tabla 19. Resumen de las características principales de la línea celular no tumoral (MCF10A) y tumorales (MCF7, MDA-MB-231; MDA-MB-468) de mama*”.

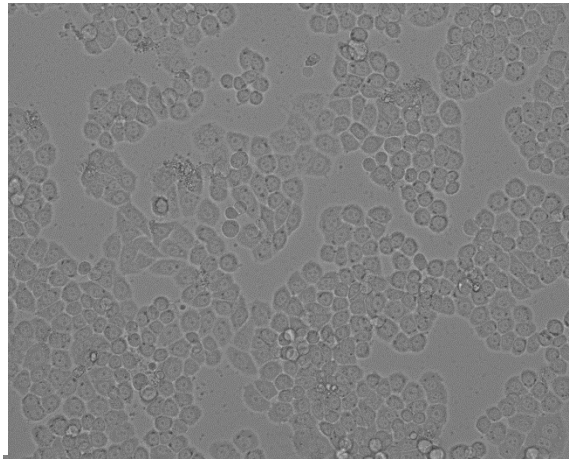


Figura 29. Adquisición por microscopía (40×) de células MDA-MB-468 en subcultivo. Imagen tomada por Invitrogen™ EVOS™ FL Auto 2 Imaging System.

LÍNEA CELULAR	MCF10A	MCF7	MDA-MB-231	MDA-MB-468
DIANAS TERAPÉUTICAS	La línea responde a insulina, glucocorticoides, enterotoxina del cólera y factor de crecimiento epidérmico (EGF).	Presenta receptor de estrógenos y de progesterona. Tiene elevado/amplificado el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2).	Receptor estrogénico negativo, receptor de la progesterona negativo y receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 poco expresado/amplificado.	Receptor estrogénico negativo, receptor de la progesterona negativo y receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 poco expresado/amplificado.
MORFOLOGÍA	De apariencia poliédrica con núcleo en posición central. Tamaño aproximado de 10-20 µm.	Con forma poligonal y concéntrica sin grandes anillos. Núcleo central. Tamaño aproximado de 10-20 µm.	Apariencia alargada y longitudinal. Presenta un solo núcleo en posición central y tamaño aproximado de 10-20 µm.	Apariencia concéntrica y poliédrica con núcleo central localizado en el interior. Tamaño aproximado de 10-20 µm.
PATOLOGÍA	Enfermedad fibroquística del seno mamario.	Adenocarcinoma mamario	Adenocarcinoma mamario.	Adenocarcinoma mamario.
TEJIDO	Glandula mamaria, tejido mamario.	Tejido glandular mamario. Derivado de metástasis a partir de efusión pleural.	Tejido glandular mamario. Derivado de metástasis a partir de efusión pleural.	Tejido glandular mamario. Derivado de metástasis a partir de efusión pleural.
SUBTIPO MOLECULAR	NORMALES.	LUMINAL B.	BASALES. Cáncer de mama triple negativo (TNBC).	BASALES. Cáncer de mama triple negativo (TNBC).
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	No capacidad tumorigénica.	Moderadamente agresiva, invasiva y diferenciada.	Altamente agresiva, invasiva y pobremente diferenciada.	Altamente agresiva, invasiva y pobremente diferenciada.

Tabla 19. Resumen de las características principales de la línea celular no tumoral (MCF10A) y tumorales (MCF7, MDA-MB-231; MDA-MB-468) de mama.

◆ NG115-401L.

Línea de especial interés científico ya que se trata de una línea somática compuesta por la hibridación de la línea clonal de neuroblastoma de ratón N115TG-2 y la línea clonal de glioma de rata C6BV-1. Estas células aparecieron en 1981 (Hatanaka and Amano, 1981) y tienen la peculiaridad de producir gran cantidad del material sustancia-P pero, además, se caracterizan por expresar unos valores mínimos de STIM1. Se tratan de células adherentes de crecimiento lento y morfología glial, sin cariotipo ni receptores específicos con fenotipo cancerígeno. Crecen bajo condiciones controladas a 37 °C, 95% de humedad y 5% de CO₂. Además, utilizan DMEM como medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino al 10% (v/v), 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina.

4.7. TRANSFECCIÓN CELULAR.

Con la transfección celular podemos incorporar eficientemente material genético externo como siARN o plásmidos vectoriales a células eucariotas. Gracias a esta técnica, la biología molecular puede avanzar enormemente en la búsqueda de nuevas herramientas basadas en la falta o presencia de ciertas proteínas celulares. Para ello, en nuestro laboratorio disponemos del agente de transfección DharmaFECT Cultek SL (Madrid, España), altamente eficaz y con una toxicidad mínima para la célula. Todas las transfecciones se llevaron a cabo con el agente de transfección DharmaFECT, siguiendo las recomendaciones de la compañía.

Los plásmidos de sobreexpresión y los de silenciamiento utilizados fueron transfectados cuando las poblaciones celulares se encontraban en subcultivo con una confluencia del 70-80%. Dependiendo de las condiciones experimentales realizadas, del material genético seleccionado y/o de la línea celular (MCF10A, MCF7, MDA-MB-231, NG115-401L), se utilizaron 1-4 µg de siARN durante 24-72 horas. Todas las condiciones experimentales se compararon con su control “vector vacío” y/o siARN-A (dirigido contra un ARN mensajero no codificante).

4.8. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR ([Ca²⁺]_c) MEDIANTE MÉTODOS FLUORIMÉTRICOS.

4.8.1. – Indicadores de calcio codificados genéticamente (GECI).

Los indicadores de calcio codificados genéticamente (GECI) son proteínas fluorescentes derivadas de una proteína fluorescente en verde (GFP), o variantes fluorescentes, fusionadas con un dominio calmodulina capaz de unirse a Ca²⁺.

El constructo G-GECO1-Orai3 utilizado en el presente trabajo fue proporcionado amablemente por el Dr. M. Cahalan (Addgene plasmid # 73563 ; <http://n2t.net/addgene:73563>; RRID:Addgene_73563) (Dynes, Amcheslavsky and Cahalan, 2016). Metodológicamente, el indicador G-GECO1-Orai3, una vez presente en la célula, revela una entrada de Ca^{2+} a través del constructo STIM1-Orai1-Orai3 cuando se fusionan para conformar el canal ARC (Thompson, Mignen and Shuttleworth, 2010). Así, la fluorescencia emitida queda registrada al paso del ion Ca^{2+} a través del canal ARC. Esta fluorescencia es el resultado de los cambios generados en la proteína modificada en verde (GFP) siendo excitada a una longitud de onda 488 nm y recogida su emisión a 505 nm, utilizando un microscopio invertido de fluorescencia con un objetivo 40× en aceite de inmersión. Los ratios de fluorescencia obtenidos se presentaron como F_n / F_0 , donde F_n indica el valor de fluorescencia a 488 nm y F_0 es la media del valor basal obtenido para las proteínas modificadas en verde (GFP) excitadas a 488 nm.

4.8.2. – Sonda Fura-2.

La sonda fura-2 es un indicador fluorescente selectivo de alta afinidad al Ca^{2+} . El éster de fura-2 (fura-2/AM) es permeable a la membrana plasmática gracias al grupo acetoximetiléster (AM) presente en su estructura. Una vez internalizado en la célula, las esterasas citosólicas liberan el grupo éster (AM) del fura-2 (Pozzan *et al.*, 1982), proceso conocido como *cleaving*, perdiendo su capacidad hidrofóbica (*figura 30*).

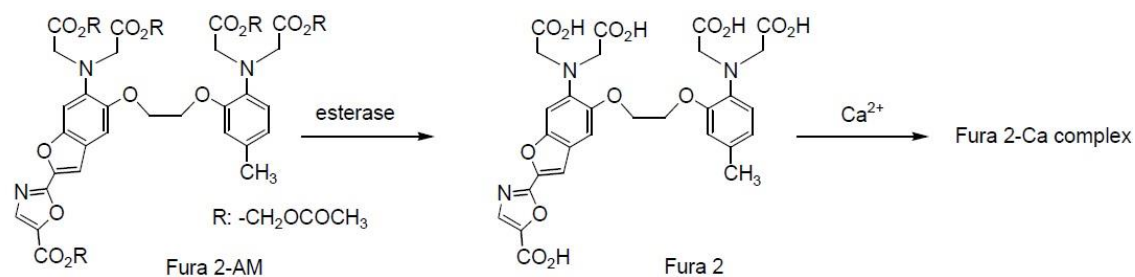


Figura 30. Molécula de Fura-2/AM antes y después del *cleaving*.

Este fluoróforo fue utilizado por primera vez en 1985 por Roger Tsien *et al.* (Grynkiewicz, Poenie and Tsien, 1985) siendo, desde entonces, ampliamente empleado como marcador ratiométrico del calcio intracelular. Una vez unido a este ion, muestra un amplio espectro de excitación oscilando entre 300 y 400 nm, con una emisión de 505-510 nm. Específicamente, cuando el fura-2 unido al calcio citosólico $[\text{Ca}^{2+}]_c$ es excitado a 340 nm, la emisión del fluoróforo a 510 nm aumenta y, contrariamente, dicha emisión disminuye cuando se excita a 380 nm. Este hecho nos valida la utilización de esta sonda como un marcador ratiométrico al observar emisiones máximas y mínimas a 510 nm (ratio 340 nm/380 nm). Esta relación siempre es proporcional a las variaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ hasta concentraciones del orden nM. Permite, así, una mayor monitorización y desprecia errores achacados a falta de homogeneidad en la distribución citosólica, carga

insuficiente de la sonda o posibles artefactos derivados de la manipulación experimental (Paredes *et al.*, 2008). Aunque presenta una elevada afinidad por otros iones como Mn^{2+} , Sr^{2+} o Zn^{2+} , se une preferentemente al ion Ca^{2+} con una $K_d \sim 135$ nM a 20 °C (pH 7.1 -7.2) y ~ 224 nM a 37 °C (pH 7.8) (Sage, 1996). Otra ventaja de este fluoróforo es que su punto isosbético (punto de iso fluorescencia) es a 360 nm. Esto facilita la monitorización de cambios en la fluorescencia no dependiente de Ca^{2+} o el apagamiento de fluorescencia asociado a la unión de metales pesados como el manganeso (Mn^{2+}) (Sage *et al.*, 1989).

4.8.2.a. Carga celular con Fura-2.

La incubación de las líneas epitelial mamaria y de cáncer de mama utilizadas (MCF10A, MCF7, MDA-MB-231 y MDA-MB-468) con fura-2/AM se realizó en el propio medio de cultivo a una concentración de 2 μ M durante 30 min, en condiciones de oscuridad y manteniendo una temperatura constante de 37 °C. A las células se les retiró el medio de cultivo una vez expirado dicho periodo. A continuación, el excedente de fura-2/AM se eliminó con un prelavado a base de tampón HEPES salino (HBS) para evitar interferencias durante el registro. Las células, previamente adheridas a un cubreobjetos, se mantuvieron en un medio HBS suplementado con glucosa (1.8 mg/mL), BSA (1 mg/mL) y cloruro de calcio (50 μ M) hasta el momento de la medición de Ca^{2+} .

4.8.2.b. Determinación de cambios en $[Ca^{2+}]_c$ mediante métodos fluorimétricos.

Los cambios en la concentración de Ca^{2+} detectados en las células adherentes de epitelio y cáncer mamario se registraron gracias a un microscopio de fluorescencia invertido Nikon Eclipse Ti2 asociado a un sistema de adquisición y análisis de imágenes para microscopía. Las poblaciones celulares se excitaron con un espectrofotómetro (lámpara asociada a un monocromador) a longitudes de ondas alternantes de 340 nm y 380 nm, recogiendo la fluorescencia emitida a 510 nm con una cámara asociada al equipo de microscopía óptica para la sonda fura-2. Las mediciones se obtuvieron y procesadas usando el software Nikon NIS-Elements AR.

Las células previamente adheridas a un cubreobjetos se acoplaron a una cubeta de cuarzo y mantenidas en un volumen final de 500 μ L de HBS. Todos y cada uno de los reactivos utilizados en la presente tesis (EGTA, TG, AA, P₄, SM21, NO1, 2-APB, CaCl₂), se añadieron directamente sobre las células hasta lograr la concentración deseada.

Los ratios de fluorescencia obtenidos para la sonda fura-2 (340 nm/380 nm) se calcularon en cada pixel y los datos presentados como F_n/F_0 ; donde F_n representa el ratio de fluorescencia (340 nm/380 nm) experimentalmente obtenido y F_0 es la media del valor ratiométrico basal del fura-2 (340 nm/380 nm).

No obstante, en las células donde se puede calibrar la fluorescencia de la sonda fura-2, se podría calcular la concentración de Ca^{2+} intracelular por el método desarrollado por Roger Tsien *et al.*, en 1985. Esto es:

$$[\text{Ca}^{2+}]_c = K_d \times ((R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)) \times (S_{f2} / S_{b2})$$

K_d = constante de disociación del fura-2 para el Ca^{2+} (224 nM a pH 7.05 y 37 °C).

R = valor de fluorescencia ratiométrico muestral (ratio 340/ 380 nm).

R_{\min} = valor de fluorescencia ratiométrico mínimo registrado.

R_{\max} = valor de fluorescencia ratiométrico máximo registrado.

S_{f2} = fluorescencia emitida por el fura-2 libre de Ca^{2+} cuando es excitado a 380 nm.

S_{b2} = fluorescencia emitida por el fura-2 unido a Ca^{2+} cuando es excitado a 380 nm.

Así, los valores de liberación y entrada de calcio se obtuvieron mediante el cálculo de su integral. Para ello:

- La liberación de Ca^{2+} inducida por TG (1 μM), inhibidor de SERCA, se obtuvo como el área bajo la curva resultante del incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ tras la adición de dicho estímulo durante los 120 segundos sucesivos. Previo a la estimulación con TG, las células se expusieron al quelante de calcio extracelular EGTA (100 μM) durante 30 segundos. Este cálculo fue el patrón base seguido con el resto de agonistas fisiológicos y/o agentes farmacológicos utilizados en la plétera experimental.

- La entrada de Ca^{2+} inducida tras el vaciamiento de los depósitos intracelulares se calculó como el resultado del área total bajo la curva del incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ durante los 120 segundos siguientes a la adición de 1 mM de CaCl_2 .

4.9. DETECCIÓN DE COLOCALIZACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL.

La localización exacta de dos moléculas en el interior celular es de suma importancia desde el punto de vista científico. Una técnica que se aproxima a esta idea y da una medida aproximada de la distancia entre dos sustancias es la colocalización. Los estudios de colocalización se basan en secciones ópticas captadas por microscopios de confocalidad, en los que dos puntos coinciden

en un mismo pixel dentro del mismo plano (Manders, Verbeek and Aten, 1993; Demandolx and Davoust, 1997).

Para una parte de nuestros experimentos, se tomaron de subcultivo células MDA-MB-231 y sembradas sobre cubreobjetos en placas de cultivo de 6 pocillos. Tras la espera del tiempo necesario obtuvimos una concentración adecuada. A continuación, se retiró el exceso de medio con lavados sucesivos de PBS 1X e inmediatamente después se incubaron las células con 100 nM de NO1 (5 min) en ausencia o conjuntamente con 2 μ M de mitotracker-rojo (2 min). Además, las células se estimularon durante 2 minutos con TG (2 μ M) o bien, permanecieron sin estimular. Una vez se internalizaron los compuestos, se lavó con PBS 1X dos veces más, eliminando el excedente para ser observadas con un microscopio confocal de fluorescencia Nikon Eclipse TE300 (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) usando las longitudes de ondas correspondientes al NO1 (Ex/ Em = 390 nm/ 505 nm) y al mitotracker-rojo (Ex/ Em = 581 nm/ 644 nm). Las fluorescencias se recogieron en el plano celular medio, a un mismo tiempo de exposición en cada condición experimental y con un objetivo de inmersión 40 \times . Las imágenes resultantes se adquirieron con el software de imagen NIS.

Por otro lado, para dirimir la aproximación entre Orai1 y σ 2R/TMEM97, las células MDA-MB-231 se sembraron en placas de cultivo de 6 pocillos hasta una concentración de 0.5×10^6 células/mL. El día del experimento, el medio de cultivo DMEM se retiró y fue, posteriormente, remplazado por una solución HBS 1X (75 μ M de EGTA). Seguidamente, las células se incubaron durante 5 minutos con 100 nM de NO1. Transcurrido el tiempo, se estimularon (o permanecieron sin estimular) durante 1 minuto con 2 μ M de TG. A continuación, se sometieron durante 30 minutos a un proceso de fijación a temperatura ambiente con paraformaldehído al 4%. Se les retiró el medio sobrante con solución PBS y se permeabilizaron con PBS+TritonX100 (0.1%) durante 30 minutos. Una vez fijadas y permeabilizadas, previamente bloqueadas para evitar uniones inespecíficas con una solución de bloqueo (PBS + TritónX100 suplementado con 5% de BSA), se incubaron con el anticuerpo anti-Orai1 (dilución 1:200) 1 hora a temperatura ambiente. Retirado el exceso de anticuerpo con tres lavados consecutivos de PBS, reincubamos las muestras esta vez con el anticuerpo secundario fluorescente Cy3TM AffiniPure anti-IgG de conejo, de cabra, (dilución 1:50). Los cubreobjetos con las células se lavaron una última vez con PBS para montarse en portaobjetos usando una solución basada en glicerol (PBS + glicerol 80%). Una vez preparadas las muestras, se observaron bajo un objetivo de inmersión 40 \times de microscopio confocal de fluorescencia. Las células se estimularon con las longitudes de onda adecuadas para NO1 (Ex/ Em = 380 nm/ 505 nm) y Cy3 (512 nm/ 615 nm). El índice de colocalización se calculó en todas las muestras usando el software NIH libre de tratamiento de imagen Image J.

4.10. VISUALIZACIÓN DE LA TRANSLOCACIÓN DE NFAT1 AL NÚCLEO.

Las células en subcultivo MDA-MB-231 se sembraron sobre cubreobjetos en placas de cultivo de 6 pocillos hasta obtener una confluencia adecuada para ser transfectadas. Una vez internalizado el material genético exógeno durante 48 h, plásmido de sobreexpresión YFP-NFAT1-reporter *per se* o bien junto con el plásmido shPGRMC1, se confirmó su presencia gracias a la visualización de la fluorescencia YFP proveniente del plásmido NFAT-reporter de las células controles en cultivo. A partir de este momento, ambas poblaciones se estimularon durante 48 h con P₄ (1 μM) o permanecieron en reposo. Además, forzamos en otra población la sobreexpresión de NFAT1-reporter con la estimulación continuada durante 24 h de TG 1 μM (control positivo del experimento). La estimulación continua de TG en el interior celular provoca el vaciamiento del retículo endoplasmático y la entrada de Ca²⁺ mediada por Orai1 (Kar *et al.*, 2014). Este proceso activa la calcineurina fosfatasa que desfosforila serinas presentes en la región reguladora de NFAT (Okamura *et al.*, 2000) y expone una secuencia de localización nuclear. Como consecuencia, NFAT se transloca al núcleo donde interacciona con secuencias de ADN específicas para regular la actividad de sus genes diana. Cuando disminuye la concentración de iones Ca²⁺ en el citosol, la estimulación inicial desaparece y NFAT es exportado de vuelta al citoplasma (Hogan *et al.*, 2003; Macian, 2005).

La fluorescencia emitida por el NFAT1-reporter se captó con microscopio invertido de fluorescencia a las 24 h y 48 h del inicio de la estimulación con P₄. El análisis posterior de todos los datos fue normalizado comparando la fluorescencia del reporter-NFAT1 emitida por las células controles en crecimiento bajo condiciones normales respecto al resto de condiciones experimentales.

4.11. MÉTODO DE FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR.

Este método de fraccionamiento celular nos permite rápida y eficientemente aislar el núcleo de otros subcompartimentos celulares. Todo ello, manteniendo una alta integridad proteica y minimizando, en la mayor medida lo posible, la degradación, modificación y/o difusión soluble proteica fuera del núcleo. La acción sumatoria de una solución detergente junto a fuerzas mecánicas de separación hizo posible mantener las membranas nucleares intactas. Este procedimiento fue descrito en la universidad de Calgary en 2015 por Nabbi and Riabowol (Nabbi and Riabowol, 2015) y ha sido adaptado a nuestras condiciones celulares y experimentales.

Así, las células MDA-MB-231 provenientes de subcultivo o transformadas genéticamente (shPGRMC1) se traspasaron a placas de Petri hasta alcanzar una confluencia óptima del 90%. El día del aislamiento, el medio de cultivo se extrajo y las células se lavaron con una solución PBS

1X refrigerada (4 °C). Al retirar el medio de lavado, la placa se mantuvo a 4 °C para, en 1 mL de PBS, recolectar con la ayuda de un rascador las células adherentes. Se traspasó, entonces, a un microtubo eppendorf de centrifugación de 1.5 mL para una centrifugación rápida (5-10 segundos y 9391×g). Inmediatamente después, se eliminó el sobrenadante y el resto del pellet celular existente (~100-200 µL) se resuspendió en 900 µL de una solución PBS 1X refrigerada (4 °C) al 0.1% de NP40, suplementado con inhibidores de proteasas y fosfoesterasas. La mezcla resultante se hizo pasar a través de una micropunta de pipeta P1000 cinco veces seguidas. En este punto, 300 µL se transfirieron a un nuevo microtubo de centrifugación al cual añadimos 100 µL de la solución de desnaturalización Laemmli 4X. Esta primera fracción denominada fracción Total de Proteínas (TP) se mantuvo en hielo hasta el siguiente paso y se estima que representa ~ 25% de la proteína total de la muestra celular de partida (Nabbi and Riabowol, 2015).

La mezcla sobrante de células en suspensión (700-800 µL) se volvió a centrifugar durante 5-10 segundos a 9391×g. A continuación, retiramos el sobrenadante de la muestras y añadimos 1 mL de PBS al 0.1% de NP40. Se mezcló bien la muestra y se centrifugó de nuevo bajo las mismas condiciones (5-10 segundos, 9391×g). Al eliminar el sobrenadante, obtuvimos un pellet que resuspendimos en 150 µL de la solución Laemmli 1X (fracción Nuclear). Esta fracción contiene aproximadamente el 75% de la muestra de proteínas nucleares totales. En este momento, ambas fracciones (TP y Nuclear) se sonicaron (20 kHz, 2 pulsos, 8 segundos) y sometidas a tratamiento térmico para garantizar la lisis total de las proteínas (95 °C y 1 minuto). Una vez obtenidas las muestras deseadas, con la técnica Western blot o Inmunoblot se analizó el factor de transcripción p53 en diferentes localizaciones celulares.

4.12. TÉCNICA DE EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.

4.12.1. – Lisis celular y extracción de proteínas.

Las muestras celulares se sometieron a un procesamiento dual mecánico-químico de extracción proteica. Así, las células *in vitro* obtenidas de subcultivo fueron debidamente tripsinizadas y centrifugadas, según las especificaciones de cada línea celular, hasta obtener un pellet final. Dependiendo del número total de células de partida, este pellet se mezcló con un volumen variable (200-500 µL) de solución de lisis RIPA. Esta solución capaz de solubilizar proteínas es ampliamente utilizada en investigación (Perkel-Jeffrey, 2015). En nuestro caso, está suplementada con inhibidores de proteasas e inhibidores de fosfoesterasas para garantizar que la integridad proteica se mantenga lo más estable posible. Tras permanecer 20 minutos en hielo a 4 °C, se llevó a cabo una sonicación de las muestras (20 kHz, 2 pulsos, 8 segundos) para de nuevo

dejar reposar otros 30 minutos en hielo 4 °C. Una vez concluido el proceso de lisis, sucesivas centrifugaciones lograron separar las diferentes fracciones subcelulares de la muestra inicial para obtener los restos de las membranas en el pellet final y las proteínas solubles en el sobrenadante (MacPhee, 2010; Jensen, 2012). En todos los experimentos presentados, las muestras se centrifugaron en condiciones de temperatura controlada (4 °C) durante 30 minutos a 16000×g, aislando las proteínas de interés en el sobrenadante y preparadas para ser utilizadas en los pasos venideros.

4.12.2. – Cuantificación de la concentración de proteínas totales.

Todas las muestras biológicas utilizadas en este estudio se cuantificaron mediante el kit comercial Pierce™ BCA Protein Assay de la compañía ThermoFisher Scientific (Madrid, España). Es importante remarcar que cualquier técnica de cuantificación proteica no es totalmente específica para proteínas, es decir, hay factores que pueden influir en la determinación final. Así, artefactos no proteicos, falta de uniformidad de las muestras e incompatibilidades entre proteínas modificadas y no modificadas son algunos de los condicionantes a tener en cuenta en todo proceso experimental (Noble *et al.*, 2007; Brady and Macnaughtan, 2015).

El kit Pierce™ BCA Protein Assay permite la cuantificación de proteínas a partir de un tampón detergente de baja variabilidad basado en el ácido bicinconínico (BCA) compatible con agentes desnaturizantes que permite una detección colorimétrica y posterior cuantificación indirecta de proteínas. En nuestro caso, además, combinamos esta técnica con un método mecánico de separación como es la sonicación de las muestras.

Este kit se basa fundamentalmente en la reacción de biuret, *figura 31*, producto de la combinación de dos procesos: la reducción de Cu^{2+} a Cu^+ en medio alcalino en las proteínas y la alta sensibilidad/especificidad de detección colorimétrica del ion Cu^+ usando como único reactivo la BCA (Smith *et al.*, 1985). Bioquímicamente, la reacción con la BCA es la suma total de la estructura macromolecular, los péptidos unidos y cuatro aminoácidos inmersos en el seno de la matriz proteica (cisteína, cistina, triptófano y tirosina) (Wiechelman, Braun and Fitzpatrick, 1988).

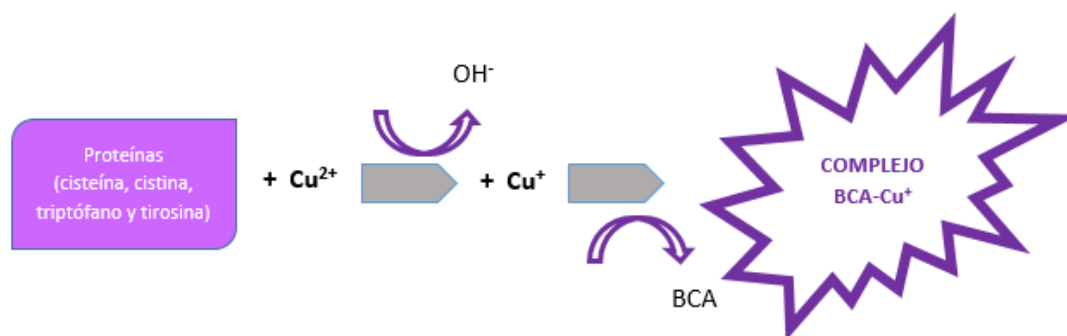


Figura 31. Ilustración esquemática de la reacción de biuret con el ácido bicinconínico (BCA).

Como resultado se obtiene un producto de tinción purpúrea formado por dos moléculas de BCA y un solo ion de Cu^+ . Este complejo, soluble en agua, presenta una absorbancia de 562 nm y una fuerte correlación proporcional a incrementos en la concentración de proteína, teniendo su rango más óptimo entre 0.02 – 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Dicho método utiliza como referencia una curva patrón de concentraciones conocidas y configuradas previamente con estándares a partir de la albúmina de suero bovina (BSA).

Experimentalmente, todas nuestras mediciones se realizaron por triplicado. Para cada una, específicamente, 12.5 μL de la solución desconocida se mezcló en un pocillo de una placa de 96 pocillos con 100 μL del mix de reacción (20 partes del reactivo A + 1 parte del reactivo B). Una vez transcurridos 30 minutos a 37°C y protegido de la luz, se realizó la lectura de la absorbancia a 562 nm de la muestra en un lector de microplacas Gen5™ BioTek (Vermont, EEUU). Los valores resultantes fueron traspuestos en la curva patrón y expresados en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

4.12.3. – Inmunoprecipitación.

Las células en subcultivo se resuspendieron en un microtubo eppendorf de 1.5 mL con un volumen final de 500 μL de HBS 1X suplementado con glucosa (1.8 mg/ mL), BSA (1 mg/ mL) y cloruro de calcio (50 μM). Todos los experimentos, independientemente de la línea celular utilizada, partieron de una concentración total de células de 6×10^6 células/ mL. Según el protocolo asignado a cada ocasión, las células se estimularon en un termobloque a 37 °C con EGTA, TG, AA, P₄, SM21, NO1 y/o CaCl_2 . Inmediatamente después de ser estimuladas, se añadieron 500 μL de RIPA 2X suplementados con ortovanadato sódico (Na_3VO_4) (2 mM) e inhibidores de proteasas (cocktail comercial de Roche, Madrid, España). Dichos tubos de centrifugación se depositaron en hielo hasta alcanzar una temperatura de 4°C durante 20-30 minutos para evitar la proteólisis y/o la acción de fosfoesterasas. Transcurrido el tiempo, las muestras se sonicaron (20 kHz, 2 pulsos, 8 segundos) y nuevamente permanecieron incubadas en hielo otros 20-30 minutos. A continuación, se sometieron a una centrifugación a 16000×g, 4 °C y 30 minutos, para recoger el sobrenadante (1000 μL) exento de restos celulares y traspararlo a un nuevo microtubo de centrifugación de 1.5 mL, al cual se añadieron 25 μL de esferas de proteína A-agarosa y 2-4 μL

del anticuerpo requerido según protocolo. Todos los microtubos de centrifugación se incubaron a 4 °C durante toda la noche con movimiento orbital suave y constante.

A la mañana siguiente, tras tres lavados con PBS 1X combinados con centrifugaciones sucesivas de 1 min a 4 °C y 10000×g, las esferas de agarosa sedimentadas se resuspendieron en la solución Laemmli 1X suplementada con β-mercaptoetanol al 5% y ditioneitol (DTT) al 5%. Para facilitar la total desnaturalización proteica, la solución final se sometió a un choque térmico bajo las siguientes condiciones: 5 minutos a 95 °C. Por último, las muestras son boteadas y centrifugadas suavemente antes de ser cargadas en geles de Western Blotting.

4.12.4. – Western Blotting.

Gracias al Western blot o Immunoblot podemos detectar anticuerpos específicos en una muestra determinada. Fue una técnica desarrollada por George Stark *et al.*, en 1979, en la Universidad de Stanford. Brevemente explicado, las proteínas se separan en gel mediante electroforesis atendiendo a diferentes criterios (peso molecular, estructura, afinidad, naturaleza hidrofóbica, etc) para después ser transferidas a una membrana de nitrocelulosa o de polidivinilo de fluoruro (PVDF) y ser seleccionadas por afinidad con anticuerpos específicos hacia el epítipo de la proteína deseada (Renart, Reiser and Stark, 1979; Towbin, Staehelin and Gordon, 1979). El principio que rige esta técnica radica en la naturaleza de las partículas, ya que poseen una carga eléctrica variable según el pH del medio en el que se encuentren. Como consecuencia, se desplazan al entrar en una corriente eléctrica pudiéndose separar en función de su masa molecular.

En nuestro compendio experimental, el total de proteínas lisadas en la solución RIPA se mezcló con un volumen igual de la solución Laemmli hasta conseguir una concentración proteica final de 1 µg/µL. La solución Laemmli sigue hoy día la misma dinámica que la desarrollada en 1970 por sus creadores (Laemmli, 1970). Entre sus componentes, puede presentar agentes desnaturalizantes y reductores disociadores de los puentes disulfuro, tales como el β-mercaptoetanol o DTT, y detergentes iónicos con alta capacidad desnaturalizante como el sodio-dodecil-sulfato (SDS). Consecuentemente, esto resulta en la pérdida de toda estructura tridimensional de las proteínas, manteniendo su conformación primaria y lineal recubierta por cargas negativas, lo que permite la separación óptima en la electroforesis cuando son expuestas a un campo eléctrico. Nuestras muestras se sometieron, adicionalmente, a un tratamiento térmico de 95 °C durante 5 minutos para garantizar una mayor desnaturalización.

A continuación, se cargaron en un sistema de tampón discontinuo en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) a una concentración variable de poliacrilamida en el gel separador “*running gel*” según el tamaño de las proteínas de interés. Las intensidades de corriente utilizadas durante la electroforesis fueron las siguientes: “*Tabla 20. Intensidades de corriente de la electroforesis*”.

1 Gel	25 mA
2 Geles	50 mA

Tabla 20. Intensidades de corriente de la electroforesis.

Tras 120 minutos de electroforesis en cubeta (Hoefer, Inc), las proteínas se transfirieron desde el gel hasta un sándwich de membranas de nitrocelulosa. En este caso, se utilizó un sistema en cubeta de transferencia semi-seca con tampón metanol (20%), ejerciendo una intensidad de corriente eléctrica fijada a 0.8 mA/ cm². Todas las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa de tamaño de poro 0,45 μm (GE Healthcare) transcurrido un tiempo total de 2 horas. A continuación, las membranas se bloquearon con una solución de bloqueo (TBST 1X + 10% BSA) 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave, o bien, durante toda la noche a 4 °C.

Tras el bloqueo de las membranas, éstas se incubaron con sus respectivos anticuerpos (ver 4.5. ANTICUERPOS) a la concentración y tiempo indicado según las especificaciones. Una vez se produjo la unión del anticuerpo con el epítipo de la proteína problema, seis lavados con TBST 1X a intervalos de 5 minutos se llevaron a cabo con el fin de eliminar el excedente de anticuerpo primario. Seguidamente, las membranas se volvieron a incubar con sus respectivos anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) de Jackson ImmunoResearch (Cambridge, UK) durante 1 hora a concentración 1:10000. Nuevamente, el excedente se retiró con los lavados sucesivos.

Para el revelado final de las membranas, un escáner digital de quimioluminiscencia (Li-Cor® C-DiGit™) fue el encargado de la obtención de bandas gracias a la reacción con el conjugado de la peroxidasa de rábano. Las imágenes resultantes se trataron y analizadas con el software informático Image J NIH (Bethesda, EEUU).

4.13. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD Y APOPTOSIS CELULAR.

Son varios los parámetros a tener en cuenta a la hora de definir la viabilidad celular en un protocolo experimental *in vitro*. El potencial rédox de la población, la integridad de sus membranas o la actividad esterasa celular pueden ser utilizados como estándares aceptables en el ensayo experimental. En cualquier caso, obtenemos una perspectiva de la condición celular en relación a su viabilidad, citotoxicidad y/o eficacia farmacológica tras la integración de sus componentes.

La ciencia actual nos proporciona varios indicadores lumínicos de la viabilidad celular especialmente diseñados para proporcionar una lectura visual veraz de la integridad celular a través de microscopía de fluorescencia y/o citometría de flujo, entre otros.

El tinte fluorescente calceína es un reactivo celular utilizado habitualmente como marcador de invasión y migración en cáncer, neoformación vascular y otros ensayos celulares. Suele presentarse unido a un grupo acetoximetiléster en forma de calceína-AM. Este grupo inactiva su fluorescencia y le permite atravesar fácilmente las membranas. Ya en su interior, las esterasas intracelulares se encargan de hidrolizar este grupo convirtiéndola en calceína con fluorescencia en verde.

El yoduro de propidio, por su parte, es un tinte del ADN en las células eucariotas que únicamente penetra las membranas si éstas están dañadas y/o alteradas. Este compuesto se intercala inespecíficamente en las bases del ADN. Nos permite así, recoger información del estado de la integridad celular a tiempo real (Lecoeur, 2002).

Por último, la bromodeoxiuridina es utilizada como análogo pirimidínico en la síntesis *de novo* de ADN, nos permite tener un control de la viabilidad y del estado óptimo de las células (ver 4.15. DETERMINACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR).

4.13.1. – Microscopía.

Gracias al kit Live/Dead de viabilidad/citotoxicidad se puede discernir fácilmente entre las células eucariotas vivas y muertas. Presenta una tinción simultánea entre calceína-AM (fluorescencia en verde) y yoduro de propidio (fluorescencia en rojo), de baja citotoxicidad y altamente estable en el interior celular.

Siguiendo las indicaciones del protocolo adaptadas a nuestros ensayos experimentales, las células utilizadas en la presente tesis (MCF10A, MCF7 y MDA-MB-231) se cultivaron en sus respectivos medios de cultivo. A partir de los cuales, se traspasaron a placas de cultivo de 6 pocillos hasta obtener una monocapa adherente y confluyente (~95%) bajo condiciones controladas (37 °C y 5% de CO₂). De manera independiente a la adición de los compuestos a testar, en el momento del experimento se incubaron en cada pocillo 2 µM de calceína-AM durante 45 minutos y 4 µM de yoduro de propidio durante 30 minutos. A continuación, se lavaron las cubetas individualmente con HBS 1X y se incorporaron 2 mL de HBS 1X previamente atemperado. Las muestras se excitaron a una longitud de onda de 430 nm (calceína) y 555 nm (yoduro de propidio), recogiendo la fluorescencia verde de la calceína a 542 nm y roja del yoduro de propidio a 624 nm usando, para ello, una cámara digital CMOS (Zyla 4.2, Andor, Belfast, UK) con objetivo 100× en un microscopio invertido (Nikon Eclipse Ti-2, Amsterdam, Holanda). Los datos se recogieron y tratados con el software NIS-Elements AR (Nikon, Amsterdam, Holanda).

4.13.2. – Fluorimetría.

La activación de la caspasa-9 es uno de los marcadores celulares más clásicos reconocidos como activadores de la apoptosis dependiente de mitocondria. Además de ésta, las caspasas-3 y -8 se monitorizaron a partir de sus respectivos sustratos, gracias a un espectrofotómetro de fluorescencia (Agilent technologies inc. California, EEUU). Adecuando el protocolo previamente descrito por otros colaboradores de este mismo grupo (Bejarano *et al.*, 2009; López *et al.*, 2009), las células se cultivaron hasta conseguir una apropiada confluencia ~95% en placas de Petri. Una vez alcanzado el punto óptimo, cada población celular se incubó en presencia o ausencia de NO1 (100 nM) durante 30 minutos. Previamente se normalizaron para tener grupos comparables según tratamiento. Inmediatamente expirado el tiempo, las células se lavaron con PBS 1X para retirar el medio y reactivos excedentes y, tras ser tripsinizadas, se resuspendieron en la solución NP40 durante 10 minutos para su lisis. Pasado este tiempo se incubaron durante 2 h a 37 °C con 20 µM los respectivos sustratos a testar. Dependiendo de la naturaleza de cada uno de ellos, la fluorescencia emitida por AMC (7-amino-4-metilcumarina) (Ex/ Em = 360 nm/ 400 nm) o AFC (7-amino-4- trifluorometilcumarina) (Ex/ Em = 400 nm/ 505 nm) fue el resultado de la actividad de las diferentes caspasas y, a su vez, fue adquirida por espectrofluorimetría.

4.13.3. – Citometría.

Complementariamente, la apoptosis celular en las células cancerígenas MDA-MB-231 y MCF10A fue testada con el kit comercial basado en 5-bromo-2'- deoxiuridina (BrdU) (TUNEL) de Abcam plc (Cambridge, UK). La apoptosis es un proceso implicado en multitud de patologías, entre ellas el cáncer. Se caracteriza por cambios morfológicos como la falta de asimetría de la membrana plasmática, la descompactación del citoplasma y núcleo, y la fragmentación de la cromatina nuclear.

En los experimentos realizados, se utilizaron como inductores de apoptosis tanto el fármaco antineoplásico cisplatino (50 µM durante 30 min) como el ligando σ 2R/TMEM97 NO1 (100 nM durante 5 min). Este ensayo nos permitió discernir la fragmentación del ADN en apoptosis mediante citometría de flujo en células vivas. Para ello, los pasos a seguir fueron los siguientes. Partimos de células de subcultivos en crecimiento. Una vez alcanzaron una confluencia óptima ~80% fueron expuestas (o no) a los diferentes fármacos con el objetivo de activar la muerte celular. En este punto, las células fueron tripsinizadas y resuspendidas con una concentración de 5×10^6 células/ mL en un volumen final de 0.5 mL de PBS 1X en tubos de centrifugación de 15 mL. Sobre este volumen se añadieron otros 5 mL de paraformaldehído 4% (peso/ volumen) y cada muestra se dejó reposar en hielo (4 °C) 15 minutos. Inmediatamente a continuación, las muestras se centrifugan en refrigeración (4 °C) durante 5 minutos a 300×g para descartar el sobrenadante. Se lavaron un par de veces adicionales con PBS para retirar por completo el

excedente de paraformaldehído. Resuspendimos en 0.5 mL de PBS y añadimos 5 mL de etanol al 70% para dejarlas en hielo durante 30 minutos. Repetimos las centrifugaciones anteriormente mencionadas para retirar, en este caso, el exceso de etanol. A continuación, se resuspendieron 1×10^6 células en 1 mL de la solución de lavado específica del protocolo. Centrifugamos dos veces descartando el sobrenadante e incubamos la muestra durante 60 minutos a 37 °C en 50 μ L de la solución de etiquetado/marcaje del ADN, la cual tiene incorporado una solución de reacción TdT (enzimas TdT y BrdUTP). La cantidad de BrdUTP artificialmente incorporada se detectó con la adición posterior del anticuerpo anti-BrdU-rojo (dilución 1:20) durante 30 minutos. Después, incorporamos la solución A (7-AAD/ARNasa) a temperatura ambiente durante otros 30 minutos en completa oscuridad. Al final, las células se analizaron con un citómetro de flujo FACS-SCAN (Becton Dickinson, Madrid, España). Las fluorescencias emitidas por las células se adquirieron una vez se caracterizó la dispersión lateral y frontal de las máscaras. Los datos se representaron como SSC-altura vs FL2 (BrdU fluorescencia) a partir de las siguientes longitudes de ondas dadas: Ex/ Em = 488 nm/ 576 nm para la BrdU-rojo y Ex/ Em = 488 nm/ 655 nm para 7-AAD. Los resultados se expresaron en porcentaje apoptótico de las células comparando las medianas poblacionales analizadas con el software libre Flowing, disponible de Cell Imaging Core, Turku Centro de Biotecnología, en la Universidad de Turku y Universidad Åbo Akademi (<http://flowingsoftware.btk.fi>).

4.14. DETERMINACIÓN DE LA MIGRACIÓN CELULAR.

La técnica de migración celular seguida en este trabajo fue previamente descrita por Liang *et al.*, en 2007 (Liang, Park and Guan, 2007) y adaptada a nuestras condiciones experimentales. Así, 1×10^5 células/mL de la línea celular MDA-MB-231 se sembraron a partir de subcultivo en placas de cultivo celular de 6 pocillos, hasta alcanzar un volumen total de 2 mL. Una vez logrado un 70 - 80% de confluencia, las células son transfectadas, o no, en función del protocolo y se mantienen creciendo con medio DMEM hasta obtener una monocapa homogénea de células adherentes.

Una vez alcanzada la confluencia necesaria se lleva a cabo el “*scratch*” o herida. Sección longitudinal realizada con una punta de pipeta p10 a 90° con respecto al eje horizontal. Este paso es crucial para el estudio ya que es evaluado continuamente el ancho de la cicatriz; por ello, se recomienda practicar la técnica con antelación para minimizar las variaciones dependientes del ancho inicial de la cicatriz (*figura 32*). Tras iniciar el protocolo, se lavaron las células con PBS 1X para eliminar los restos celulares en suspensión y se añadió medio DMEM al 1% de BSA (menor porcentaje permitido en esta línea celular para minimizar los efectos proliferativos del cultivo sin activar otros no deseados como la apoptosis y/o falta de adhesión celular). Según los experimentos asignados a cada lote, cada cubeta fue expuesta a la presencia de: NO1 (100 nM),

SM21 (100 nM), AA (8 μ M), ETYA (100 μ M) y/o quedaron sin reactivos. De la misma manera, tomamos como tiempo = 0 h las imágenes tomadas justo después de realizar la cicatriz. A partir de dicho momento, se tomaron a distintos tiempos fijados según protocolo hasta obtener al menos cuatro repeticiones por experimento. Todas las imágenes se adquirieron con objetivo de microscopía 10 \times con cámara de visión Visicam. Se analizaron con el software Visicam 3.0 s (VWR®, Madrid, España).

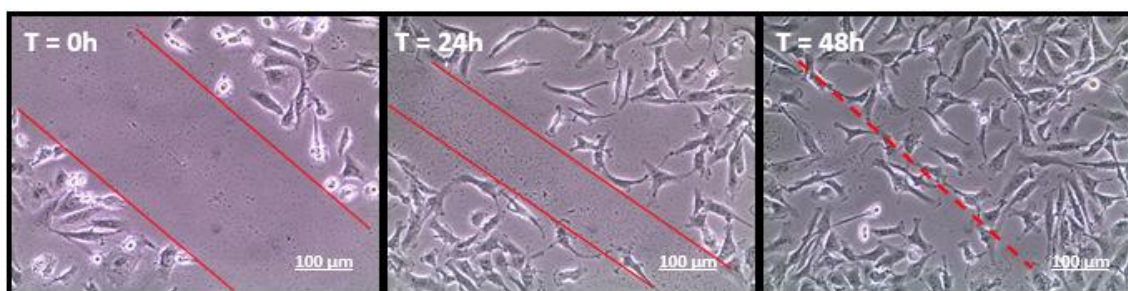


Figura 32. Secuenciación temporal del avance celular de la línea MDA-MB-231. Ensayo de migración.

4.15. DETERMINACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.

La técnica utiliza BrdU (5-bromo-2-deoxiuridina) como análogo sintético pirimidínico. Durante la generación de nuevas cadenas de ADN, la BrdU se incorpora a la doble hélice de ADN en su síntesis *de novo* en lugar de la timina. Este hecho unido a la unión de un anticuerpo específico con sustrato de peroxidasa de rábano, nos permite cuantificar indirectamente el crecimiento celular sometido a diferentes condiciones. Se conforma así, la secuencia de pasos a seguir en el ensayo de proliferación celular del kit de BrdU (BioVision Inc, Milpitas, CA, EEUU) (figura 33).

Para nuestro estudio, las líneas celulares utilizadas fueron las siguientes: shPGRMC1 MDA-MB-231, siSTIM2 MDA-MB-231, MDA-MB-231 y MDA-MB-468. En todos los casos, 5×10^3 células se sembraron en 100 μ L de medio DMEM respectivamente en cada uno de los pocillos de una placa de cultivo de 96 pocillos y dejadas en reposo en incubador a 37 $^{\circ}$ C y 5% de CO₂. Una vez adheridas, las células son tratadas, según lote experimental, con los diferentes componentes a testar: NO1 (100 nM), P₄ (1 μ M), PB28 (1 nM) y/o SM21 (100 nM). A partir de este momento, se toman las mediciones a 0, 24, 48 y 72 h. Para ello, el día del experimento se incubaron con BrdU durante 2 horas a 37 $^{\circ}$ C y 5% de CO₂. Inmediatamente después, se reemplazó el medio de cultivo por 100 μ L de la solución de Unión/Desnaturalización durante 30 minutos a temperatura ambiente. Expirado el tiempo, se retiró la solución anteriormente mencionada con suma precaución para añadir 100 μ L del anticuerpo de detección de BrdU 1X, incubándose 1 hora con agitación suave. Con el siguiente paso, eliminamos el excedente de primario gracias al lavado de los pocillos con la solución de lavado 1X (300 μ L, 2 veces) y volvimos a incubar, esta vez con

100 μL de la solución de anticuerpo unido a anti-ratón-HRP durante 1 hora a temperatura ambiente. Nuevos lavados fueron necesarios para retirar el excedente de secundario con la solución de lavado 1X (300 μL , 3 veces). Para terminar, retiramos el exceso de líquido para añadir 100 μL de la solución sustrato TMB con el que se tomaron medidas cada 5 minutos a 650 nm hasta 30 minutos. El 3,3',5, 5'-tetrametil-bencidina o TMB es el sustrato de unión al anticuerpo secundario, encargado de llevar a cabo una reacción colorimétrica azul oscuro e insoluble en presencia de peroxidasa que nos sirve como control interno de la curva de saturación de la reacción. Esta reacción queda recogida gracias al lector de placas Microplate Data Collection & Analysis software Gen5™ v20.9 -Epoch, Biotek® (Swindon; UK). Finalmente, la reacción se detiene al incorporar 100 μL de la solución de parada o STOP, cuya absorbancia será recogida en una única medida a 450 nm.

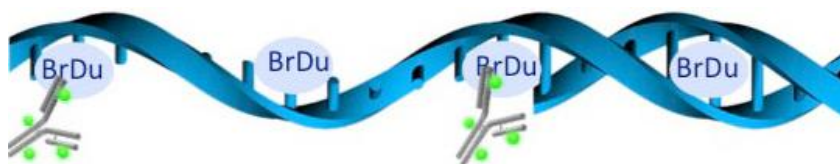


Figura 33. Ilustración de la unión anticuerpo-BrdU en el ADN.

4.16. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

En el análisis estadístico de los datos del presente estudio se evaluaron inicialmente la normalidad mediante el test de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de las varianzas mediante el test de Levene. Después de comprobar la normalidad de los parámetros, se procedió al análisis inferencial de las variables estudiadas. Así, para comparar las medias entre dos grupos se aplicó la prueba t de Student mientras que mediante un análisis de la varianza (ANOVA de una vía) se compararon las medias de los parámetros estudiados para más de dos grupos utilizando los respectivos análisis Post Hoc para las comparaciones múltiples, especificados en cada artículo. Los datos obtenidos en estos estudios se expresaron como media \pm error estándar de la media (ESM). Todas las diferencias estadísticas presentes se han expresado como significativas con un p -valor $< 0,05$, $< 0,01$ y/o p -valor $< 0,001$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS.

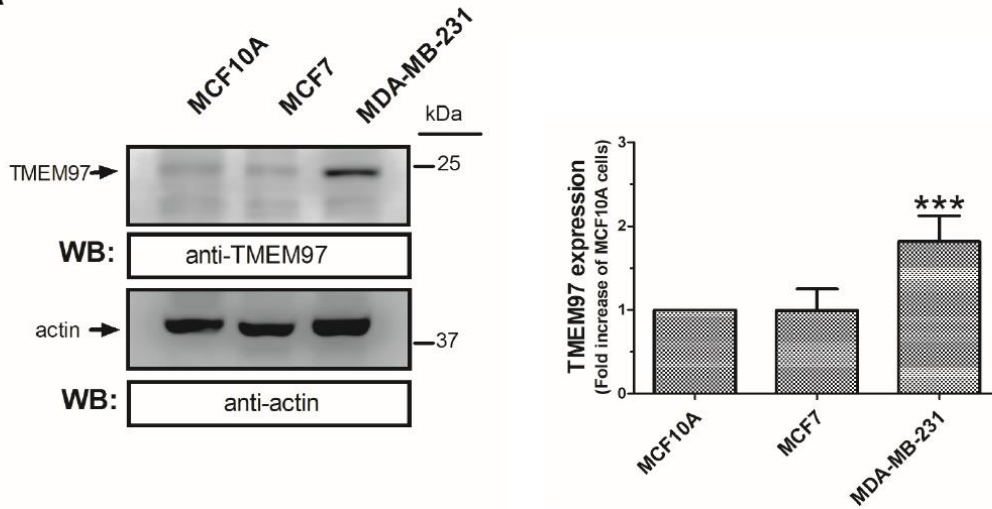
5.1. El NO1, nuevo ligando fluorescente del Sigma2 Receptor/TMEM97, disminuye SOCE y promueve la apoptosis en las líneas celulares de cáncer de mama triple negativas.

5.1.1. – σ 2R/TMEM97 se sobreexpresa en las líneas celulares de cáncer de mama.

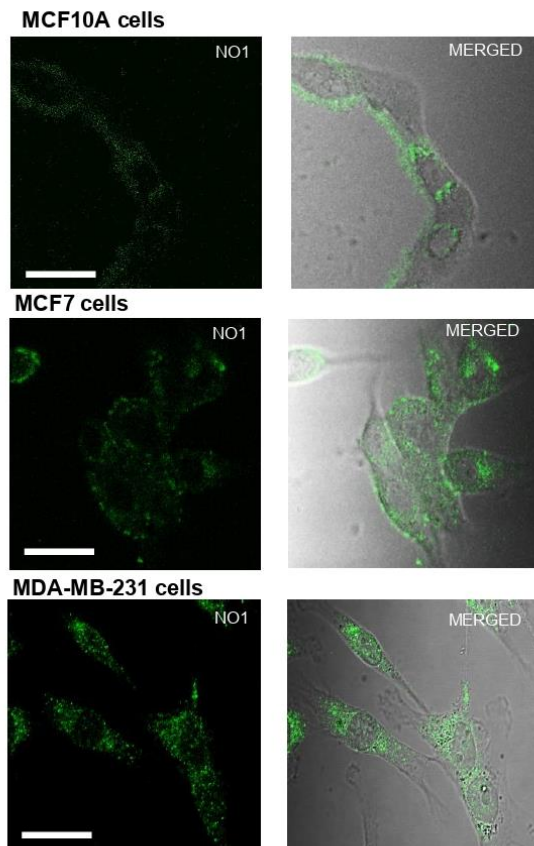
La sobreexpresión de σ 2R/TMEM97 se ha descrito previamente en algunas células procedentes de diferentes tipos de cáncer. Como su estructura proteica ha supuesto una cierta controversia, inicialmente analizamos su expresión mediante técnicas de WB a través del anticuerpo específico anti-TMEM97 (ver Figura 5.1a, n=6), obteniéndose un incremento de su expresión en la línea MDA-MB-231 en comparación con las líneas celulares MCF10A y MCF7. Adicionalmente, evaluamos su presencia con el fluoróforo NO1, un nuevo ligando σ 2R/TMEM97 (NO1: (2-{6-[2-(3-(6,7-dimethoxy-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)propyl)-3,4-dihydroisoquinolin-1(2H)-one-5-yloxy]hexyl}-5-(dimethylamino)isoindoline-1,3-dione), el cual ha sido diseñado como ligando fluorescente específico de σ 2R (K_i : 10.2 ± 2.4 nM; mientras K_i para σ 1R está en 5000 nM). Además, las células MCF10A, MCF7 y MDA-MB-231 fueron incubadas con NO1 (100 nM) durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las mismas células se observaron a través de microscopía confocal (ver Figura 5.1b, n=4). Como puede apreciarse en dicha Figura, confirmamos un aumento en la acumulación de la fluorescencia del NO1 derivado de la elevada presencia de σ 2R/TMEM97 en las células MDA-MB-231 si se compara con las células MCF10A. Al analizar este aumento con la ayuda de un espectrofluorímetro, se obtuvo un aumento del $46.6 \pm 10.4\%$ en las células MDA-MB-231 respecto de las MCF10A (Figura 5.1c, n = 5; $p < 0.01$). Adicionalmente, las dos líneas anteriormente mencionadas se expusieron al NO1 (100 nM) a temperatura ambiente, y monitorizamos su captación por el ligando a lo largo de 30 min a través de microscopía de epifluorescencia. Como se evidenciaron en los vídeos obtenidos por el propio grupo (información no presentada), observamos un mayor aumento y captación, así como redistribución en el citosol, de NO1 en la línea celular MDA-MB-231. Esta observación refuerza las imágenes obtenidas por microscopía confocal, en las cuáles fueron utilizados tiempos de incubación del NO1 más cortos. Ciertamente, la incorporación del NO1 en las células MCF10A comenzó a ser más evidente después de un amplio periodo de exposición (en torno a los 20 min). Contrariamente encontrado en las líneas celulares MDA-MB-231, las células MCF10A no mostraron una redistribución clara del NO1 en las diferentes sublocalizaciones intracelulares u organelas, y además, el NO1 permaneció acumulado alrededor de la membrana plasmática a lo largo del experimento. Por todo ello, estos resultados muestran un aumento en la expresión de

σ 2R/TMEM97 en las células cancerígenas estando en concordancia con los descubrimientos previamente obtenidos a través de diferentes enfoques experimentales.

a



b



c

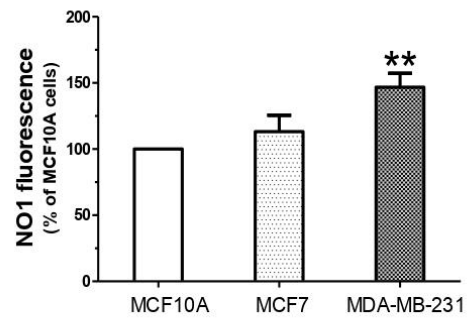
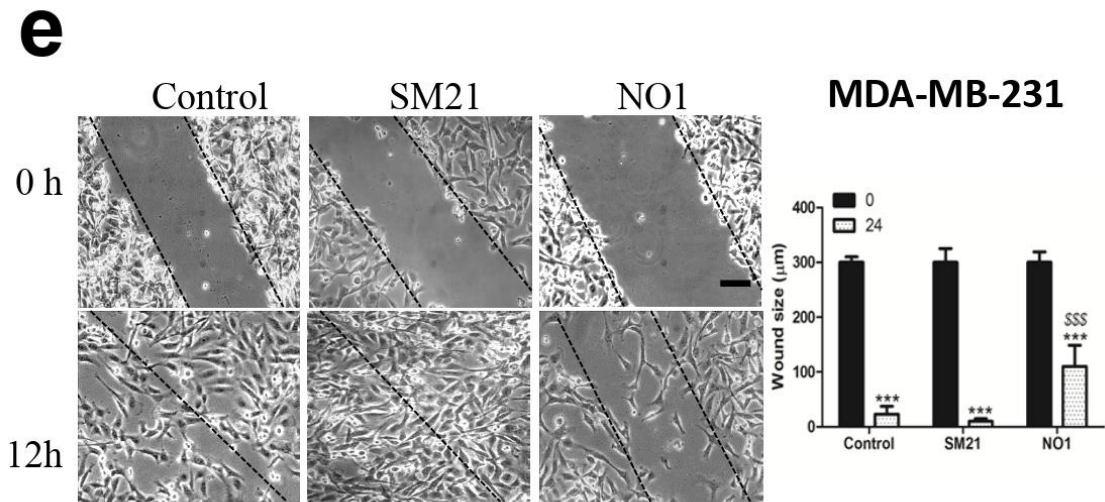
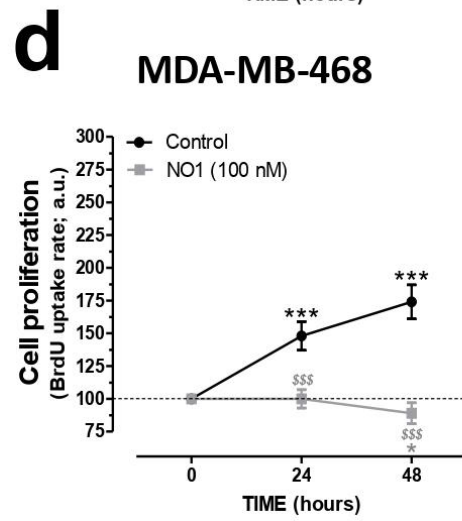
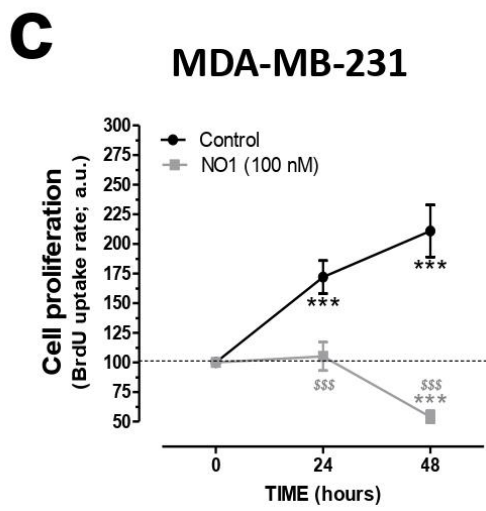
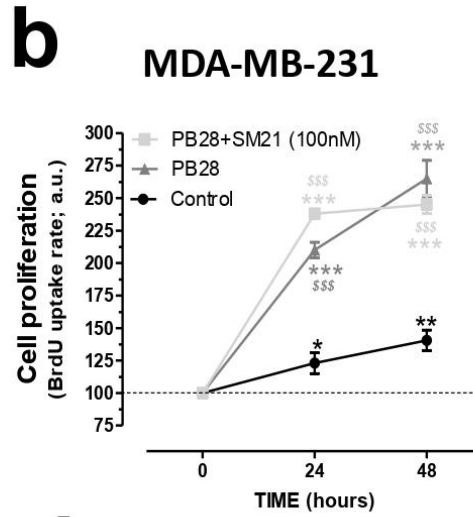
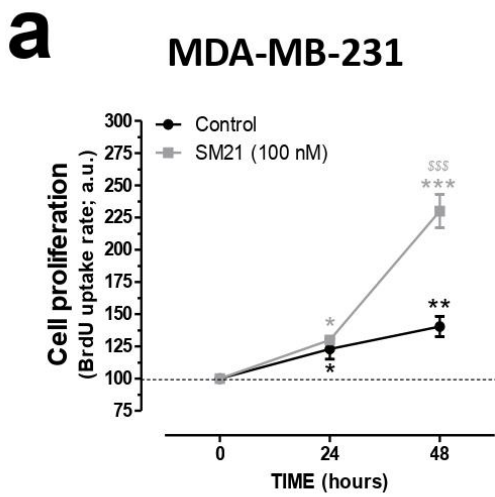


Figura 5.1. Expresión de $\sigma 2R/TMEM97$ en las líneas celulares MCF10A, MCF7 y MDA-MB-231. Las células MCF10A, MCF7 y MDA-MB-231 se sembraron sobre cubreobjetos a la misma concentración (1×10^6 células/mL). (a) Las células se levantaron y fueron lisadas con la solución de Laemmli para utilizar el anticuerpo anti-TMEM97 en la técnica WB como se ha descrito en Material y Métodos. Los gráficos de barras representan el incremento de la expresión relativa de $\sigma 2R/TMEM97$ sobre las células MCF10A normalizadas utilizando como control de carga experimental el contenido en actina. (b) Alternativamente, las células se incubaron 5 min con 100 nM de NOI mantenidas a temperatura ambiente y se dispusieron debidamente para ser observadas bajo un microscopio confocal de fluorescencia, donde las muestras se excitaron a 390 nm. La fluorescencia resultante del NOI fue adquirida a una longitud de onda de 505 nm. Las imágenes se centraron en el plano medio celular usando un objetivo de aceite de inmersión 40x, siendo el resultado de tres experimentos independientes. La barra equivale a 30 μ m. (c) Las células una vez tratadas con NOI, como se explica anteriormente, se despegaron, lavaron y se resuspendieron en 1 mL de PBS dentro de una cubeta de cuarzo. La fluorescencia emitida por el NOI de cada una de las muestras se detectó gracias a un espectrofluorímetro (Ex/Em: 390nm/505 nm). El gráfico de barras representa el porcentaje de fluorescencia del NOI comparado con los valores encontrados en las muestras de células MCF10A, presentados como la media \pm S.E.M de cinco experimentos independientes. **, ***: representa $p < 0.01$ y $p < 0.001$ con respecto a MCF10A.

5.1.2. – El ligando $\sigma 2R/TMEM97$ altera la migración y proliferación de las células TNBC.

Como fue evidenciado en nuestro laboratorio, el NOI logró alterar significativamente la morfología de las células MDA-MB-231 en comparación con las células controles MCF10A (información no presentada). Tomado como punto de partida, nos propusimos evaluar si el $\sigma 2R/TMEM97$ es necesario para llevar a cabo tal mecanismo. Para ello, monitorizamos la acumulación de BrdU en las células estudio utilizando un lector de placas TECAN M200 Infinite pro ELISA (Tecan Trading Ltd, Mannedorf, Switzerland) y varios ligandos del $\sigma 2R/TMEM97$ como con el NOI, SM21 y PB28. Como se puede observar en la Figura 5.2a, las células MDA-MB-231 crecieron bajo condiciones controladas y en presencia de SM21 (100 nM), el cual ha sido descrito previamente como antagonista de $\sigma 2R/TMEM97$. Transcurridos 48 h se produjo un incremento de $265.0 \pm 14.0\%$ de la captación de BrdU, comparado con los valores obtenidos al principio del proceso experimental (tiempo 0 h). Las células que crecieron bajo condiciones controladas mostraron un incremento en la captación de BrdU de $140.0 \pm 14.0\%$, con respecto al valor encontrado al tiempo 0 h (Figura 5.2a, línea negra); además, el SM21 aumentó la proliferación de las células MDA-MB-231. Adicionalmente, incubamos las células con PB28, agonista previamente descrito para $\sigma 2R/TMEM97$ pero que también puede actuar como antagonista de $\sigma 1R$. De hecho, y en concordancia con otros autores, el PB28 actuaría como un ligando de $\sigma 2R/TMEM97$ e induce la muerte celular en varias líneas cancerígenas como en las de páncreas.



*Figura 5.2. σ 2R/TMEM97 está involucrado en la proliferación y migración celular de las líneas de cáncer de mama triple negativas (TNBC). (a) Las células MDA-MB-231 se sembraron sobre cubreobjetos (0.5×10^6 células/mL), y el día 0, el cultivo celular fue suplementado con el vehículo del control (a-d), SM21 100 nM (a, b), PB28 (1 nM, línea gris oscura (b)), y una combinación de PB28 + SM21 ((b) línea gris claro). Todas las células se mantuvieron en cultivo al menos 48 h bajo condiciones controladas de crecimiento (37 °C y 5% de CO₂ en el incubador). Simultáneamente, las líneas celulares TNBC, MDA-MB-231 (c) y MDA-MB-468 (d) crecieron durante 48 h en presencia o ausencia de 100 nM de NO1. En los tiempos indicados en la Figura, estas células incorporaron BrdU durante 2 h para ser procesadas según el protocolo recomendado por la propia compañía suministradora de BrdU. La mayor o menor captación de BrdU fue analizada mediante la determinación de la absorbancia a 450 nm gracias a un lector de placas TECAN ELISA. Los gráficos son representativos de seis experimentos independientes. (e) Las células MDA-MB-231 se sembraron y crecieron durante 24 h, permitiendo alcanzar una adecuada confluencia, para, a continuación, ser incubadas durante 5 min con NO1 (100 nM), y además, las células se cultivaron en paralelo con el vehículo (control) o el SM21 (100 nM) a lo largo de todo el experimento. Al comienzo del experimento, una raya se realizó sobre la monocapa de células (tiempo 0 h) y, durante las siguientes horas, tomamos imágenes del cultivo celular usando microscopía de luz visible con objetivo 10 \times . Los experimentos llegaron a su fin cuando en el cultivo de las células controles la raya se repobló de células, ocurriendo sobre las 12 h en la mayoría de los casos. Las líneas punteadas definen el campo exento de células. Las barras equivalen a 100 μ m. *, ** y *** representan $p < 0.05$, $p < 0.01$ y $p < 0.001$ respectivamente, comparadas con los valores de BrdU encontrados a tiempo 0 h. . \$\$\$: $p < 0.001$ comparado con las células no tratadas con los ligandos σ 2R/TMEM97 en el tiempo dado.*

La incubación de las células MDA-MB-231 durante 48 h con PB28 (1 nM) incrementó significativamente el crecimiento celular. El tratamiento con PB28 mejoró este crecimiento en mayor grado que el SM21 (véase las líneas gris oscuro en la Figura 5.2a.b). El tratamiento conjunto con ambos ligandos (SM21 + PB28) produjo un rápido crecimiento celular en las primeras 24 h, sin embargo y tras el cual, un leve descenso no significativo prosiguió hasta las 48 h. Estos resultados nos llevan a concluir que la interferencia de la actividad de σ 2R/TMEM97 modifica la proliferación celular en MDA-MB-231. Finalmente, para determinar la idoneidad del NO1 como posible agente antiproliferativo en células TNBC, las células MDA-MB-231 y MDA-MB-468 crecieron, como se ha descrito con anterioridad, en presencia o ausencia de NO1 (100 nM). Nuestros resultados indican que el tratamiento con NO1 desencadenó un descenso significativo en la proliferación celular de ambas líneas (Figura 5.2c.d). Las células MDA-MB-468 presentan una diferencia sustancial con respecto a las MDA-MB-231 ya que pertenecen a una línea de paciente no caucásica que representa un fenotipo de cáncer de mama más agresivo. Las alteraciones características de los genes de la familia RAS descritas en las células MDA-MB-231 no han sido descritas en las células MDA-MB-468.

A continuación, evaluamos el posible papel de σ 2R/TMEM97 en la capacidad de migración de las células MDA-MB-231. Este procedimiento experimental fue evaluado mediante el ensayo de cicatrización de la herida, descrito con anterioridad. Este protocolo reveló que el SM21 (100 nM) produce una rápida acción y cierre del defecto a las 12 h; mientras que pequeños espacios libres de células pudieron ser observados en las condiciones controles para un mismo tiempo dado (Figura 5.2e; paneles centrales vs paneles izquierdos y gráfico de barras). Por el contrario, la incubación de las células MDA-MB-231 con NO1 (100 nM) durante 5 min previo rayado de la

monocapa del cultivo fue suficiente para inhibir la migración celular de la línea MDA-MB-231, como se evidencia en el amplio espacio libre de células tras las 12 h de experimento (Figura 5.2e; panel izquierdo vs panel derecho y gráfico de barras). Esto nos demuestra que el ligando de σ 2R/TMEM97, el NO1, redujo la migración celular mientras que el SM21 presenta los efectos contrarios. Tomando en consideración todo ello, estos resultados arrojan una relevante funcionalidad de σ 2R/TMEM97 en las células de cáncer de mama MDA-MB-231 que está en concordancia con los resultados obtenidos en otros modelos celulares y con otros estudios con agonistas de σ 2R/TMEM97.

5.1.3. – El NO1 promueve la muerte celular y la apoptosis en células MDA-MB-231.

Con anterioridad se han descrito efectos antitumorales de los ligandos de σ 2R/TMEM97 en la bibliografía. En nuestros experimentos, la incubación en células MDA-MB-231 con NO1 durante 30 min produjo un desprendimiento citoplasmático de la membrana y alteración de la morfología celular siendo menos evidente en la línea MCF10A (información no presentada). También produjo una reducción de la capacidad migratoria y proliferativa en las células MDA-MB-231 (Figura 5.2). Además, especulamos sobre la posible función antitumoral del NO1. Así, inicialmente lo evaluamos mediante la tinción con yoduro de propidio (PI) en células MCF10A, células MCF10A artificialmente sobreexpresadas con TMEM97 y células MDA-MB-231. Estas células fueron cultivadas sobre cubreobjetos durante 48 h permitiendo su crecimiento. La presencia de fluorescencia positiva derivada de su YFP-tag nos evidenció el éxito del sobreexpresamiento. Seguidamente, el medio de cultivo se reemplazó por un medio HBS suplementado con yoduro de propidio (PI, 4 μ M). Las células permanecieron 45 min a 37 °C en el interior del incubador y el NO1 (100 nM) o el vehículo fueron incorporados al medio extracelular en los últimos 30 min. Como se aprecia en la Figura 5.3.a.b, el tratamiento con NO1 aumentó la captación de PI. Un incremento en el número de células positivamente teñidas con PI, en torno a 5 veces, se obtuvo en las células MDA-MB-231 tratadas con NO1 comparadas con aquéllas que no fueron tratadas (barra blanca en la Figura 5.3a). Además, la administración del NO1 en células MCF10A aumentó su captación de PI, pero la tinción de PI fue más baja que en las células MDA-MB-231 tratadas con el mismo agonista (véase Figura 5.3b.c e histograma en Figura 5.3a).

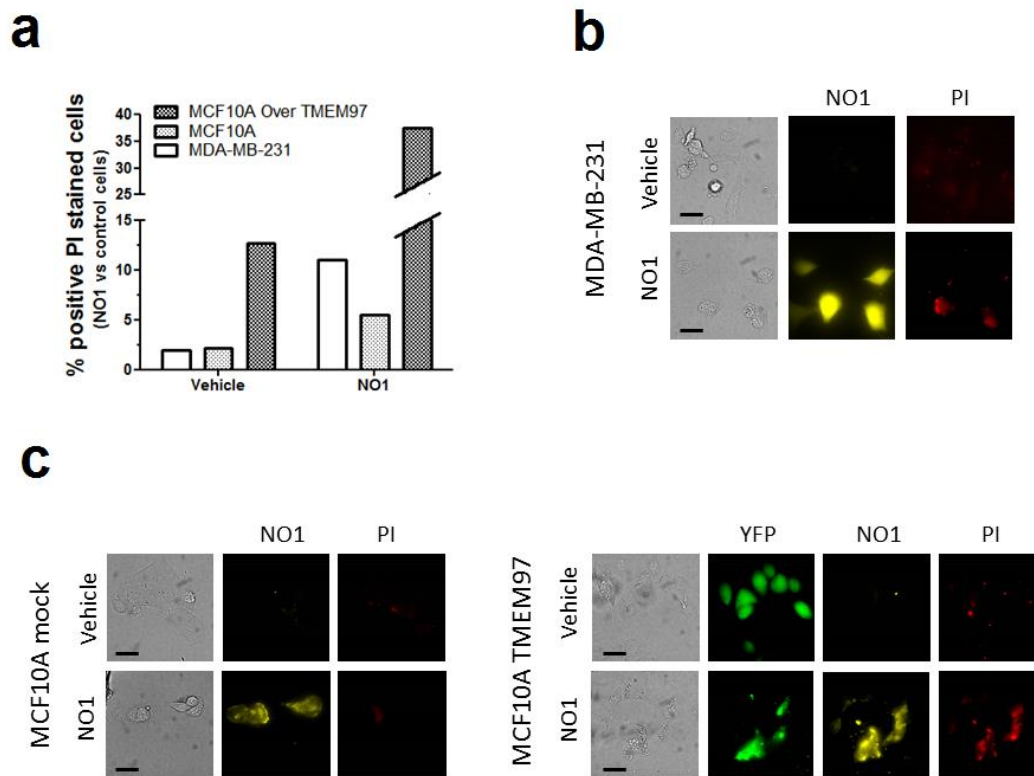
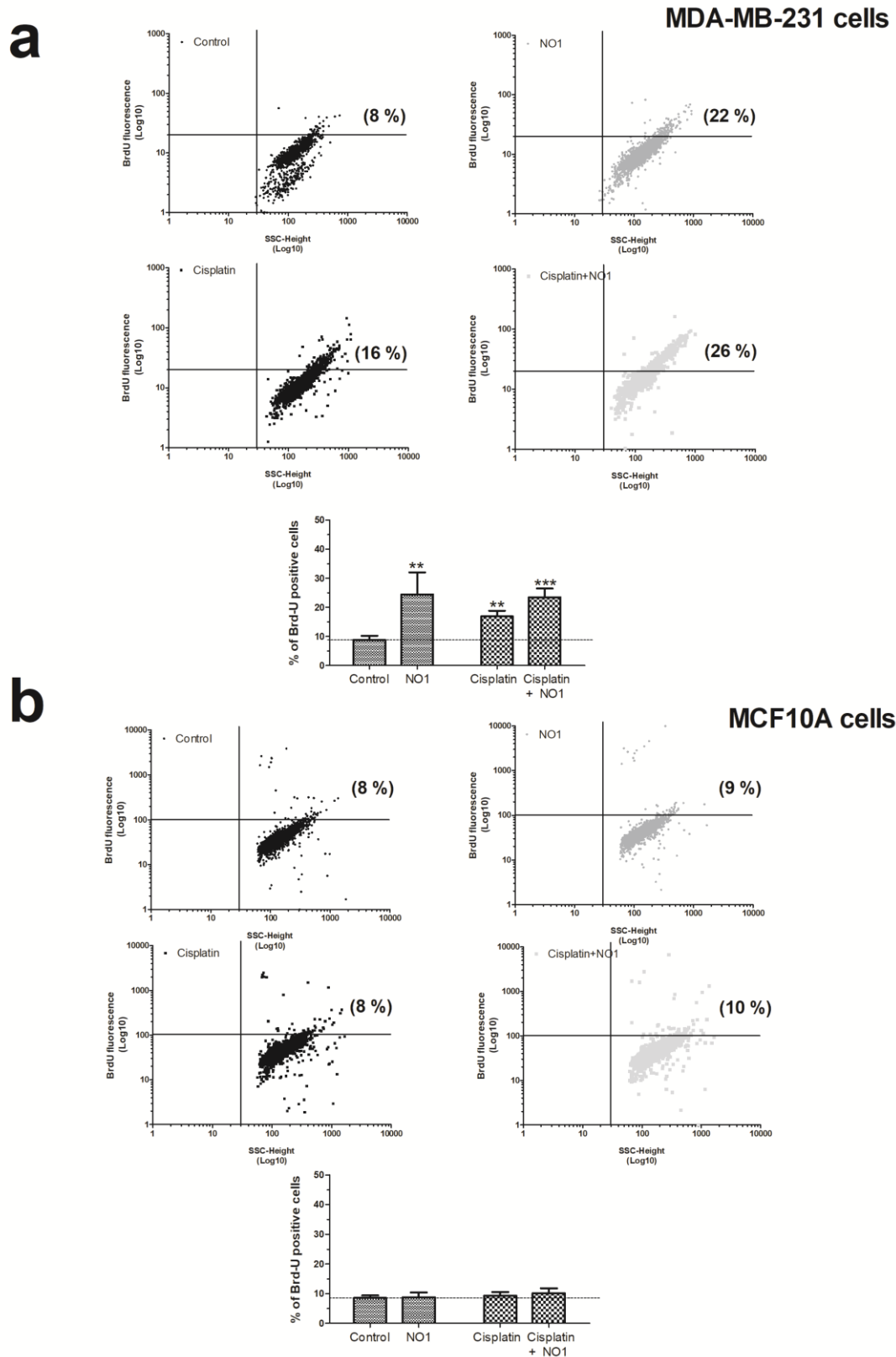


Figura 5.3 Muerte celular de NO1 evidenciada mediante la tinción de PI en células MDA-MB-231. (a–c) Las células MDA-MB-231, MCF10A y MCF10A sobreexpresando TMEM97 se cultivaron hasta alcanzar una confluencia apropiada y se incubaron durante 45 min con yoduro de propidio (PI, 4 μ M). Cuando restaban 30 min, al medio extracelular se le incorporó o bien el vehículo o NO1 (100 nM). Al transcurrir el tiempo de incubación, se tomaron varias imágenes de las células en las diferentes condiciones experimentales, como está descrito en el apartado correspondiente del Material y Métodos. (a) El gráfico de barras representa el porcentaje de células positivamente teñidas por PI después de su administración de NO1 vs células no tratadas (vehículo), cuyos resultados provienen de al menos 200 células de cuatro transfecciones diferentes e independientes. Las barras en las imágenes equivalen a 50 μ m.

El porcentaje de células MCF10A positivas a la tinción de PI con la administración de NO1 se incrementó significativamente con la sobreexpresión de TMEM97 (Figura 5.3a.c). Análisis complementarios sobre la fluorescencia de NO1 y de MCF10A YFP-TMEM97 en las imágenes tomadas en nuestro laboratorio revelaron un relativo grado de colocalización (información no presentada). Estos datos podrían indicar que el NO1 produce muerte celular al interactuar con σ 2R/TMEM97; explicando la reducción anteriormente referida sobre la capacidad de migración de las células MDA-MB-231. Para aumentar nuestro conocimiento sobre el mecanismo subyacente al efecto producido por el NO1 sobre las células MDA-MB-231, investigamos los potenciales efectos proapoptóticos del NO1 sobre estas células a través de la técnica de citometría de flujo junto con la técnica TUNEL basada en BrdU descrito en el apartado de Material y Métodos.

Como puede observarse en la Figura 5.4a, la incubación de las células MDA-MB-231 durante 5 min con NO1 (100 nM) desembocó en un descenso significativo del $24.0 \pm 8.0\%$ ($p < 0.01$; $n = 4$) en el número de células apoptóticas en comparación con aquellas que permanecieron sin tratar.



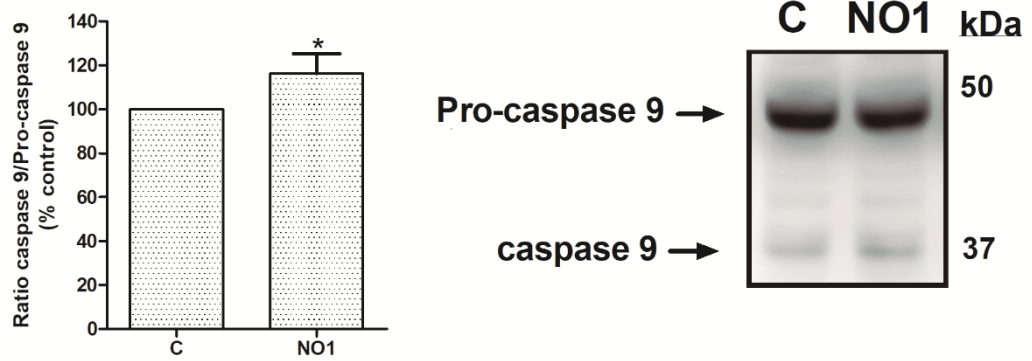
*Figura 5.4. El NO1 promueve apoptosis en células MDA-MB-231. Las células MDA-MB-231 (a) y MCF10A (b) se trataron con el ligando del σ 2R/TMEM97 NO1 (100 nM durante 5 min) o el agente antineoplásico cisplatino (50 μ M durante 30 min) o bien con una combinación de ambos fármacos. Una vez alcanzados los tiempos de incubación, las células se fijaron y, seguidamente, se cargaron de BrdU siguiendo las instrucciones proporcionadas por el kit comercial de apoptosis. El porcentaje obtenido de células apoptóticas se evaluó con citometría de flujo y su software libre asociado estableció las máscaras específicas para cada población de células estudiadas. Las gráficas de puntos son representativas de cuatro experimentos distintos y los histogramas expresan la media \pm error estándar de la media (S.E.M.) del porcentaje de las células teñidas positivas a BrdU después del tratamiento con NO1 con respecto de los valores encontrados en las células controles. ** y *** representan $p < 0.01$ y $p < 0.001$, respectivamente, comparado con las células control.*

Para descartar efectos no deseados del NO1 desencadenados a través de una vía diferente al σ 2R/TMEM97, analizamos su función en células MCF10A (Figura 5.4b) ya que la expresión de σ 2R/TMEM97 en esta líneas es eminentemente baja, como se evidenció en la Figura 5.1. Tal y como cabría esperar, la administración de NO1 (100 nM) durante 5 min en las células MCF10A no activó su apoptosis (2.0 ± 5.0 %; $p > 0.05$; $n = 6$). Es interesante mencionar que la utilización de cisplatino no logró aumentar el porcentaje de activación de apoptosis en estas células (2.0 ± 3.0 %; $p > 0.05$; $n = 6$), y que tan solo la suma de ambos tratamiento fue capaz de inducir un leve incremento aunque sin significación estadística apreciable (2.0 ± 3.0 %; $p > 0.05$; $n = 6$). En general, el porcentaje de células apoptóticas obtenido en los experimentos con células MCF10A fue menos significativo que los obtenidos en las células MDA-MB-231 (compárese histogramas de la Figura 5.4a.b).

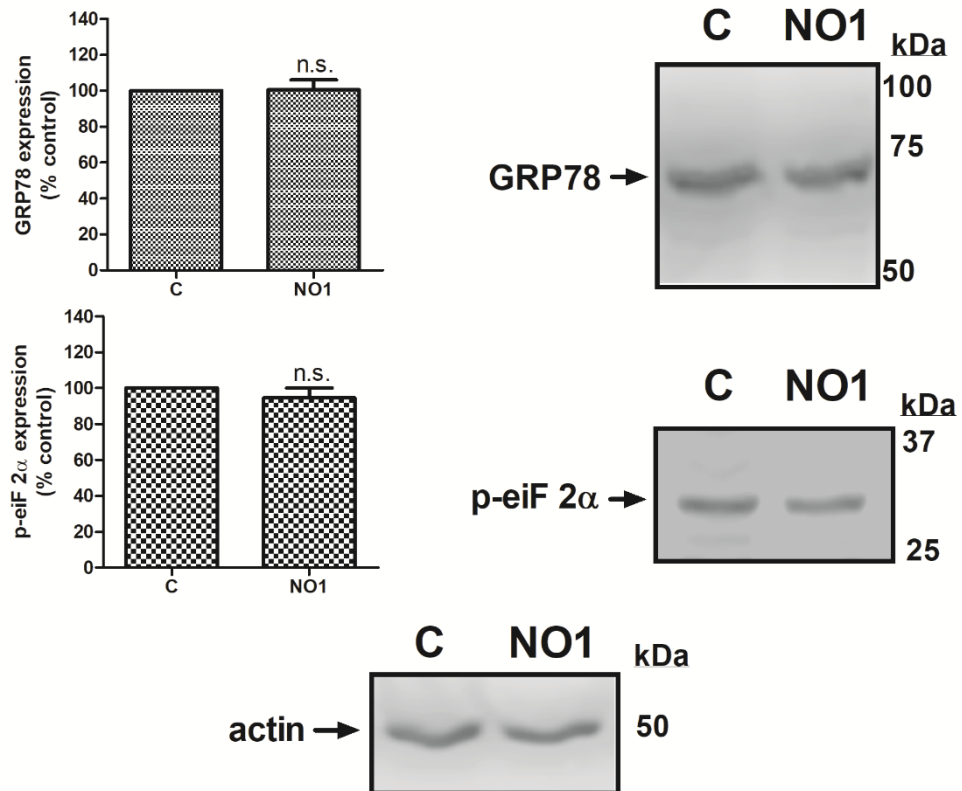
Seguidamente, indagamos en el mecanismo de activación subyacente inducido por la incubación de NO1 con la línea celular MDA-MB-231. Para ello, las muestras celulares de MDA-MB-231 se incubaron durante 5 min con NO1 100 nM o bien permanecieron bajo condiciones controles sin tratar. Todas las muestras se testaron a través de la técnica WB usando los anticuerpos anti-caspasa-9, anti-GRP78 y anti-fosfo-eiF2 α para discernir si la activación por NO1 pudiera depender de rutas apoptóticas mecanismo dependiente mitocondrial o dependiente de estrés del RE, respectivamente. Complementariamente, las membranas de nitrocelulosa se testaron para el anticuerpo anti-LC3 y evaluar así el ratio LC3II/LC3I como indicativo de una posible activación de la autofagia en respuesta al NO1. En protocolos experimentales internos del grupo, el σ 2R/TMEM97 no se localizó en la mitocondria al no obtener una colocalización entre el NO1 y el mitotracker en condiciones controles y en células preactivadas con TG (información no presentada). Sin embargo, el NO1 interfiere en la actividad σ 2R/TMEM97 y, consecuentemente, produce una activación apoptótica vía dependiente de la mitocondria. Este hecho se evidenció por el incremento del 16.0 ± 8.0 % observado en los resultados de caspasa-9 activada (35 kDa), acorde con la disminución en los resultados de la procaspasa-9 inactivada (47 kDa) (Figura 5.5a; $p <$

0.05; n = 3). Por el contrario, el NO1 no activó ningún otro marcador alternativo de otras vías de apoptosis, como pudieran ser las de estrés de RE o autofagia (véase Figura 5.5b.c).

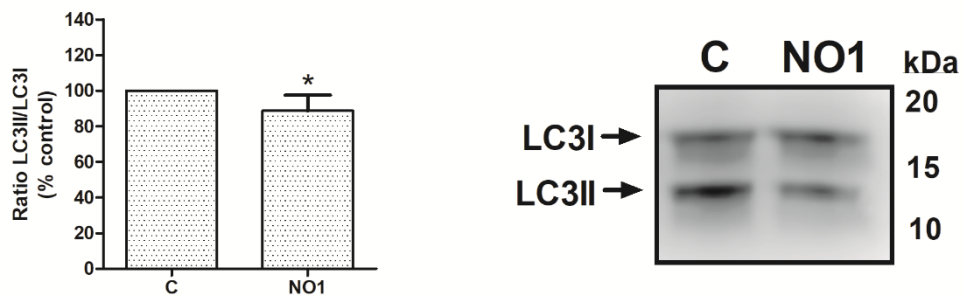
a



b



c



*Figura 5.5. El NO1 promueve la activación de la caspasa-9. Las células MDA-MB-231 se estimularon con NO1 (100 nM) durante 5 min o permanecieron sin estimular. Entonces se mezclaron con la solución Laemmli y, una vez lisadas, las muestras se cargaron en geles de WB para incubarse con los anticuerpos anti-caspasa-9 (a), anti-fosfo-eiF2 α (b), anti- GRP78 (b) y anti-LC3 (c), como se especifica en el apartado correspondiente del Material y Métodos. Las membranas de nitrocelulosa se reincubaron con el anticuerpo de la actina para obtener el control de carga muestral. Las imágenes son representativas de cuatro experimentos independientes y los histogramas del promedio del porcentaje \pm error estándar de la media (S.E.M.) de las células tratadas con el agonista del σ 2R en comparación con las células controles que permanecieron sin tratamiento. * representa $p < 0.05$ comparado con las células controles, mientras que n.s. representa $p > 0.05$.*

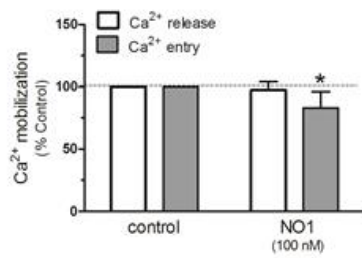
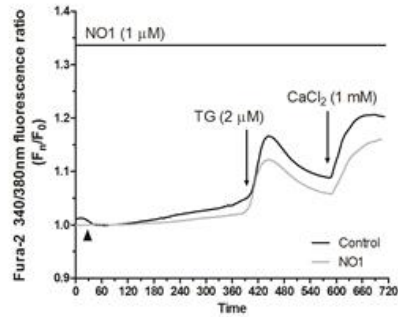
Por otra parte, evaluamos diferentes rutas de caspasas envueltas en la señalización apoptótica inducida por el NO1 gracias a la utilización de los sustratos específicos fluorogénicos para las caspasas-9, -3 y -8. Como pudimos contemplar en nuestro laboratorio, todos los sustratos específicos para las caspasas utilizados aumentaron su fluorescencia tras incubar las muestras con NO1 (100 nM) (información no presentada). Para evitar posibles interferencias en los datos obtenidos derivadas de la autofluorescencia del NO1, contemplamos el uso de controles internos en los que las células de estudio fueron incubadas con NO1 pero no con los sustratos fluorogénicos. También cuantificamos el valor del NO1 en la solución de reacción carente de muestra celular. La fluorescencia obtenida en los controles internos se usó para corregir la fluorescencia emitida por cada sustrato en cada experimento. La magnitud de la fluorescencia emitida por los diferentes sustratos fue mucho más elevada que la fluorescencia emitida por el NO1. Nuestros datos revelaron que la caspasa-9 sería la primera en activarse como resultado de la incubación con NO1; esta conclusión se basa en el hecho de que evidenciamos un incremento significativo de la fluorescencia emitida por el sustrato de la caspasa-9 al cabo de 5 min tras la adición del NO1 en la muestra celular. La caspasa-3 se activó tras la incubación del NO1 durante 5 min pero en menor grado que la caspasa-9. La fluorescencia de los sustratos de las caspasas-3 y -8 incrementaron de manera significativa tras 30 min de incubación con NO1. Estas dos caspasas han sido relacionadas en la bibliografía y parecen ser activadas tras la activación previa de la caspasa-9 en otros tipos celulares. Una evidencia más en lo relativo al mecanismo apoptótico dirigido por la caspasa-9 tras la inducción previa del NO1 obtuvimos en nuestro laboratorio cuando preincubamos las células MDA-MB-231 durante 90 min con 40 μ M del inhibidor de la caspasa-9 (Z-LEHD-FMK), logrando atenuar significativamente el efecto del NO1 (información no presentada).

5.1.4. – σ 2R/TMEM97 es necesario para la activación de SOCE en células MDA-MB-231.

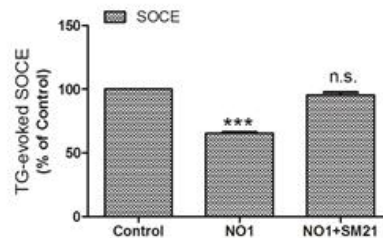
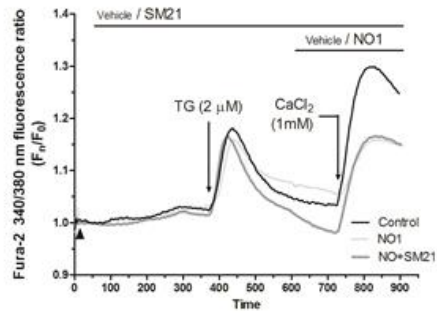
La proliferación en células de cáncer de mama depende en gran medida de la homeostasis del Ca^{2+} . Una de las evidencias que soportan esta idea es el hecho de que el silenciamiento de la expresión de Orai1, uno de los principales componentes de la entrada de Ca^{2+} operada por depósito (SOCE), disminuye la proliferación de las células MDA-MB-231 (Yang, Zhang and

Huang, 2009; McAndrew *et al.*, 2011). Además, la activación de calcineurina tras la entrada de Ca^{2+} a través Orai1 es capaz de desfosforilar y activar el factor de transcripción proliferativo NFAT1 (Kar and Parekh, 2015; Albarran *et al.*, 2018). Cabe destacar que el uso de ligandos para $\sigma 1\text{R}$ y $\sigma 2\text{R}$ es capaz de alterar la homeostasis del Ca^{2+} en células de neuroblastoma SK-N-SH (Vilner and Bowen, 2000). Considerando la elevada expresión de $\sigma 2\text{R}/\text{TMEM97}$ en las células MDA-MB-231, investigamos su posible papel en la homeostasis intracelular del Ca^{2+} . Observamos así que las células MDA-MB-231 cargadas con fura-2 preincubadas con NO1 (100 nM durante 5 min) no reflejaron cambio alguno en la liberación de Ca^{2+} inducido por TG de los reservorios intracelulares (Figura 5.6). Por el contrario, el NO1 redujo significativamente SOCE en un $17.0 \pm 12.0\%$ (Figura 5.6a; $p < 0.05$; $n = 6$). El NO1 fue capaz de disminuir la respuesta de SOCE aun cuando este mecanismo había sido previamente activado por la estimulación con TG durante 3 min, antes de añadir el ligando del $\sigma 2\text{R}/\text{TMEM97}$. Como puede observarse en la Figura 5.6b, la reducción acaecida bajo estas condiciones fue del $34.5 \pm 1.0\%$ ($p < 0.001$, $n = 6$). Por otro lado, las células MDA-MB-231 preincubadas con SM21 durante 5 min superaron la inhibición de SOCE producida por el NO1 ($95.5 \pm 2.0\%$; $p > 0.05$, $n = 6$). Exploramos complementariamente el papel de $\sigma 2\text{R}/\text{TMEM97}$ en SOCE mediante la expresión de TMEM97 (Figura 5.6c) y mediante la transfección del siARN TMEM97 (Figure 5.6d) en la línea celular MDA-MB-231. Una vez confirmado el éxito de la transfección por microscopía de fluorescencia o WB, las células que presentaban el TMEM97 sobreexpresado incrementaron la respuesta a SOCE en un $56.0 \pm 1.8\%$ ($p < 0.001$, $n = 4$); mientras que aquellas en las que se silenció la expresión de TMEM97, se redujo significativamente $24.8 \pm 14.5\%$ ($p < 0.05$, $n = 4$).

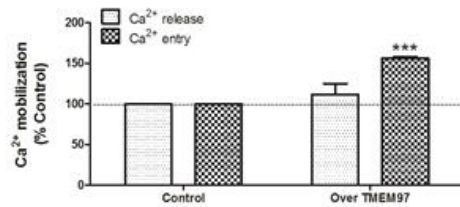
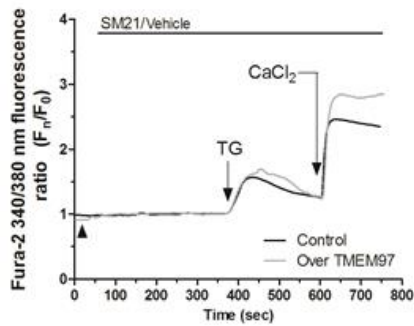
a



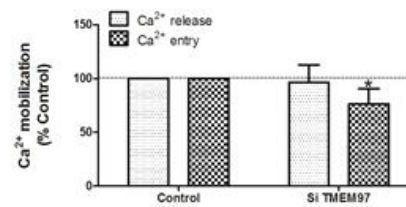
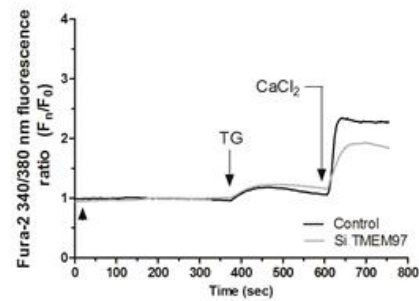
b



c



d



*Figura 5.6. $\sigma 2R/TMEM97$ participa en los cambios de la homeostasis del Ca^{2+} en las células MDA-MB-231. Las células MDA-MB-231 se mantuvieron en cultivo sobre cubreobjetos y se cargaron de fura-2/AM. Se mantuvieron en un medio HBS libre de Ca^{2+} extracelular (suplementado con $75 \mu M$ de EGTA, puntas de flecha) y se incubaron con NO1 ($100 nM$, (a), SM21 ($100 nM$, (b)) o el vehículo, antes de estimularse la entrada de calcio operada por depósito al añadir TG ($2 \mu M$, (a)). Alternativamente, las células fueron suplementadas con NO1 tras la estimulación previa de SOCE con TG (b). Además, las células MDA-MB-231 fueron modificadas genéticamente para expresar o silenciar $\sigma 2R/TMEM97$ (c, d), respectivamente), como se ha descrito en el apartado correspondiente de Material y Métodos. Estas células fueron entonces cargadas con fura-2/AM e incubadas con TG ($2 \mu M$) durante 4 min para activar su respuesta a SOCE. La activación de SOCE por TG se monitorizó en todos los casos con la suplementación de $1 mM$ de $CaCl_2$ en el medio extracelular. Los cambios en SOCE, inducidos por los diferentes ligandos de $\sigma 2R/TMEM97$ o bien tras la modificación genética de las células, se analizaron hallando el área bajo la curva a los largo de 2 min tras la adición de $CaCl_2$. Los gráficos son representativos de 6–8 experimentos independientes y los histogramas representan el promedio del porcentaje \pm el error estándar de la media (S.E.M.) comparado con las células no tratadas con los ligandos de $\sigma 2R/TMEM97$ o las células no modificadas genéticamente (células control). * y ***, representa $p < 0.05$ y $p < 0.001$, respectivamente, en comparación al porcentaje presentado en las células controles.*

Las células MCF10A expresaron una baja cantidad de $\sigma 2R/TMEM97$ (véase Figura 5.1). Además, en experimentos realizados en nuestro laboratorio, incubamos estas células con SM21 ($100 nM$ durante 5 min) y el SM21 no logró modificar ni la liberación de Ca^{2+} inducida por TG de los depósitos intracelulares ni SOCE en estas células (información no presentada). Por el contrario, las células MDA-MB-231 que expresaron una elevada cantidad de $\sigma 2R/TMEM97$, tuvieron un incremento del $44.0 \pm 14.0\%$ ($p < 0.001$, $n = 8$) en la entrada de Ca^{2+} inducida por TG tras la administración de SM21, comparado con los valores obtenidos para aquellas células MDA-MB-231 estimuladas con el vehículo.

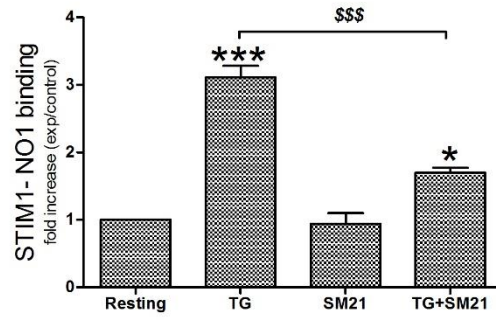
Si bien es cierto, el SM21 fue incapaz de activar la respuesta SOCE *per se*, entendiendo que este ligando de $\sigma 2R/TMEM97$ regula SOCE tras la previa activación por la TG. La mayor respuesta a SOCE en presencia de SM21 podría ser explicada también como una interferencia entre $\sigma 2R/TMEM97$ y la bomba ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA). Esto sería debido a que las estimaciones de SOCE resultan de la determinación de la concentración del Ca^{2+} citosólico, parámetro dependiente a su vez del balance entre entrada de Ca^{2+} y los mecanismos de compensación. Para confirmar esta hipótesis, las células MDA-MB-231 cargadas con fura-2 se resuspendieron en un medio HBS libre de Ca^{2+} y se incubaron durante 5 min con el vehículo o con SM21 ($100 nM$), y seguidamente con $2 \mu M$ de TG (para bloquear la recaptación de Ca^{2+} en el retículo endoplasmático, RE) y $100 nM$ de ionomicina (ionóforo de Ca^{2+} usado para favorecer la salida del Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares). Este protocolo desembocó en un incremento transitorio de la concentración de Ca^{2+} citosólico. El decaimiento del Ca^{2+} no se alteró en ausencia o presencia de SM21, además de que los cambios registrados en el ratio de extrusión del Ca^{2+} derivado de la actividad de la PMCA tampoco fueron alterados por la actividad de $\sigma 2R/TMEM97$ (información no presentada). Finalmente, preincubamos las células con PB28 durante 5 min previa activación de SOCE por la TG resultando en un incremento del $57.9 \pm 27.5\%$ y del $51.6 \pm 21.5\%$ en la liberación de Ca^{2+} y respuesta a SOCE inducidas por TG,

respectivamente. Estos hallazgos sugieren que $\sigma 2R/TMEM97$ es necesario para la activación de SOCE en células MDA-MB-231. Por otro lado, indagamos en el papel del NO1 y el SM21 en la asociación entre los principales componentes de SOCE ya que ambos intervienen en SOCE sin alterar la liberación de Ca^{2+} , siendo además ligandos específicos de $\sigma 2R/TMEM97$. No obstante, los efectos del PB28 podrían explicarse como posibles efectos inespecíficos ya que la bibliografía recoge que se une también al $\sigma 1R$, y no altera ni la liberación ni SOCE en la línea celular MCF7 (línea celular con baja expresión de $\sigma 1R$). De hecho, otros autores coinciden en que este fármaco interfiere con $\sigma 1R$, ampliamente expresado en las células MDA-MB-231. Esto concuerda con nuestro modelo experimental en el que el PB28 indujo liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares y, al mismo tiempo, impide el efecto negativo de $\sigma 1R$ sobre SOCE, recientemente publicado en la bibliografía; además de que un incremento en SOCE dependiente de PB28 debería tener un efecto positivo sobre las células MDA-MB-231, presentado en figura anteriores.

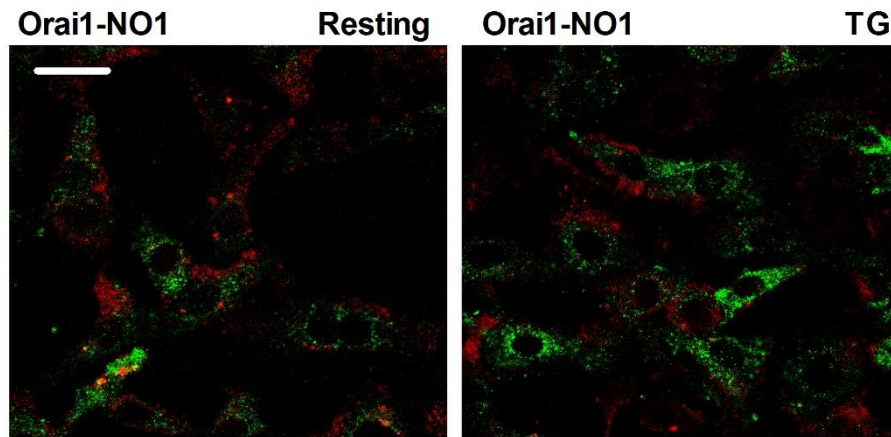
5.1.5. – $\sigma 2R/TMEM97$ interactúa con STIM1 pero no con Orai1 durante la activación de SOCE.

El mecanismo de SOCE se lleva a cabo mediante la interacción entre el sensor de Ca^{2+} del RE, STIM1, y el canal específico de Ca^{2+} Orai1. Por lo tanto, entendimos necesario conocer si $\sigma 2R/TMEM97$ puede interactuar y regular estas proteínas esenciales para la activación de SOCE. Inicialmente comprobamos la asociación entre $\sigma 2R/TMEM97$ y STIM1 en células MDA-MB-231 mediante la inmunoprecipitación del sensor de Ca^{2+} con un anticuerpo específico anti-STIM1 y la tinción resultante de los inmunoprecipitados del NO1, como se ha descrito en el apartado correspondiente de Material y Métodos. El análisis posterior de la fluorescencia del NO1 indicó que la TG aumentó al triple la interacción STIM1- $\sigma 2R/TMEM97$ (Figura 5.7a; $p < 0.001$, $n = 6$). El tratamiento de las células MDA-MB-231 con SM21 (100 nM durante 5 min) redujo significativamente esta interacción ($p < 0.001$, $n = 6$), lo cual podría explicar por qué las preincubaciones con SM21 previenen el efecto del NO1 sobre SOCE, tal y como se aprecia en la Figura 5.6b.

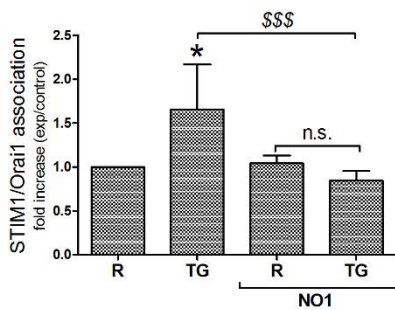
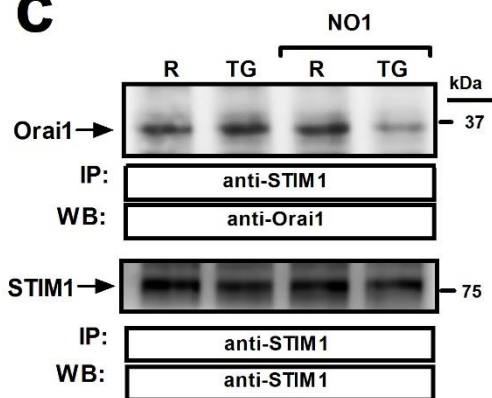
a



b



c



d

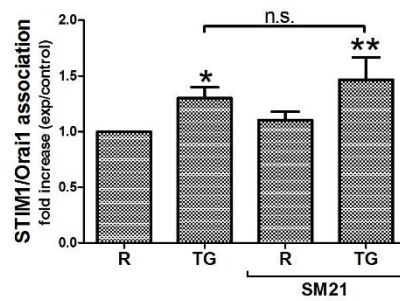
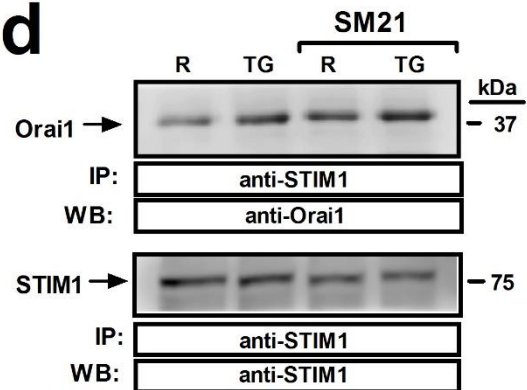


Figura 5.7. σ 2R/TMEM97 interacciona con STIM1 pero no con Orai1. (a) Las células MDA-MB-231 suspendidas en un medio HBS libre de Ca^{2+} no se trataron o bien se estimularon con TG (2 μM) en presencia o ausencia de SM21 (100 nM). Seguidamente, se lisaron las muestras con un volumen equitativo de la solución NP40. Las muestras celulares se inmunoprecipitaron utilizando un anticuerpo anti-STIM1. Al día siguiente, los complejos ya inmunoprecipitados se resuspendieron en PBS y en este preciso momento, se incuban con 100 nM de NO1 durante 5 min para evaluar la cantidad de σ 2R/TMEM97 asociado a STIM1. La fluorescencia del NO1 para cada conjunto experimental se analizó gracias a un lector de placas TECAN (390 nm/505 nm de Ex/Em). Los resultados se representaron como incrementos proporcionales sobre los valores de la fluorescencia del NO1 en las células controles. * y ***: representan $p < 0.05$ y $p < 0.001$, respectivamente, comparado con las células sin estimular; mientras que \$\$\$: representa $p < 0.001$ con respecto a células no tratadas con los ligandos de σ 2R/TMEM97. (b) La interacción entre Orai1 y σ 2R/TMEM97 se analizó utilizando microscopía confocal. Las células sin tratar o estimuladas con TG (2 μM durante 1 min) en un medio HBS sin Ca^{2+} se incubaron entonces durante 5 min con NO1 y, seguidamente, se fijaron al ser mezcladas con una solución a 4 °C de paraformaldehído. Se procedió a permeabilizar (solución NP40) y a sumergirse en una solución rica en albúmina sérica bovina (BSA) (para prevenir uniones inespecíficas de los anticuerpos). Finalmente, las muestras se incubaron con un anticuerpo anti-Orai1. La visualización de Orai1 fue posible gracias al anticuerpo fluorescente secundario CyTM3 siguiendo el protocolo descrito en el apartado de Material y Métodos. Las imágenes fluorescentes de las células se adquirieron con un microscopio confocal permitiéndonos analizar la colocalización existente. La barra equivale a 50 μm . (c) Las células MDA-MB-231 se resuspendieron en un medio HBS libre de Ca^{2+} (suplementado con 75 μM EGTA) y se incubaron durante 5 min con el vehículo o NO1 ((c); 100 nM durante 5 min), o con SM21 ((d); 100 nM durante 5 min). Tras ser mantenidas sin tratar (no estimuladas, R) o incubadas con TG (2 μM , TG) durante 1 min para estimular la entrada de calcio operado por depósito (SOCE), se mezclaron con la solución NP40. La inmunoprecipitación con STIM1 se llevó a cabo incubando las muestras toda la noche con 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anticuerpo anti-STIM1 y esferas de agarosa. Al día siguiente, los complejos inmunoprecipitados de STIM1 se desnaturalizaron al mezclarse con la solución Laemmli e, inmediatamente, se procedió al WB usando un anticuerpo específico anti-Orai1, tal y como está descrito en el apartado de Material y Métodos. Se reincubaron las membranas con el anticuerpo anti-STIM1 para obtener los controles experimentales. Los histogramas representan la media \pm error estándar de la media (S.E.M.) del incremento de la proteína con respecto a la interacción STIM1/Orai1 encontrada en células sin estimular. *, **: representan $p < 0.05$ y $p < 0.01$ respecto de las células sin estimular; \$\$\$ representa $p < 0.001$ comparado con las células no tratadas con los ligandos del σ 2R/TMEM97.

Algunos autores sugieren que el σ 2R/TMEM97 puede presentarse en la membrana plasmática de las células y puede intervenir en el transporte de colesterol hacia el interior del citosol, por ello, exploramos la posible interacción entre σ 2R/TMEM97 y Orai1 en esta localización. Como se muestra en la Figura 5.7b, las células MDA-MB-231 se estimularon con TG o permanecieron sin estimular para, seguidamente, incubarse durante 5 min con NO1 (100 nM) antes de fijarse en hielo con paraformaldehído. La expresión de Orai1 se evaluó gracias a la especificidad del anticuerpo anti-Orai1 junto con la fluorescencia emitida por el anticuerpo específico secundario. El análisis por microscopía confocal indicó que no hubo localización entre Orai1 y σ 2R/TMEM97 ni en células estimuladas con TG ni en células sin estimular (Figura 5.7b). A continuación, para discernir si σ 2R/TMEM97 juega una función destacada en la interacción entre STIM1 y Orai1, evaluamos el papel del NO1 y del SM21 en la co-inmunoprecipitación entre ambas proteínas. Así, en la Figura 5.7c se aprecia que el tratamiento con TG en células MDA-MB-231 aumentó la interacción STIM1/Orai1 en 1.6 ± 0.6 veces ($p < 0.05$; $n = 6$). Preincubaciones previas con NO1 no modificaron esta interacción en células sin estimular pero redujeron significativamente la interacción STIM1/Orai1 inducida por la TG (0.85 ± 0.1 veces comparado con los valores encontrados en célula no estimuladas; Figura 5.7c). Además, el tratamiento con SM21 (100 nM) durante 5 min ligeramente aumentó la interacción STIM1/Orai1 inducida por TG pero no logran

una diferencia significativa cuando se comparan con las células sin estimular (0.4 ± 0.2 ; $p > 0.05$, $n = 8-10$; Figura 5.7d). Todos estos resultados obtenidos sugieren que la adición de NO1 puede disminuir la actividad de $\sigma 2R$ /TMEM97 y, además, podría interferir en SOCE afectando a la interacción entre los componentes I_{CRAC} , como se ha evidenciado al silenciar la expresión de esta proteína con el siARN TMEM97 (Figura 5.6d).

Finalmente, con la idea de consolidar estos últimos resultados, utilizamos una línea celular de neuroblastoma NG115-401L caracterizada por expresar una escasa cantidad de STIM1. La línea NG115-401L expresó TMEM97 y, aunque es significativamente mayor que en las células MCF10A, los valores de TMEM97 encontrados en NG115-401L fueron claramente más bajos que aquellos observados en las células MDA-MB-231 (Figura 5.8). Tras una incubación durante 30 min con NO1 (100 nM), las células NG115-401L presentaron una escasa bioacumulación de NO1 y, por consiguiente, una emisión fluorescente despreciable derivada del NO1 en experimentos complementarios realizados en nuestro laboratorio (información no presentada). Esta baja bioacumulación del NO1 puede explicar por qué estas células no mostraron cambios tan evidentes en su morfología tras la incubación con este fármaco, además de explicar la baja tinción al PI (Figura 5.8a,c imágenes de la sección izquierda; NG115-401L controles). Complementariamente, la sobreexpresión de STIM1 en este modelo celular reconstituye satisfactoriamente el mecanismo de SOCE, como ya se ha demostrado por varios grupos entre ellos el nuestro. Cabe destacar que la sobreexpresión de STIM1 mejoró la redistribución intracelular del NO1 en la línea NG115-401L, además de aumentar el número de células positivamente marcadas con PI (véase Figura 5.8b, barra punteada; y Figura 5.8c, imágenes de la sección derecha, NG115-401L STIM1). Estos resultados nos indican que en ausencia de STIM1 el NO1 presentó menos efectos citotóxicos. De este modo, apoyaría la idea de que $\sigma 2R$ /TMEM97 controla STIM1 y SOCE como sugiere el elevado ratio de colocación encontrado en experimentos realizados en nuestro laboratorio entre NO1 y STIM1 en células NG115-401L, en las que previamente habíamos sobreexpresado STIM1 e incubado el NO1 durante 30 min (información no presentada).

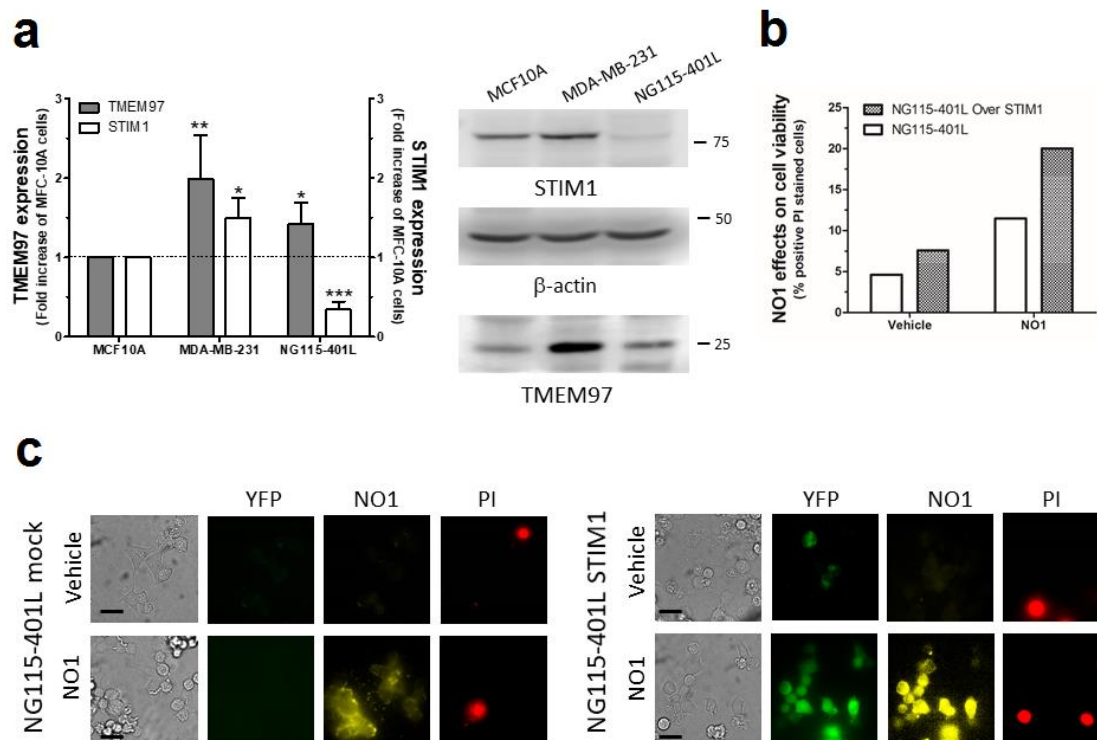


Figura 5.8. El NO1 induce muerte celular en células NG115-401L que artificialmente expresan STIM1. (a) Las células MCF10A, MDA-MB-231 y NG115-401L mantenidas en crecimiento bajo condiciones controladas se despegaron y se resuspendieron en una solución PBS para obtener un número equitativo de células/mL. Las células fueron entonces centrifugadas y resuspendidas en la solución Laemmli para, a continuación, ser tratadas por WB con los anticuerpos anti-TMEM97 y anti-STIM1 como se ha descrito en el apartado de Material y Métodos. El histograma representa los incrementos en la expresión de STIM1 y de $\sigma 2R$ /TMEM97 comparados con aquellos encontrados en MCF10A tras ser normalizados con las actinas, que se utilizaron como controles de carga. *, ** y *** representa $p < 0.05$, $p < 0.01$ y $p < 0.001$, respectivamente, en comparación con los valores encontrados en MCF10A. (b, c) Las células NG115-401L y NG115-401L expresando STIM1 se cultivaron en una óptima concentración y, tras confirmar el éxito de la transfección mediante microscopía de fluorescencia, se incubaron con yoduro de propidio (PI) durante 45 min en el incubador. Al restar 30 min, el medio extracelular se suplementó bien con el vehículo o bien con NO1 (100 nM). Cuando el tiempo de incubación llegó a su fin, las células se examinaron y enfocaron en el plano medio de un microscopio de epifluorescencia con un objetivo de inmersión 100x. (b) El histograma representa el porcentaje de células positivamente teñidas con PI previamente tratadas con NO1 vs células no tratadas. Los datos son el resultado de analizar aproximadamente 200 células de cuatro transfecciones independientes. Las barras en las imágenes equivalen a 50 μ m.

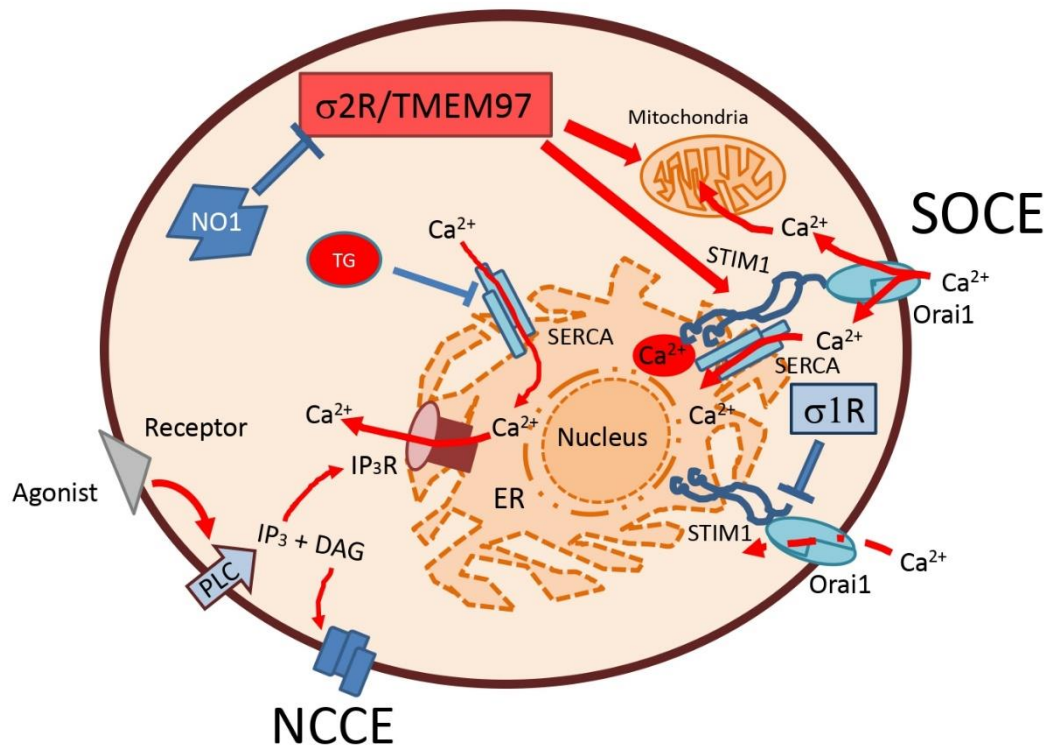


Figura 5.9. Representación esquemática de la regulación de $\sigma 2R/TMEM97$ sobre SOCE en las células MDA-MB-231. La activación del mecanismo de SOCE en células MDA-MB-231 puede estar positivamente regulado por el $\sigma 2R/TMEM97$ debido a su interacción con STIM1, además de facilitar el acoplamiento de Orai1. El aumento de SOCE aumentaría la funcionalidad mitocondrial y el contenido de ATP celular, mejorando la proliferación en estas células. Por el contrario, la inhibición de $\sigma 2R/TMEM97$ inducida por la administración de NO1 bloquearía SOCE y afectaría negativamente a la mitocondria, con la consiguiente activación de la apoptosis vía caspasa-9. SOCE: entrada capacitativa de Ca^{2+} ; PLC: fosfolipasa C; IP_3 : inositol trifosfato; DAG: diacilglicerol; IP_3R : receptor del inositol trifosfato; RE: retículo endoplasmático; SERCA: bomba ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoendoplasmático; TG: tapsigargina.

5.2. La progesterona disminuye la proliferación de las células MDA-MB-231 alterando la homeostasis intracelular del Ca^{2+} a través de la activación de PGRMC1.

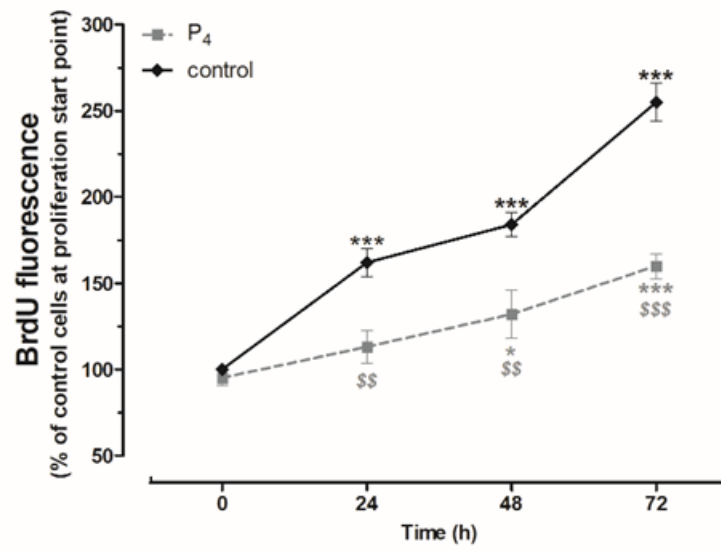
5.2.1. – La P_4 inhibe la proliferación de las células MDA-MB-231.

Las células MDA-MB-231 tienen carencia del receptor nuclear clásico de la P_4 (nPR) aunque en la bibliografía se recoge otro tipo de receptor (nPR) menos caracterizado y constituido por *splicing* alternativo que también es capaz de unirse a la P_4 . Además, el efecto de la P_4 en la proliferación celular no está del todo definido ya que según el tipo celular encontramos discrepancias en sus efectos (Clark *et al.*, 2016). Como puede observarse en la Figura 5.10A, el tratamiento en las células MDA-MB-231 durante 72 h con 1 μM de P_4 provocó una reducción significativa de la

fluorescencia de BrdU para todos los tiempos dados en comparación con las células tratadas con el vehículo, indicando el efecto negativo de la P₄ en la proliferación celular (n = 6).

También está descrito que cambios en las concentraciones del Ca²⁺ citosólico ([Ca²⁺]_i) influyen severamente en la proliferación celular (Jardin, Lopez, *et al.*, 2018) por lo que analizamos la influencia de la P₄ en la homeostasis del Ca²⁺ en las células MDA-MB-231 en ausencia y presencia de Ca²⁺ extracelular (75 μM de EGTA o 1 mM de CaCl₂ se añadió al medio, respectivamente). Curiosamente, las células MDA-MB-231 suspendidas en un medio libre de Ca²⁺ mostraron una pequeña entrada de Ca²⁺ cuando se les incorporó calcio al medio extracelular (1 mM CaCl₂; Figura 5.10B, línea punteada). La incubación de las células MDA-MB-231 con P₄ produjo una entrada de Ca²⁺ (Figura 5.10B, línea gris) que fue significativamente menor que la inducida por la TG (2 μM, TG). La TG impide la acción de la bomba ATPasa de Ca²⁺ del retículo sarcoendoplasmático (SERCA), mecanismo clásico de activación de la entrada de Ca²⁺ operada por depósito (SOCE) (Figura 5.10B, p < 0.001, n = 6).

A



B

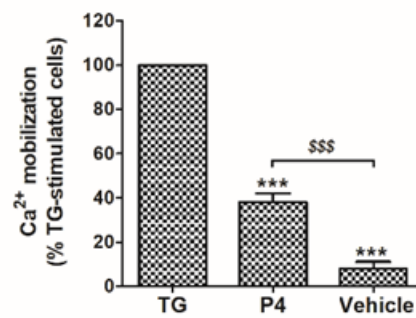
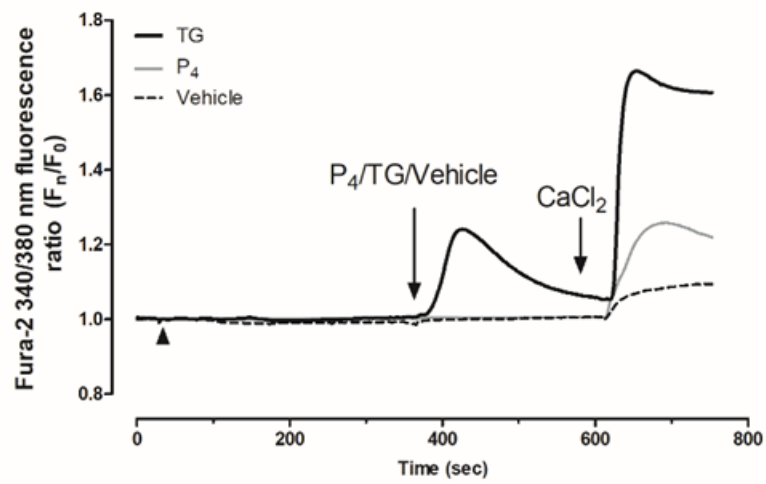
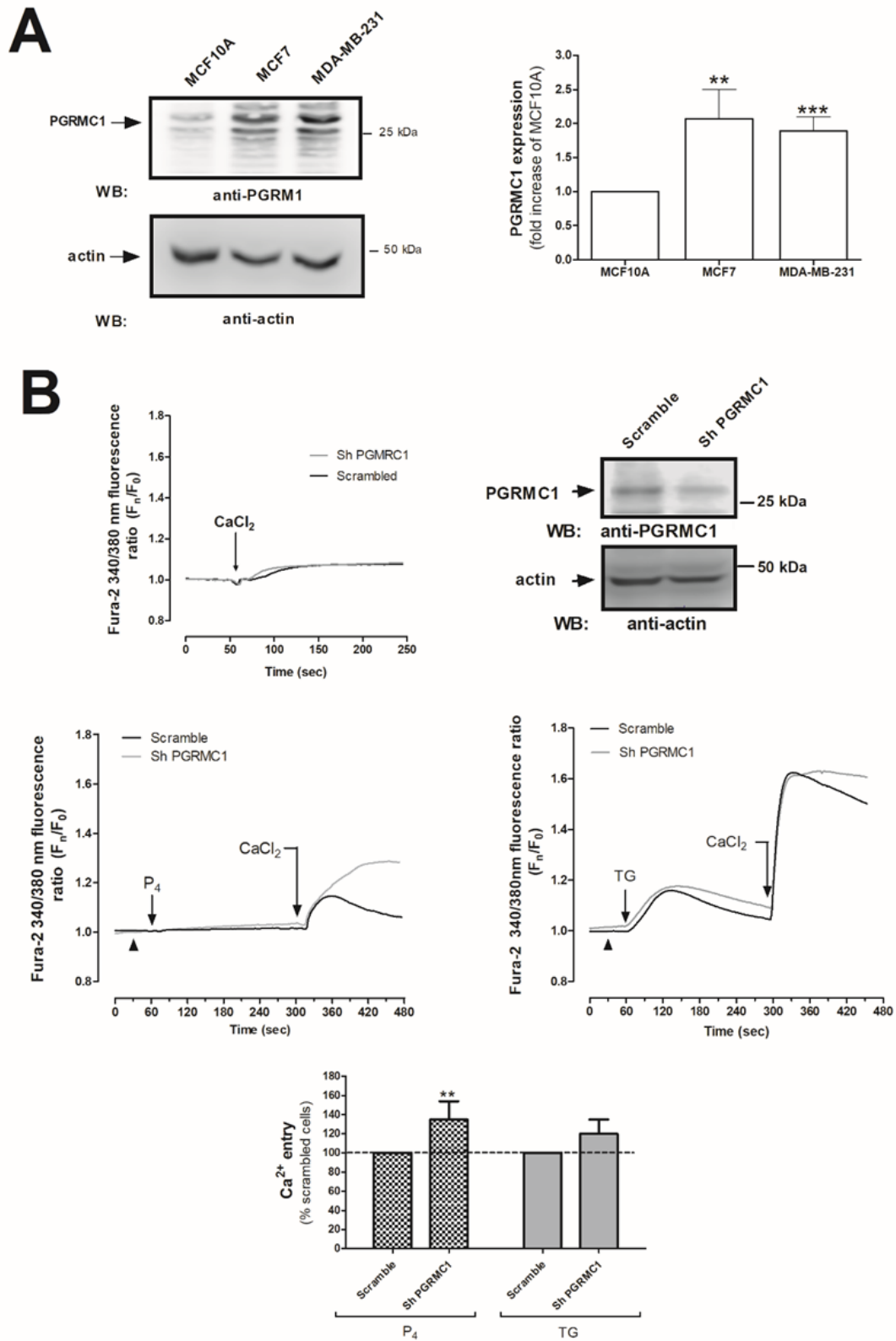


Figura 5.10. La P_4 altera la proliferación celular y la homeostasis del Ca^{2+} en las células MDA-MB-231. A) Las células MDA-MB-231 se cultivaron (5×10^6 células/mL) y proliferaron las 72 h siguientes en presencia del vehículo experimental (control) o bien en presencia de $1 \mu M$ de P_4 . Al tiempo 0, 24, 48 y 72 h estas células se incubaron con BrdU durante 2 h más como se ha descrito en el apartado de Material y Métodos. Los gráficos representan la acumulación de BrdU en el interior del núcleo celular. *, ***, representa $p < 0.05$ y $p < 0.001$ respecto de los valores de BrdU encontrados en las células controles analizadas. \$\$, \$\$\$: representa $p < 0.01$ y $p < 0.001$ de las células controles a tiempo evaluado. B) Las células MDA-MB-231 cargadas con fura-2 se resuspendieron en un medio HBS libre de Ca^{2+} extracelular ($75 \mu M$ de EGTA se añadió según indican las puntas de flecha) y seguidamente se estimularon bien con el vehículo, con la P_4 ($1 \mu M$) o con TG ($2 \mu M$). La movilización de Ca^{2+} tras la estimulación fue monitorizada a lo largo de 4 min, mientras que la entrada de Ca^{2+} resultante del vaciamiento previo de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} al estimularse con diferentes fármacos se visualizó con la incorporación al medio de $CaCl_2$ ($1 mM$) y se monitorizó durante los 2 min posteriores. Los gráficos son representativos de 6-8 experimentos independientes y los histogramas representan el promedio del porcentaje \pm S.E.M. resultante del análisis de las áreas bajo la curva obtenidas según el agonista utilizado y con respecto a las células estimuladas con TG. En cada experimento se consideraron 60-80 células aproximadamente de entre 6-8 días independientes de experimentos. ***, representa $p < 0.001$ respecto del valor del porcentaje de Ca^{2+} hallado en las células MDA-MB-231 estimuladas con TG. \$\$\$, representa $p < 0.001$ respecto del valor del porcentaje de Ca^{2+} encontrado en células sin estimular (vehículo).

5.2.2. – El PGRMC1 impide la movilización de Ca^{2+} dependiente de P_4 en las células MDA-MB-231.

Como se muestra en la Figura 5.11A, las células MCF7 y MDA-MB-231 poseen una expresión más elevada de PGRMC1 en comparación con la línea celular no tumoral MCF10A (2.1 ± 0.4 y 1.9 ± 0.2 veces mayor con respecto a MCF10A; $p < 0.01$ y $p < 0.001$, respectivamente; $n = 6$). Considerando las discrepancias que engloban la identidad estructural del receptor de la P_4 en las células MDA-MB-231 ya mencionadas en el párrafo anterior, silenciamos la expresión del PGRMC1 gracias al plásmido de silenciamiento (shARN). Las células MDA-MB-231 transfectadas con el plásmido shPGRMC1 redujeron eficazmente la expresión de PGRMC1 en estas células tras 48 h de transfección (véase la imagen de WB en la Figura 5.11B). Curiosamente, el silenciamiento de PGRMC1 no alteró la homeostasis del Ca^{2+} en las células sin estímulo pero incrementó la entrada de Ca^{2+} inducida por la P_4 ($35 \pm 19\%$ comparado con las células MDA-MB-231 no modificadas genéticamente: células normales; véase las líneas de Ca^{2+} y el histograma en la parte inferior de la Figura 5.11B; $p < 0.01$, $n = 6$). No obstante, no se observaron cambios significativos en la respuesta SOCE inducida por TG en las células MDA-MB-231 bajo las mismas condiciones experimentales (Figura 5.11B, $20 \pm 15\%$; $p > 0.05$, $n = 6$). De acuerdo con los resultados obtenidos, la movilización de Ca^{2+} estimulada por la P_4 se encuentra disminuida en las células MDA-MB-231 debido a PGRMC1, obteniendo además en experimentos complementarios del grupo unos resultados similares en células MCF7 (información no presentada). La disminución de la $[Ca^{2+}]_c$ inducida por la P_4 ha sido descrita en células inmortalizadas de la granulosa de rata, pero el mecanismo subyacente sigue sin estar descrito.



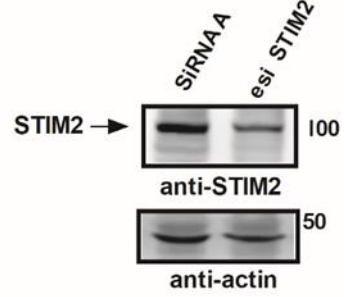
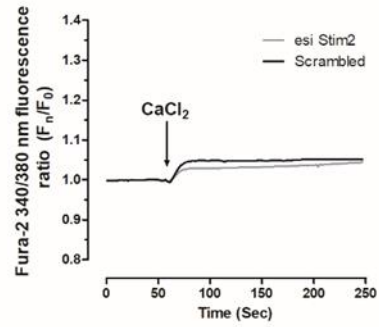
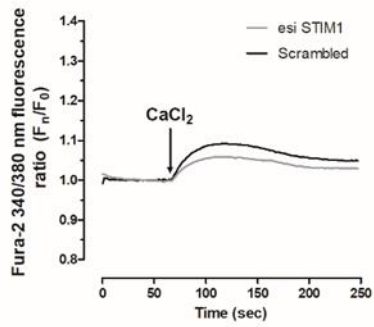
*Figura 5.11. Papel del PGRMC1 en la movilización de Ca^{2+} inducida por P_4 en las células MDA-MB-231. A) Las células sin estimular MCF10A, MCF7 y MDA-MB-231 se resuspendieron en la misma concentración y de inmediato se lisaron con una solución NP40. Las muestras proteicas resultantes se desnaturalizaron al mezclarse con un volumen equitativo de la solución Laemmli (5% SDS). Las muestras se sometieron a la técnica de WB y se utilizó un anticuerpo específico anti-PGRMC1 como se describe en el apartado correspondiente del Material y Métodos. Los histogramas representan el promedio del incremento \pm S.E.M. de la cantidad de proteína encontrada en las células MCF10A, siendo los valores previamente normalizados con el contenido correspondiente a la actina de cada muestra cargada en geles independientes. ***, **: representa $p < 0.01$ y $p < 0.001$ con respecto al valor de PGRMC1 encontrado en las células MCF10A. B) Las células MDA-MB-231 se transfectaron con el plásmido de silenciamiento de PGRMC1 (shPGRMC1) durante 48 h a 2 μ g/mL y, una vez confirmada la eficacia del silenciamiento mediante su expresión por WB, se incubaron con 2 μ M de fura-2/AM durante 30 min a 37 °C. Las células fueron entonces sumergidas en un medio HBS libre de Ca^{2+} extracelular (se añadió 75 μ M de EGTA, puntas de flechas) y se estimularon o bien con 1 μ M de P_4 o con 2 μ M de TG. Adicionalmente, para concluir que el silenciamiento de esta proteína no afectaba a la movilización de Ca^{2+} per se en las células MDA-MB-231, 1 mM de $CaCl_2$ se incorporó al medio extracelular de las células bajo condiciones controladas. Estas células habían sido previamente transfectadas con un vector vacío o con el vector shPGRMC1. La movilización de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares inducida por la TG se monitorizó a lo largo de 4 min; mientras que la entrada de Ca^{2+} resultante del vaciamiento previo de los depósitos se visualizó al incorporar 1 mM de $CaCl_2$ al medio extracelular, monitorizándose a lo largo de los 2 min siguientes. Las gráficas son representativas de 6-8 experimentos independientes y el histograma representa el promedio del porcentaje \pm S.E.M. resultante del análisis de los áreas bajo la curva obtenidos por los diferentes agonistas en las células con PGRMC1 silenciado, respecto a las células sin modificar. Se han considerado alrededor de 60-80 células de 6-8 transfecciones independientes. *, ***: representa $p < 0.05$ y $p < 0.001$ en comparación a los valores de movilización de Ca^{2+} presentados en las células MDA-MB-231 sin modificar.*

Indagamos complementariamente en los mecanismos de entrada de Ca^{2+} activados por la P_4 , además de silenciar STIM1 utilizando esiARN. La tecnología esiARN se basa en la combinación de siARNs comerciales dirigidos contra varias secuencias de una misma proteína generados por actividad endonucleasa y alcanzando una mayor eficiencia y especificidad que los siARNs tradicionales, codificados para una única secuencia de la proteína diana. Como se indica en la Figura 5.12A, las células MDA-MB-231 transfectadas con el esiARN STIM1 redujeron casi por completo la expresión de STIM1, sin llegar a alterar significativamente la homeostasis del Ca^{2+} en las células MDA-MB-231 creciendo bajo condiciones controladas (líneas del Ca^{2+} en el panel izquierdo e imágenes del WB adjuntas). En nuestras manos, el esiARN de STIM1 eliminó el efecto significativo de la entrada de Ca^{2+} provocado por la administración previa de P_4 (línea punteada negra; $p > 0.05$, $n = 6$). El siguiente paso que llevamos a cabo fue investigar el papel de STIM2, una isoforma menos conocida y caracterizada de STIM1. STIM2 es capaz de detectar pequeños cambios de Ca^{2+} en el retículo endoplasmático como respuesta a concentraciones fisiológicamente más bajas de los agonistas. El silenciamiento de la expresión de STIM2 disminuyó la entrada de Ca^{2+} inducida por la P_4 en un $67.8 \pm 3.0\%$ (Figura 5.12A, línea gris; $p < 0.001$, $n = 6$), pero no alteró de manera significativa la homeostasis del Ca^{2+} de la células en crecimiento bajo condiciones controladas (Figura 5.11B, líneas de Ca^{2+} en el panel derecho). En concordancia con estos resultados, experimentos complementarios realizados en nuestro laboratorio mostraron una disminución en la entrada de Ca^{2+} inducida por la P_4 en la línea celular MCF7 carentes de STIM2 (información no presentada). Curiosamente, STIM2 no participó en

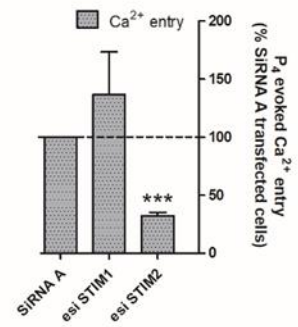
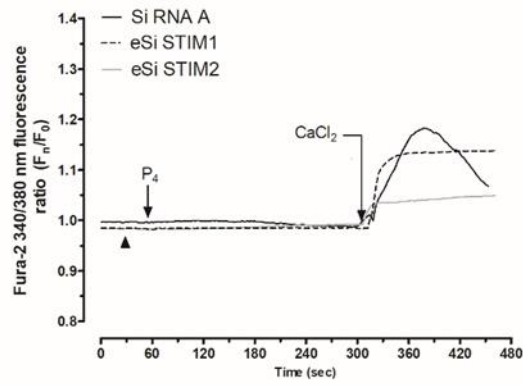
SOCE en las células MDA-MB-231, proceso regido principalmente por STIM1 y Orai1, como demostramos en nuestro laboratorio (información no presentada).

Continuamos explorando los canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática activados por la P_4 en las células MDA-MB-231. Las células MDA-MB-231 se transfectaron con los plásmidos de silenciamiento shARNs de Orai1 y TRPC1 obteniéndose una reducción en su expresión de $89.5 \pm 3.8\%$ and $84.3 \pm 1.2\%$ en la entrada de Ca^{2+} inducida por P_4 comparado con la células transfectadas con un plásmido control (Figura 5.12B; $P < 0.001$; $n = 6$). Por ello, nuestros resultados obtenidos nos indican que la entrada de Ca^{2+} inducida por la P_4 es íntimamente dependiente de STIM2, Orai1 y TRPC1.

A



B



C

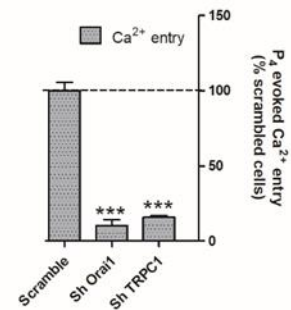
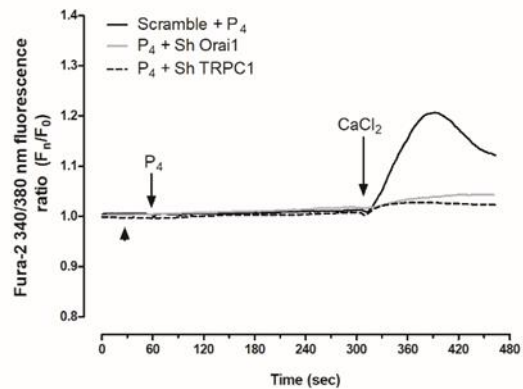
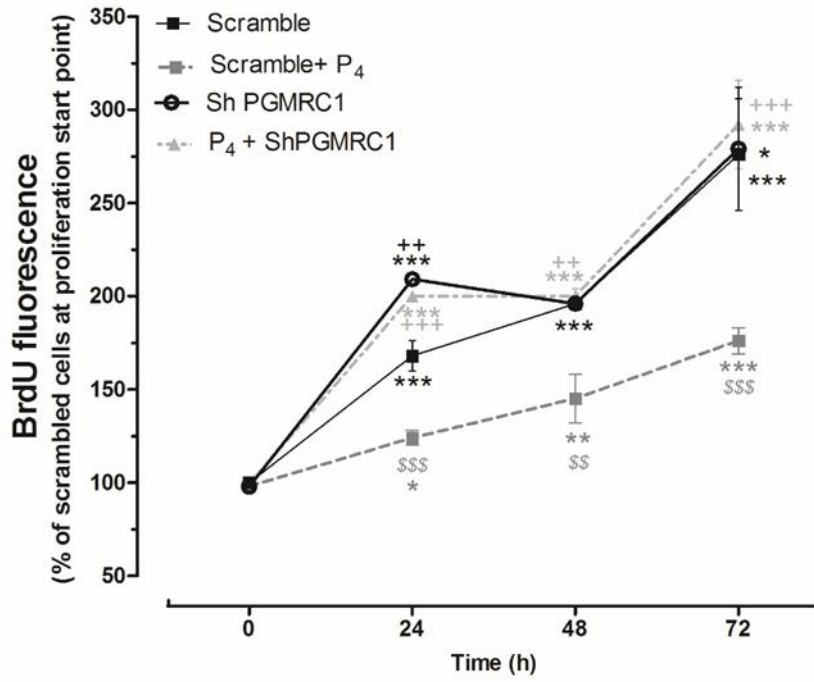


Figura 5.12. La entrada de Ca^{2+} inducida por P_4 es dependiente de *STIM2*, *Orai1* y *TRPC1* en las células MDA-MB-231. Las células MDA-MB-231 se transfectaron con 2 $\mu\text{g/mL}$ de esiARN *STIM1* (A y B; línea gris), de esiARN *STIM2* (A y B; línea gris) o de un siARN A no específico (A y B; línea negra) durante 48 h. Por otro lado, utilizamos 2 $\mu\text{g/mL}$ del plásmido de silenciamiento de *Orai1* (*shOrai1*) (C; línea sólida gris), de *TRPC1* (*shTRPC1*) (C; línea punteada negra) o bien de un vector vacío (C; células sin modificar) durante 48 h. Una vez confirmada la efectividad en los protocolos de silenciamientos de las proteínas de estudio mediante WB junto con el uso conjunto de anticuerpos específicos (A) y siguiendo la configuración imaging de células individualizadas para los experimentos de Ca^{2+} , se llevaron a cabo tal y como está indicado en el apartado correspondiente de Material y Métodos. Así, las células MDA-MB-231 cargadas con *fura-2* se sumergieron en un medio rico en Ca^{2+} (1 mM $CaCl_2$ en el medio extracelular, A) o bien se dejaron sin tratar. Alternativamente, se sumergieron en un medio HBS libre de Ca^{2+} (75 μM de EGTA se añadió, puntas de flechas (B y C)) y se estimularon con 1 μM de P_4 durante 4 min (B y C). La entrada de Ca^{2+} inducida por la P_4 (B y C) se visualizó cuando se añadió $CaCl_2$ (1 mM) al medio extracelular, monitorizándose a lo largo de 2 min. Los gráficos son representativos de 6-8 transfecciones independientes y los histogramas representan el promedio del porcentaje \pm S.E.M. resultado del análisis completo de las áreas bajo la curva producidas por la P_4 en al menos 60-80 células de 6-8 transfecciones diferentes. ***: representa $p < 0.001$ con respecto a los valores de movilización del Ca^{2+} encontrados en las células MDA-MB-231 sin modificar.

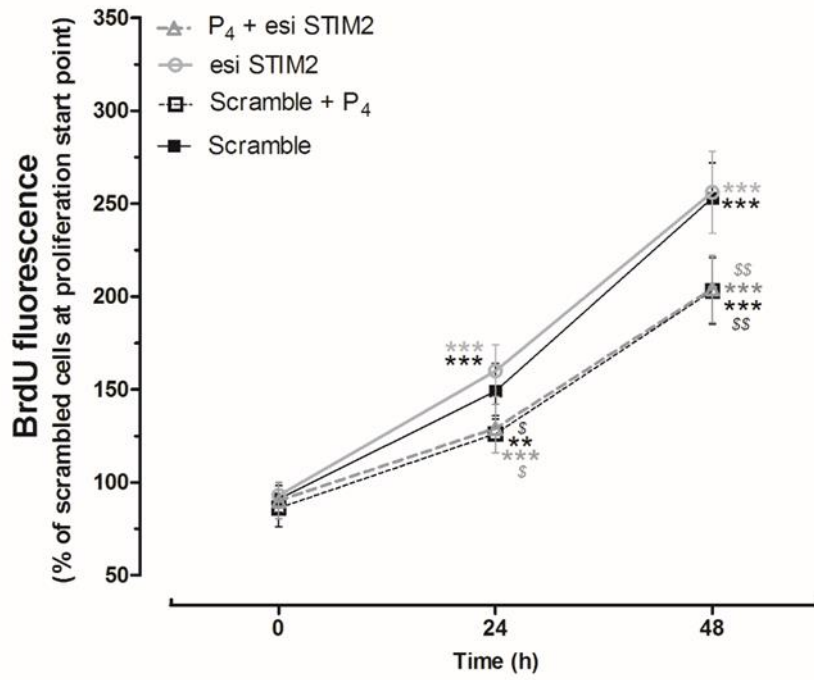
5.2.3. – El silenciamiento de la expresión de PGRMC1 revierte el efecto inhibitorio de la P_4 en la proliferación celular de las células MDA-MB-231.

En la bibliografía queda recogido el efecto positivo de la P_4 en las células que expresan el nPR clásico, como las células MCF7 o de glioblastoma (Clark *et al.*, 2016). En las células TNBC, evaluamos la función de PGRMC1 en la inhibición de la proliferación celular inducida por P_4 . Así, en la Figura 5.13A, el silenciamiento de la expresión proteica de PGRMC1 consiguió revertir el efecto de inhibición de la P_4 en la proliferación de las células MDA-MB-231, sugiriendo un efecto negativo de P_4 en la proliferación mediado por la acción de PGRMC1. Nuestros resultados indican que el silenciamiento de *STIM2* evita el efecto positivo de la entrada de Ca^{2+} en la proliferación celular medido por la P_4 y, además, complementan la idea sobre el efecto negativo de PGRMC1 mediado por P_4 en la entrada de Ca^{2+} dependiente de Ca^{2+} (véase Figura 5.13B vs 13A).

A



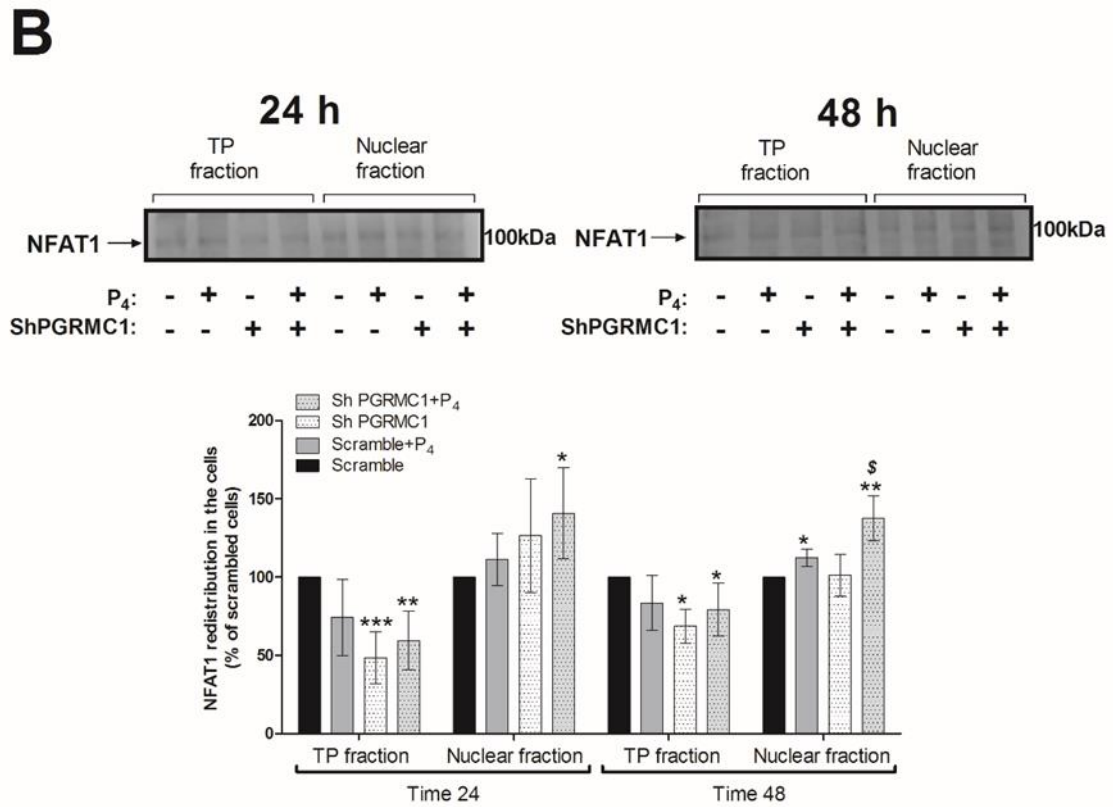
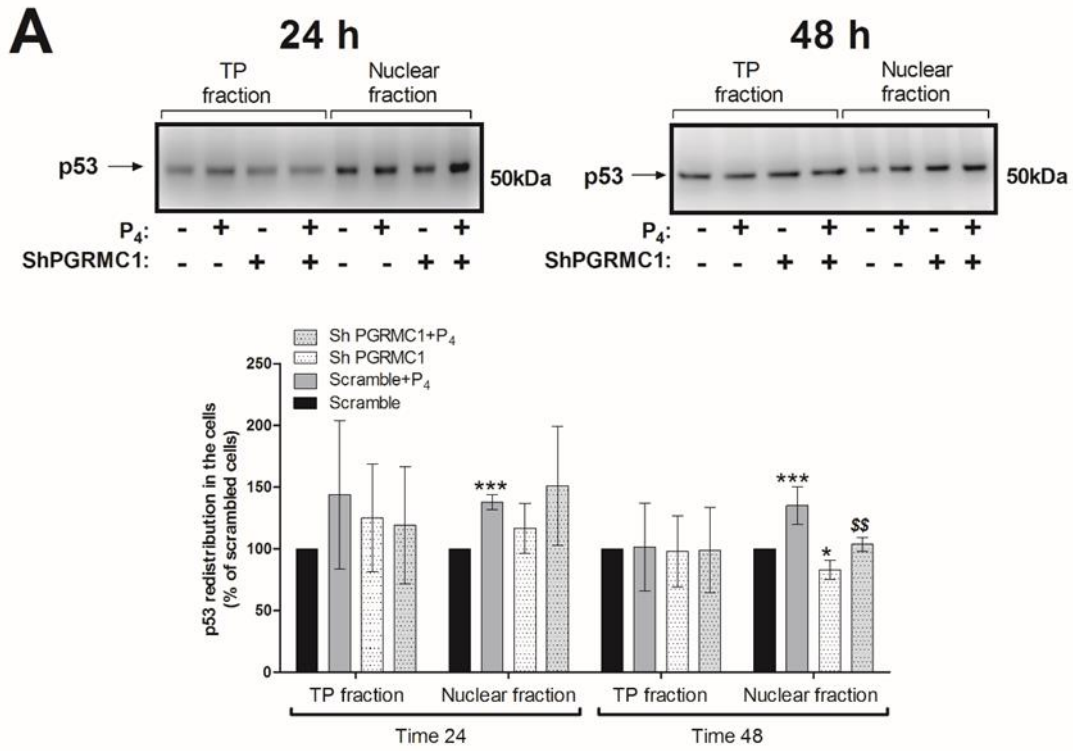
B



*Figura 5.13. Papel del PGRMC1 en la proliferación inducida por P₄ en las células MDA-MB-231. Las células MDA-MB-231 se transfectaron o con el shPGRMC1 (A) o con el vector vacío (A, no modificable) durante 48 h y, simultáneamente, otras se transfectaron con esiARN STIM2 (B) o con siARN A durante 48 h (B, no modificable). Una vez que confirmamos la eficacia del protocolo de silenciamiento, las células se cultivaron y se mantuvieron proliferando en presencia o ausencia de 1 μM de P₄. El ratio de proliferación se determinó con el análisis de la cantidad de BrdU encontrado en las células durante 2 h en los tiempos 0, 24, 48 y 72 h desde el inicio del protocolo de proliferación. El gráfico de barras representa el promedio del porcentaje ± S.E.M. de la fluorescencia de BrdU detectada en las células no modificadas al inicio del cultivo. *, **, ***: representa p < 0.05, p < 0.01 y p < 0.001 con respecto a células no modificadas en el tiempo 0 h; mientras que \$, \$\$, \$\$\$: representa p < 0.05, p < 0.01 y p < 0.001 respecto de los valores de BrdU encontrados en células sin modificar en ausencia de P₄; y +, ++, +++: representa p < 0.05, p < 0.01 y p < 0.001 con respecto de los valores encontrados en células expresando la proteína.*

5.2.4. – La P₄ modifica la localización intracelular de p53 y de NFAT1.

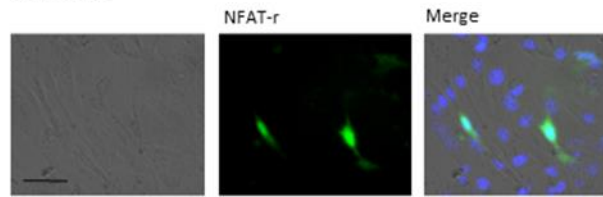
En el laboratorio analizamos el efecto de la P₄ en la activación de p53 y NFAT1, dos factores de transcripción ligados íntimamente al ciclo celular y que actúan como marcador proapoptótico y proproliferativo, respectivamente. Así, en la Figura 5.14 se recoge la incubación de las células MDA-MB-231 con 1 μM de P₄ resultando en un incremento en la localización nuclear del p53, en comparación con aquellas células que no fueron estimuladas (37 ± 6% a 24 h y 35 ± 15% a 48 h de la administración de P₄; Figura 5.14A; p < 0.01). El silenciamiento de PGRMC1 evitó la acumulación de p53 en el núcleo, registrando una reducción de 17 ± 7% y de 31 ± 6% en células incubadas durante 48 h en ausencia o presencia de P₄, con respecto a las células del control experimental (Figura 5.14A; p < 0.05 y p < 0.01, respectivamente). Es de destacar que la translocación de NFAT1 al núcleo resultó también aumentada en 37 ± 14% tras el tratamiento durante 48 h con P₄ en las células MDA-MB-231 (Figura 5.15B; p < 0.05). El silenciamiento de PGRMC1 aumentó la translocación nuclear de NFAT1 al estimarse con P₄ (40 ± 29% y 37 ± 14% a 24 h y 48 h después del tratamiento con P₄; Figura 5.14B, p < 0.05 y p < 0.001, respectivamente), que es consistente con el incremento de SOCE observado en ausencia de PGRMC1.



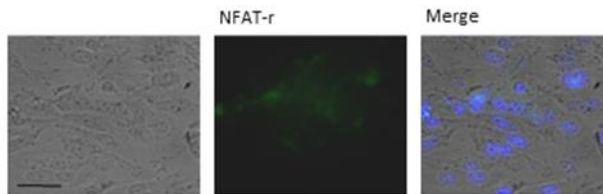
*Figura 5.14. La P₄ modifica la localización intracelular de p53 y de NFAT1 en las células MDA-MB-231. Las células MDA-MB-231 se transfectaron con un vector vacío (células sin modificar) o con el plásmido shPGRMC1 durante 48 h. Una vez que por WB se confirmó el silenciamiento en la expresión de la proteína en cuestión, las células se mantuvieron en cultivo durante 48 h más en presencia de 1 μM de P₄ o bien en ausencia de ella. Tras 24 o 48 h en crecimiento, las células se fijaron y las fracciones proteicas contenidas en el núcleo (fracción nuclear) se aislaron del resto del contenido celular (fracción TP) mediante una secuenciación de varias centrifugaciones, tal y como queda descrito en el apartado de Material y Métodos. Las muestras de proteínas extraídas de las diferentes fracciones celulares se desnaturalizaron al mezclarse con la solución Laemmli y, a continuación, se sometieron al protocolo de WB utilizando los anticuerpos específicos anti-NFAT1 o anti-p53, descritos en detalle en el Material y Métodos. Los histogramas representan el promedio del porcentaje ± S.E.M del contenido proteico de NFAT1 o p53 para cada fracción celular con respecto a los valores encontrados en células no modificadas y sin exposición a P₄. Los datos presentados han sido previamente normalizados con el anticuerpo anti-β-actina de las mismas membranas de nitrocelulosa como control interno de carga en el gel de acrilamida. *, **, *** representa p < 0.05, p < 0.01 y p < 0.001 con respecto a los valores proteicos encontrados en las células no modificadas sin estimular en los tiempos evaluados, mientras que \$, \$\$: representa p < 0.05 y p < 0.01 con respecto a las células no modificadas y estimuladas con P₄.*

Completando los resultados presentes, demostramos la relación entre la entrada de Ca²⁺ inducida por la P₄ y la activación de NFAT1 mediante el análisis de la fluorescencia emitida por el constructo YFP-NFAT1. Éste es capaz de internalizar NFAT1 en el núcleo y, por consiguiente, representa un acercamiento experimental directo y con mayor sensibilidad que los fraccionamientos nucleares y la técnica WB. El uso del constructo NFAT1 nos evita además posibles artefactos derivados de la contaminación de las fracciones nucleares con otras organelas celulares durante su procesado. Como puede observarse en la Figura 5.15, la fluorescencia del constructo de NFAT aumentó significativamente en las células donde la expresión de PGRMC1 se silenció y se estimularon durante 48 h con 1 μM de P₄, probablemente como resultado de una mayor entrada de Ca²⁺ como se muestra en la Figura 5.11 bajo estas condiciones experimentales.

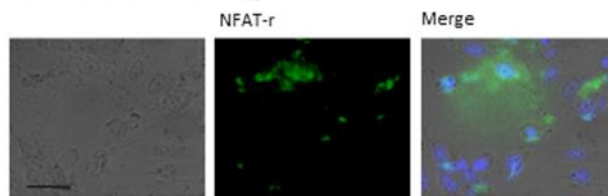
MOCK



P₄



Sh PGRMC1 + P₄



TG

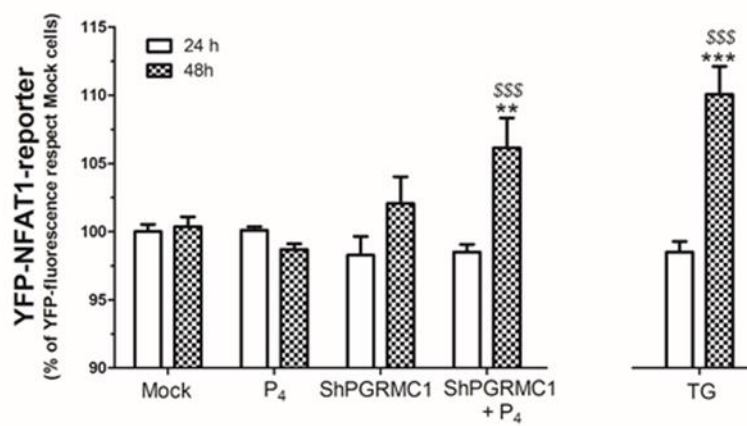
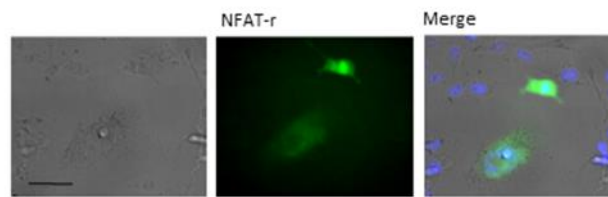


Figura 5.15. Activación de NFAT1 en la entrada de Ca^{2+} inducida por P_4 en las células MDA-MB-231. Las células MDA-MB-231 se transfectaron durante 48 h con el plásmido constructo de YFP-NFAT solo o en combinación con el plásmido shPGRMC1. La fluorescencia de NFAT1 se analizó a partir de las imágenes adquiridas de los cultivos celulares sin tratamiento o bien tras la incubación con $1 \mu M$ de P_4 durante 24 y 48 h. Las imágenes son representativas de 3 transfecciones independientes tras 48 h de incubación con la P_4 en cada conjunto experimental de células. Los histogramas representan el porcentaje \pm S.E.M. de la fluorescencia del constructo NFAT1 encontrado en 4-8 imágenes tomadas de 3 transfecciones independientes. Después se normalizó con la fluorescencia encontrada en las células sin modificar y células sin contacto con P_4 (control). **, *** representa $p < 0.01$ y $p < 0.001$ respecto a las células sin modificar ni tratadas con P_4 ; mientras que \$\$\$: representa $p < 0.001$ respecto a las células sin modificar y tratadas con P_4 . La barra representa $50 \mu m$.

5.3. El ácido araquidónico disminuye la proliferación, migración y viabilidad celular a través de mecanismos independientes a la entrada de calcio.

5.3.1. – El ácido araquidónico (AA) no induce movilización de Ca^{2+} en las células MCF10A y MDA-MB-231.

En presencia de 1 mM de Ca^{2+} extracelular, el tratamiento de las células MCF10A o MDA-MB-231 con $8 \mu M$ AA no produjo cambios significativos en la $[Ca^{2+}]_c$ (Figura 5.16A y 5.16B; $n = 6$). La adición de TG ($1 \mu M$) sí produjo un incremento en la $[Ca^{2+}]_c$, mostrándose una liberación de Ca^{2+} y posterior activación de la entrada de Ca^{2+} operada por depósito (SOCE); (Figura 5.16A y 5.16B). El AA no indujo ningún cambio en la $[Ca^{2+}]_c$ en las células MDA-MB-231 a concentraciones elevadas de 0.5 mM (Figura 5.16C). En la bibliografía existe una cierta controversia en los efectos del AA asociándose a tiempos más cortos o largos de exposición. En nuestras manos, las células MDA-MB-231 se incubaron con $8 \mu M$ of AA para después cargarse de fura-2. En ese momento se estimularon con AA ($8 \mu M$) en presencia de $CaCl_2$ extracelular (1 mM), no logrando ningún cambio significativo en la $[Ca^{2+}]_c$ (Figura 5.16D). Indagamos si el tratamiento con AA podría alterar SOCE, el mayor mecanismo de entrada de Ca^{2+} en células no excitables, cuya regulación es crucial para la proliferación de las células MDA-MB-231. Como puede observarse en las Figuras 5.16E y 5.16F, la preincubación de las células MDA-MB-231 durante 5 min o 24 h con $8 \mu M$ de AA no tuvo efecto ni sobre la liberación inducida por TG ni sobre SOCE en estas células.

Contrariamente a Orai1 y Orai2, Orai3 puede ser activado por el 2-APB mientras que SOCE permanece inhibido bajo esta misma condición. Para conocer si las células MDA-MB-231 expresan un canal Orai3 funcional, realizamos una serie de experimentos con el 2-APB. Así, como se muestra en la Figura 5.16G, la adición de $75 \mu M$ de 2-APB en las células MDA-MB-231 indujo un incremento transitorio en la $[Ca^{2+}]_c$ en presencia de $CaCl_2$ extracelular (1 mM). Este hecho nos indica la expresión del canal Orai3 funcional en las células MDA-MB-231.

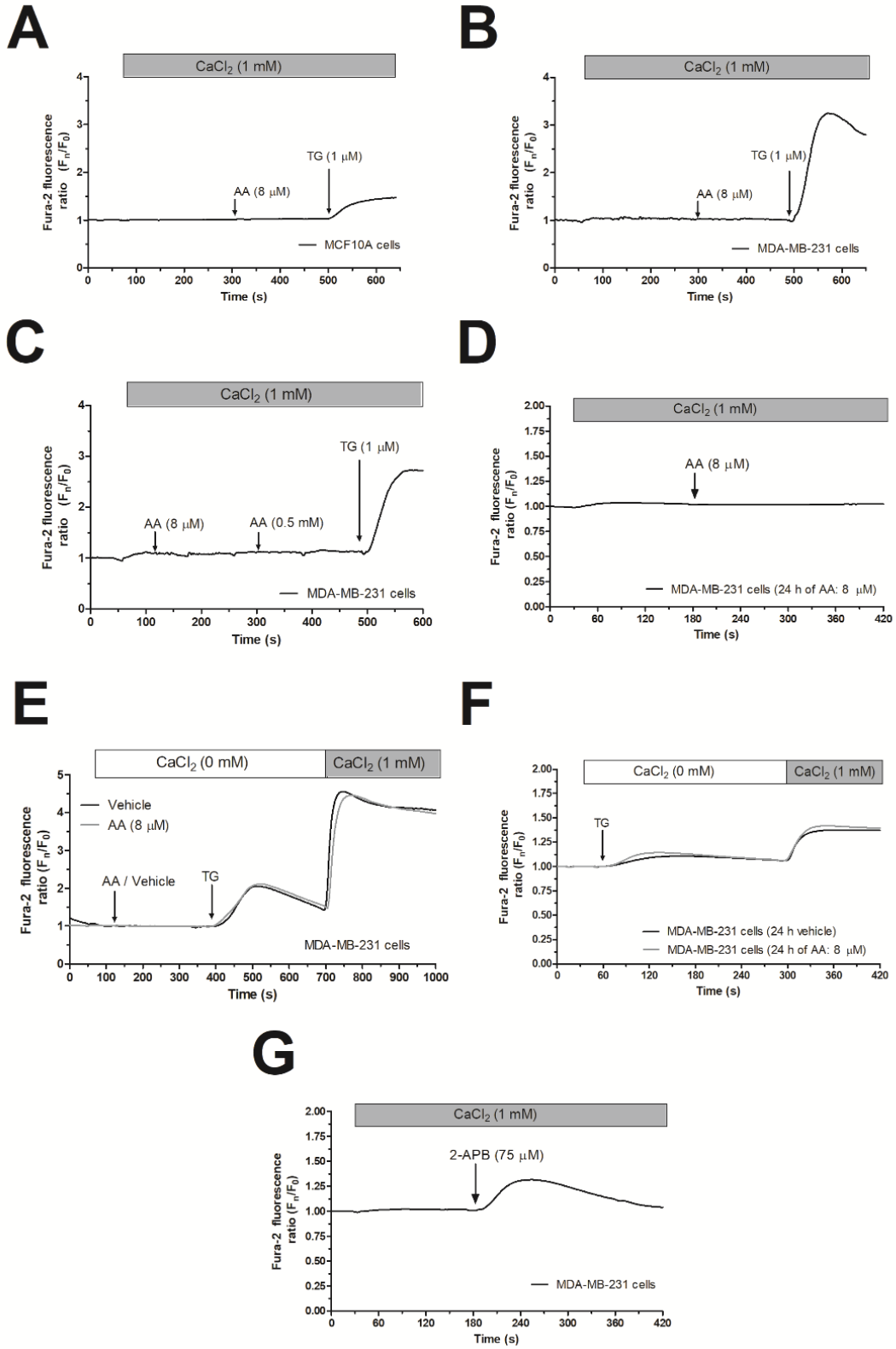


Figura 5.16. El ácido araquidónico (AA) no produce cambios en la $[Ca^{2+}]_c$ en las células MCF10A y MDA-MB-231. Las células MCF10A (A) y MDA-MB-231 (B–G) se sembraron sobre cubreobjetos y se incubaron con fura-2. Las células se mantuvieron en un medio con $50 \mu M$ de $CaCl_2$ y se excitaron alternativamente a 340 y 380 nm, recogiendo la emisión a 505 nm. (A–C) Las células se trataron con AA (8 o $500 \mu M$) o bien con TG ($1 \mu M$) en presencia de Ca^{2+} extracelular ($1 mM$). (D) Las células se mantuvieron en cultivo durante 24 h con AA ($8 \mu M$) para, seguidamente, estimularse con AA ($8 \mu M$) en presencia de $CaCl_2$ extracelular ($1 mM$). (E) Las células MDA-MB-231 se suspendieron en una solución HBS libre de Ca^{2+} ($100 \mu M$ de EGTA se añadieron) y se trataron con AA ($8 \mu M$) o con el vehículo, seguido del tratamiento con TG ($1 \mu M$) y, en los últimos 5 min, se añadió $CaCl_2$ ($1 mM$) al medio extracelular para visualizar la entrada de Ca^{2+} . (F) Las células se mantuvieron creciendo durante 24 h con AA ($8 \mu M$) y se reprodujeron las condiciones experimentales descritas en el apartado anterior. (G) Las células se trataron con el 2-APB ($75 \mu M$) en presencia de Ca^{2+} extracelular ($1 mM$). Las líneas son representativas de seis experimentos independientes.

5.3.2. – Las células MDA-MB-231 carecen de canales funcionales selectivos al Ca^{2+} regulados por el ácido araquidónico (ARC).

El AA promueve la entrada de Ca^{2+} al interactuar con el dominio N-terminal de Orai3, que junto con STIM1 y Orai1 constituyen los canales ARC. Por ello, analizamos la expresión de los diferentes componentes de los ARC en las células MDA-MB-231. Como se muestra en la Figura 5.17, las células MDA-MB-231 expresaron los tres miembros de los canales ARC, aunque la expresión de las tres proteínas varió según la línea celular de mama analizada. La expresión de Orai1 aumentó en las células MDA-MB-231 mientras que en el tipo celular luminal de cáncer de mama, MCF7, presentó alta expresión proteica de Orai1 y Orai3 y baja expresión de STIM1 comparado con MCF10A (Figura 5.17).

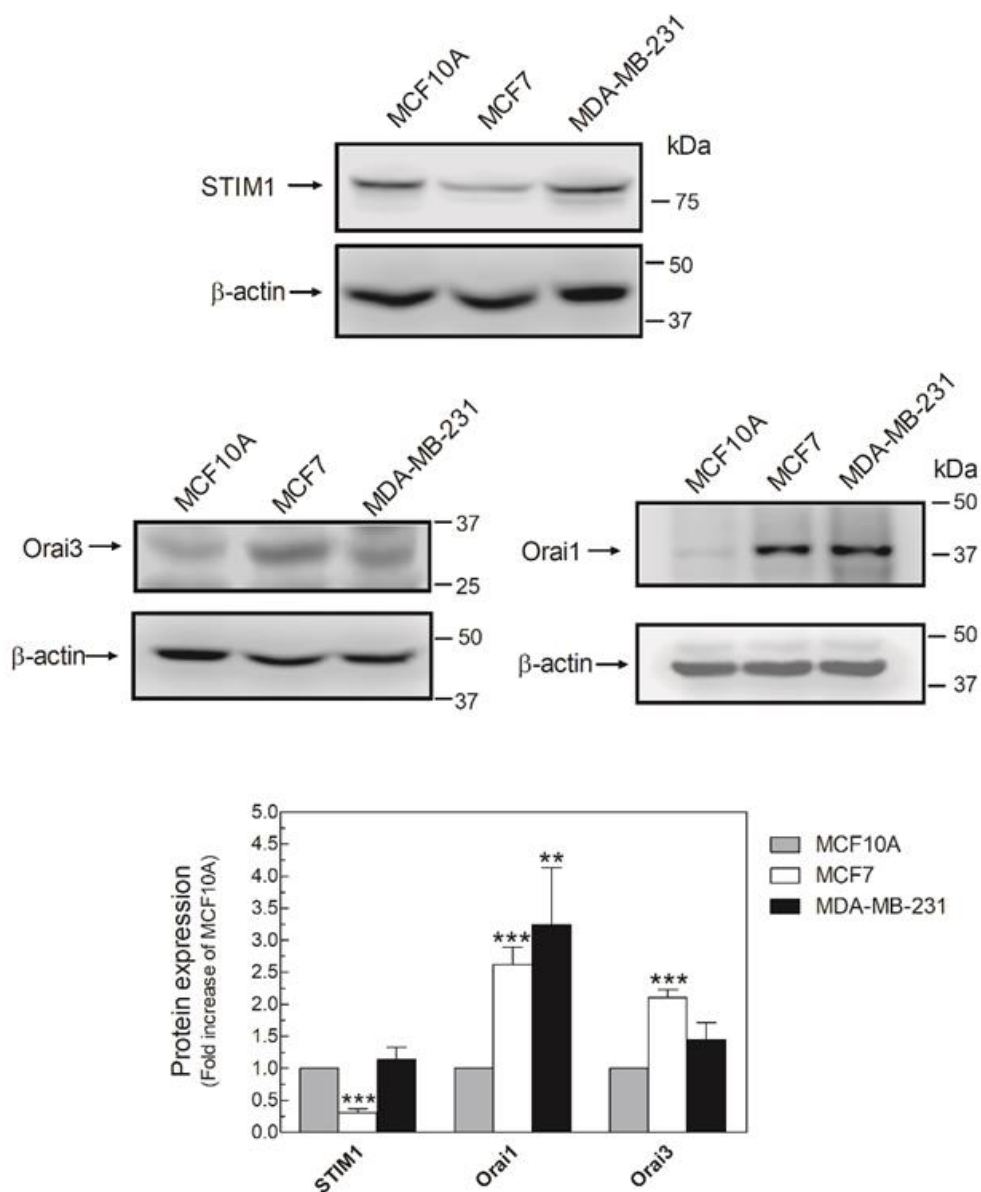


Figura 5.17. Las células MDA-MB-231 expresan los tres componentes del canal selectivo a Ca^{2+} regulado por el ácido araquidónico (ARC). Las células MCF10A, MCF7 y MDA-MB-231 se cultivaron en placas de 6 pocillos y, una vez alcanzaron una confluencia óptica (90%), se levantaron y se lisaron con una solución NP-40 para, poco después, ser desnaturalizadas al mezclarse con la solución Laemmli (LB). En la técnica WB realizada posteriormente, se utilizaron los anticuerpos anti-STIM1, anti-Orai1 y anti-Orai3 como se ha descrito en el apartado correspondiente de Material y Métodos. Las membranas de nitrocelulosa se reincubaron con el anticuerpo anti- β -actina para ser utilizado como control de carga experimental. Las imágenes son representativas de 4-6 experimentos independientes y el histograma ilustra los incrementos en la concentración de proteína encontrados con respecto a las células MCF10A. **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ mediante ANOVA y test de Tukey, respectivamente.

Complementamos los experimentos de Ca^{2+} en células MDA-MB-231 transfectadas con el vector vacío (células sin transfectar), con el plásmido de sobreexpresión GECO-Orai3 o con el constructo de GECO-Orai3 más Orai1 y STIM1 (GECO-ARC). El uso del GECO-Orai3 nos permitió monitorizar en directo la entrada de Ca^{2+} a través del canal. Como se muestra en la Figura 5.18, en las células MDA-MB-231 la entrada de Ca^{2+} inducida por el AA fue sólo observada en

las células que reconstituyeron eficientemente los canales ARC ($800 \pm 200\%$; $p < 0.001$, $n = 3$), pero no en las células sin transfectar o en aquellas transfectadas con GECO-Orai3. Estos hallazgos nos revelan que las células MDA-MB-231 carecen de canales ARC funcionales a pesar de que expresen los componentes necesarios para su formación.

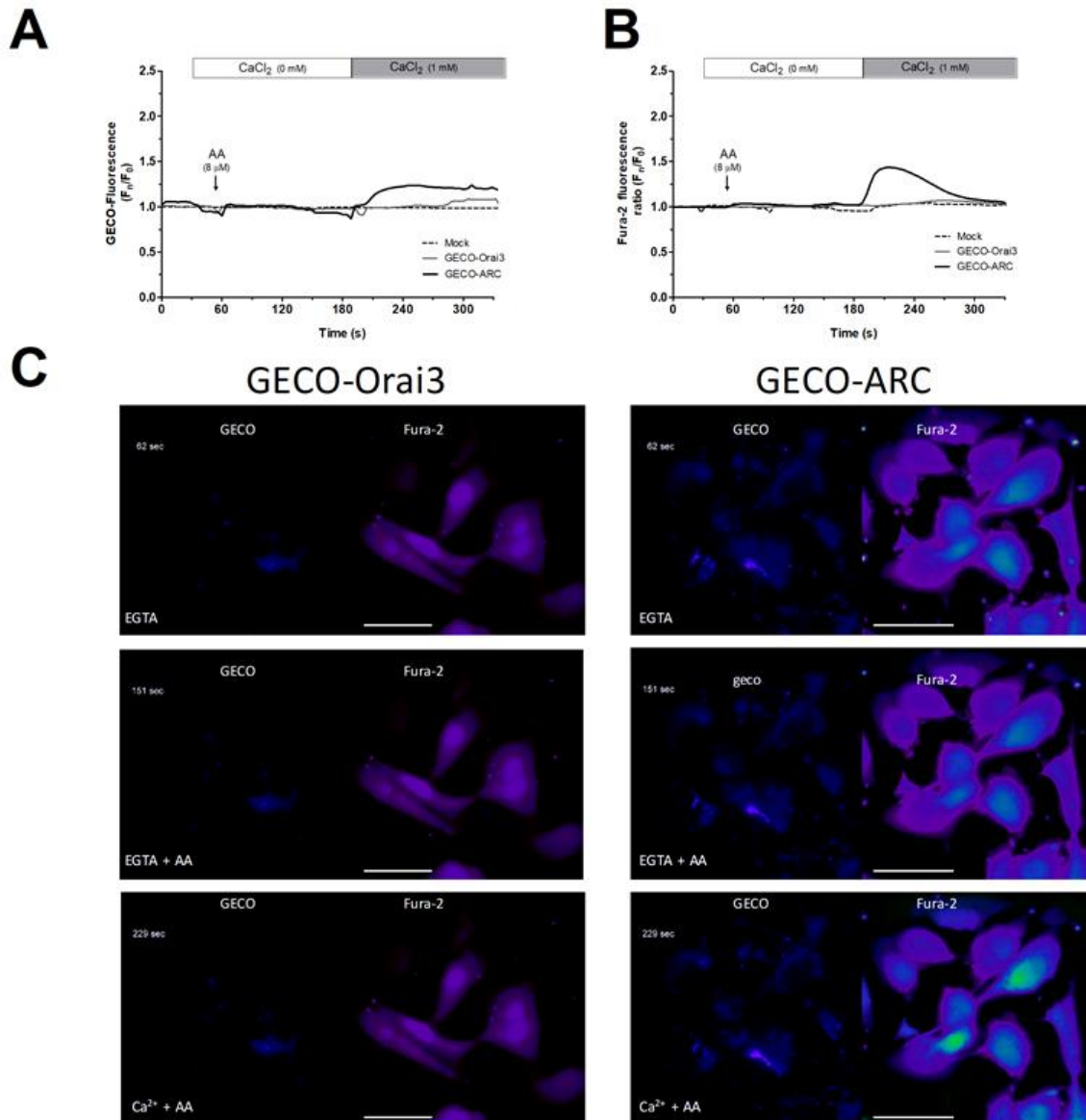


Figura 5.18. Las células MDA-MB-231 que expresan artificialmente los canales ARC presentan cambios en la $[Ca^{2+}]_c$ provocados por el AA. Las células MDA-MB-231 se transfectaron con el vector vacío (células control), con el plásmido de sobreexpresión GECO-Orai3 o bien con los plásmidos de sobreexpresión necesarios para reconstituir los canales ARC (Cherry-STIM1, Orai-CFP y GECO-Orai3; GECO-ARC). Tras confirmar el éxito de la transfección de los plásmidos mediante microscopía de epifluorescencia, las células se mantuvieron en un medio con 50 μ M de CaCl₂. Las células se excitaron alternativamente a 488 nm (GECO-Orai3; A y C) y 340/380 nm (fura-2; B y C) y la fluorescencia emitida de las muestras se adquirió a 505 nm para ambos rangos de excitación. Al inicio de los experimentos, el medio extracelular se suplementó con EGTA (100 μ M) y las muestras se incubaron a continuación durante 3 min con AA (8 μ M). Seguidamente, añadimos 1 mM de CaCl₂ al medio extracelular y monitorizamos la entrada de Ca²⁺ producida por el AA durante 2 min. Las líneas son representativas de tres experimentos independientes en los cuales 2-8 células transfectadas para cada prueba fueron analizadas. La barra equivale a 30 μ m.

5.3.3. – Efecto del AA en la proliferación celular en MDA-MB-231.

A continuación, estudiamos el efecto del AA y de Orai3 en la proliferación de las células MDA-MB-231. Como consta en la Figura 5.19A, el silenciamiento de Orai3 disminuyó la expresión de esta proteína en $35 \pm 15\%$ y $60 \pm 6\%$ tras 48 h y 96 h de la transfección, respectivamente (Figura 5.19A.1 y 5.19A.2; $p < 0.001$, $n = 6$). Cuando confirmamos la eficiencia del siOrai3, las células transfectadas con siOrai3 o con siARN A (control) y después de 48 h de la transfección celular, se mantuvieron en crecimiento otras 48 h más en ausencia o presencia de AA ($8 \mu\text{M}$). El tratamiento de las células MDA-MB-231 con AA ($8 \mu\text{M}$) no tuvo efecto en la proliferación celular durante las 24 h iniciales pero, tras 48 h, la proliferación disminuyó considerablemente con respecto a las células sin tratar ($p < 0.001$, $n = 8$). Es curioso que el silenciamiento del Orai3 *per se* no logró modificar el patrón en las células pero sí se produjo una disminución significativa en el número de células en proliferación una vez se estimularon con AA ($p < 0.001$, $n = 8$). Estos resultados sugieren que el AA ejerce un efecto negativo sobre la proliferación de las células MDA-MB-231 y el Orai3 podría mitigar los efectos con una función protectora en estas células. Por ello, especulamos si el tratamiento con AA podría alterar la expresión de los canales Orai3 o cualquier otra proteína. La expresión de Orai1, STIM1 y Orai3 permaneció inalterada después de 48 h en contacto con AA, como se muestra en la Figura 5.19C ($p > 0.05$; $n = 8$).

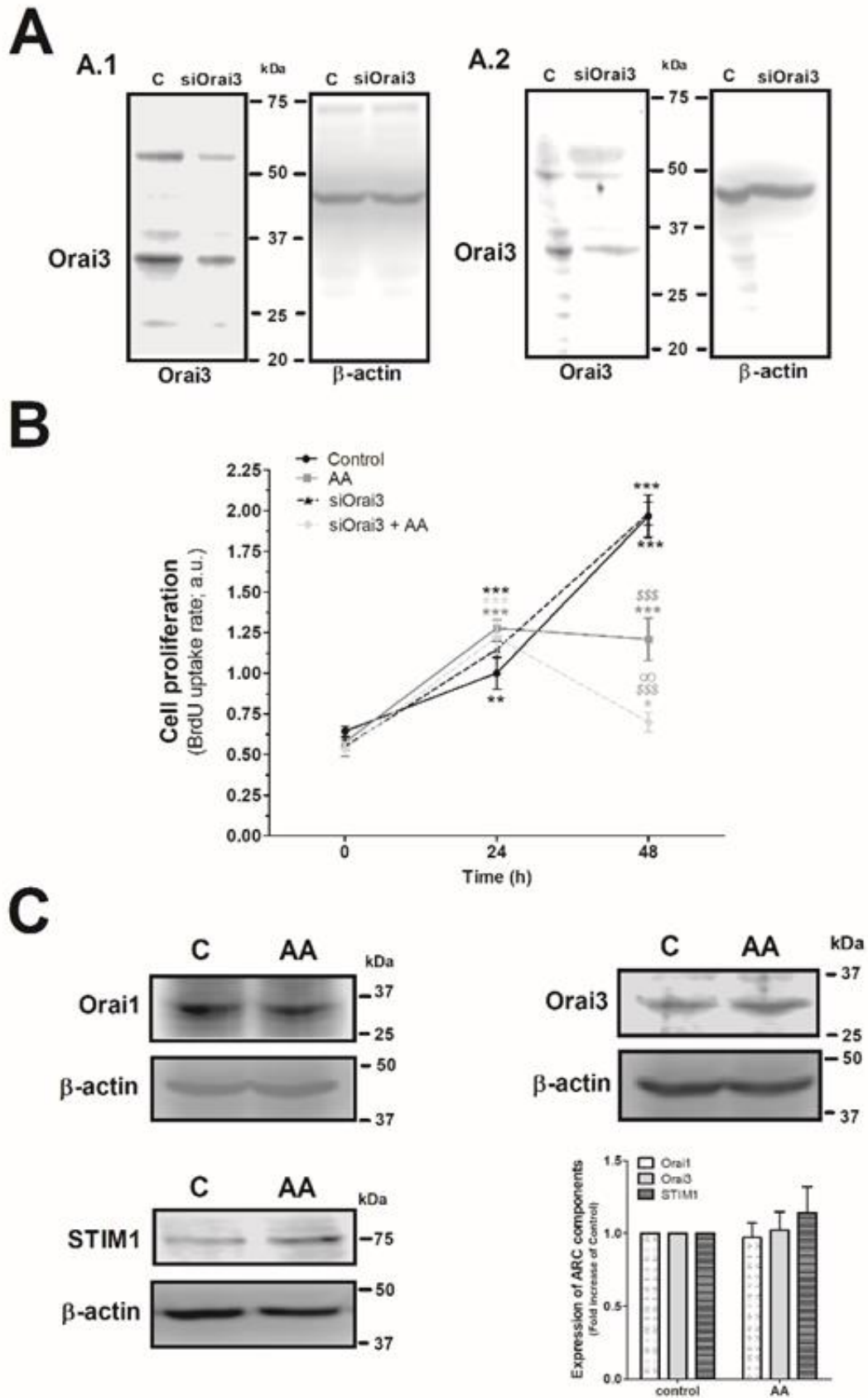


Figura 5.19. La combinación de AA y siOrai3 disminuye la proliferación celular en las MDA-MB-231. (A) Las células MDA-MB-231 se transfectaron con siARN A (control), con siOrai3 durante 48 h (A.1) o bien con siOrai3 durante 96 h (A.2). En el WB se utilizó el anticuerpo anti-Orai3 especificado en el apartado correspondiente de Material y Métodos y, seguidamente, se reincubaron las membranas de nitrocelulosa con el anticuerpo anti- β -actina para tener un control de la cantidad de proteína dispuesta en el gel. (B) Las células MDA-MB-231 se transfectaron con el siARN A (control y AA) o bien con el siOrai3 durante 48 h. Entonces un número equitativo de células se sembraron en una placa de 96 pocillos y crecieron en ausencia o presencia de AA (8 μ M). A los tiempos indicados (0, 24 y 48 h), las células se incubaron con BrdU durante 2 h. El histograma representa la media \pm S.E.M. (error estándar de la media) del valor de BrdU en ocho experimentos independientes. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, respecto del valor de BrdU encontrado en el control al tiempo 0 h. \$\$\$: $p < 0.001$, en comparación al valor de BrdU encontrado en el control a cada tiempo dado. ∞ : $p < 0.05$ con respecto al valor de BrdU de las células no modificadas genéticamente pero tratadas con AA. Fueron analizadas con pruebas ANOVA y Dunnett. (C) Las células MDA-MB-231 se mantuvieron en cultivo durante 48 h con presencia o ausencia de AA (8 μ M), para poco después ser lisadas. Una vez que las proteínas en la muestras se normalizaron, en el WB se utilizaron los anticuerpos anti-STIM1, anti-Orai1 y anti-Orai3, descritos en el apartado de Material y Métodos. El gráfico de barras representa el incremento \pm S.E.M. de la expresión de proteína respecto al control de células sin AA, el cual no mostró significación al ser analizados con las pruebas ANOVA y de Tukey.

5.3.4. – El AA inhibe la migración celular en MDA-MB-231.

Exploramos el efecto del AA en la migración celular. Las células MDA-MB-231 se transfectaron con siARN A o bien con siOrai3, y la migración celular se monitorizó a las 24 y 48 h. Como queda ilustrado en la Figura 5.20, el silenciamiento de Orai3 *per se* no afectó a la capacidad de las células MDA-MB-231 de migrar, mostrando la falta de funcionalidad de Orai3 en el proceso de migración. Por el contrario, el tratamiento con AA (8 μ M) redujo sustancialmente la migración en las células con el plásmido vacío (siARN A) y con el plásmido siOrai3 en los tiempos evaluados (24–48 h), sugiriendo que el AA disminuye la migración en las células MDA-MB-231. Como hemos comentado con anterioridad, el efecto del AA se aumentó en aquellas células que además fueron transfectadas con siOrai3, lo que sugiere un posible papel protector de Orai3 al atenuar los efectos del AA en estas células.

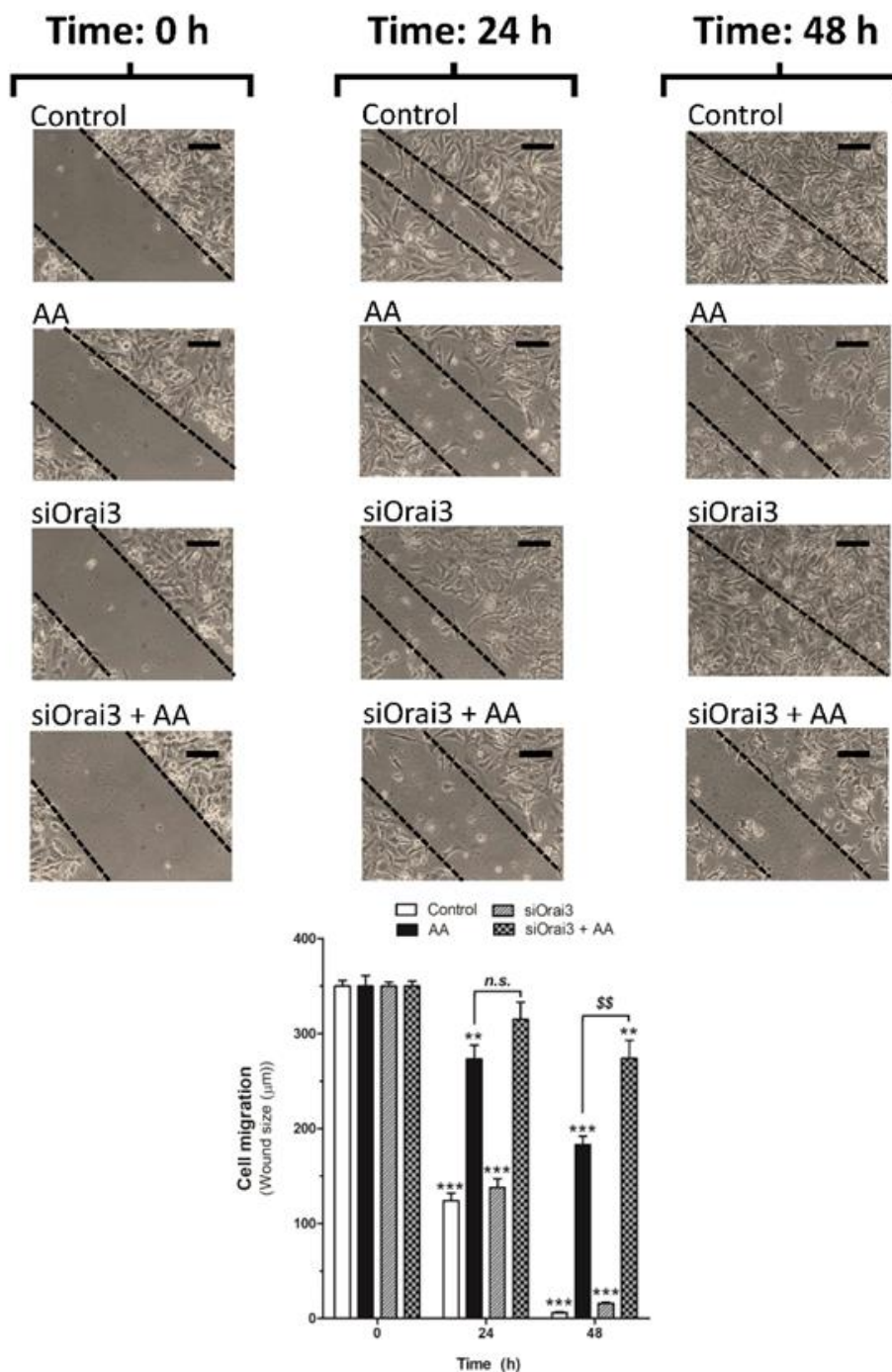


Figura 5.20. Bajas concentraciones de AA reducen la migración celular en MDA-MB-231. Las células MDA-MB-231 se transfectaron con siARN A (control y AA) o con siOrai3 durante 48 h. Se realizó una raya sobre la monocapa de células en el tiempo 0 h y se monitorizó la migración de las mismas durante las 48 h siguientes en presencia o ausencia de AA (8 µM). Las imágenes de los cultivos celulares se tomaron a los tiempos 0, 24 y 48 h por medio de microscopía óptica y objetivo 10×. La barra equivale a 100 µm. El gráfico de barras representa la media ± S.E.M del tamaño de la herida expresado en µm. Las imágenes son representativas de 8-12 imágenes tomadas de cada condición experimental obtenidas, a su vez, de tres experimentos independientes. **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, con respecto al tamaño de la herida en las células controles en el tiempo 0 h. \$\$: $p < 0.01$, con respecto a las células no modificadas genéticamente pero tratadas con AA. El análisis estadístico se basó en las pruebas ANOVA y Dunnett.

5.3.5. – El AA disminuye la viabilidad celular en MDA-MB-231.

A continuación, evaluamos el efecto del AA en la viabilidad celular, proceso posiblemente responsable de parte de la disminución observada en los ratios de proliferación y migración de las células MDA-MB-231. Las células MCF10A (Figura 5.21) y MDA-MB-231 (Figura 5.22) crecieron en ausencia y presencia de AA ($8 \mu\text{M}$) y, en los tiempos indicados, la viabilidad celular se determinó como se ha descrito en el apartado correspondiente de Material y Métodos.

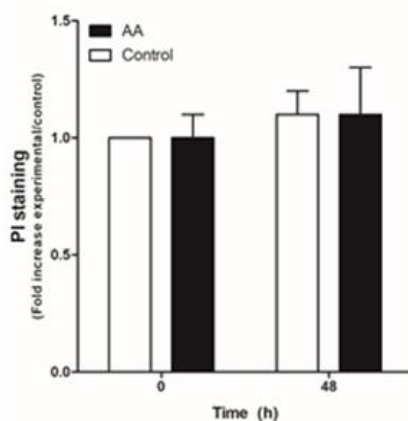
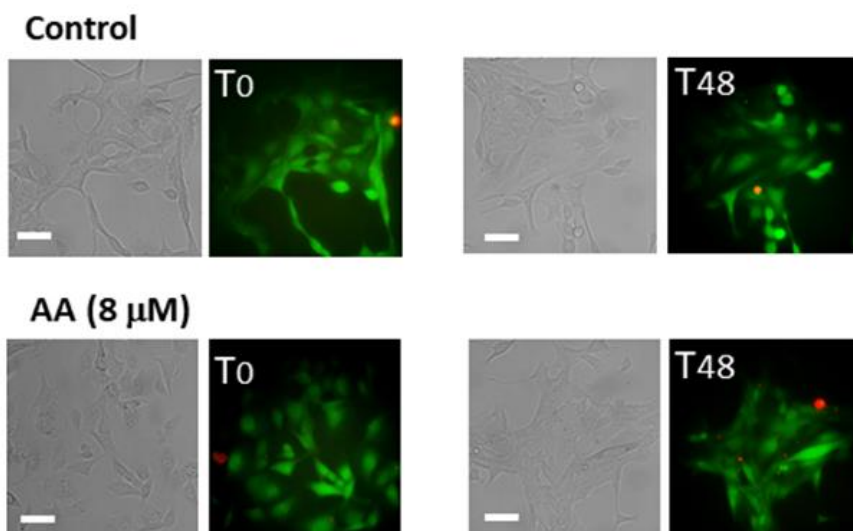


Figura 5.21. El AA no altera la viabilidad en MCF10A. Las células MCF10A se cultivaron en placa de 6 pocillos y se mantuvieron en crecimiento en condiciones controladas durante 48 h en presencia del vehículo (control) o de $8 \mu\text{M}$ de AA. En los tiempos indicados, las células se incubaron durante 45 min con calceína-AM y PI (30 min). Las imágenes de las células se tomaron a 0 y 48 h gracias a un microscopio invertido de epifluorescencia con el objetivo $40\times$ de aceite de inmersión. La barra equivale a $30 \mu\text{m}$. El gráfico de barras representa la media \pm S.E.M del incremento de la fluorescencia del PI con respecto a las células controles en el tiempo 0 h. Las imágenes son representativas de ocho campos distintos en tres experimentos independientes. Se analizaron con pruebas ANOVA y de Tukey, con significación de $p > 0.05$.

Como queda expuesto en la Figura 5.21, el AA no alteró la viabilidad celular de las células MCF10A ($p > 0.05$, $n = 8$). No obstante, el AA incrementó significativamente el número de células MDA-MB-231 positivas al PI tras 48 h de tratamiento (Figura 5.22; $p < 0.01$, $n = 8$). Además, el silenciamiento de Orai3 *per se* disminuyó la viabilidad de las células MDA-MB-231 desde el inicio del experimento. En presencia del AA durante 48 h, el silenciamiento del Orai3 aumentó el efecto del AA en la viabilidad celular en las células MDA-MB-231 (Figura 5.22; $p < 0.01$, $n = 8$), sugiriendo que Orai3 ejerce un efecto positivo sobre las células MDA-MB-231.

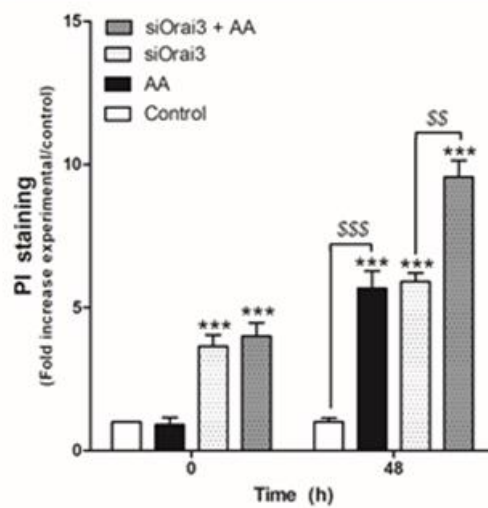
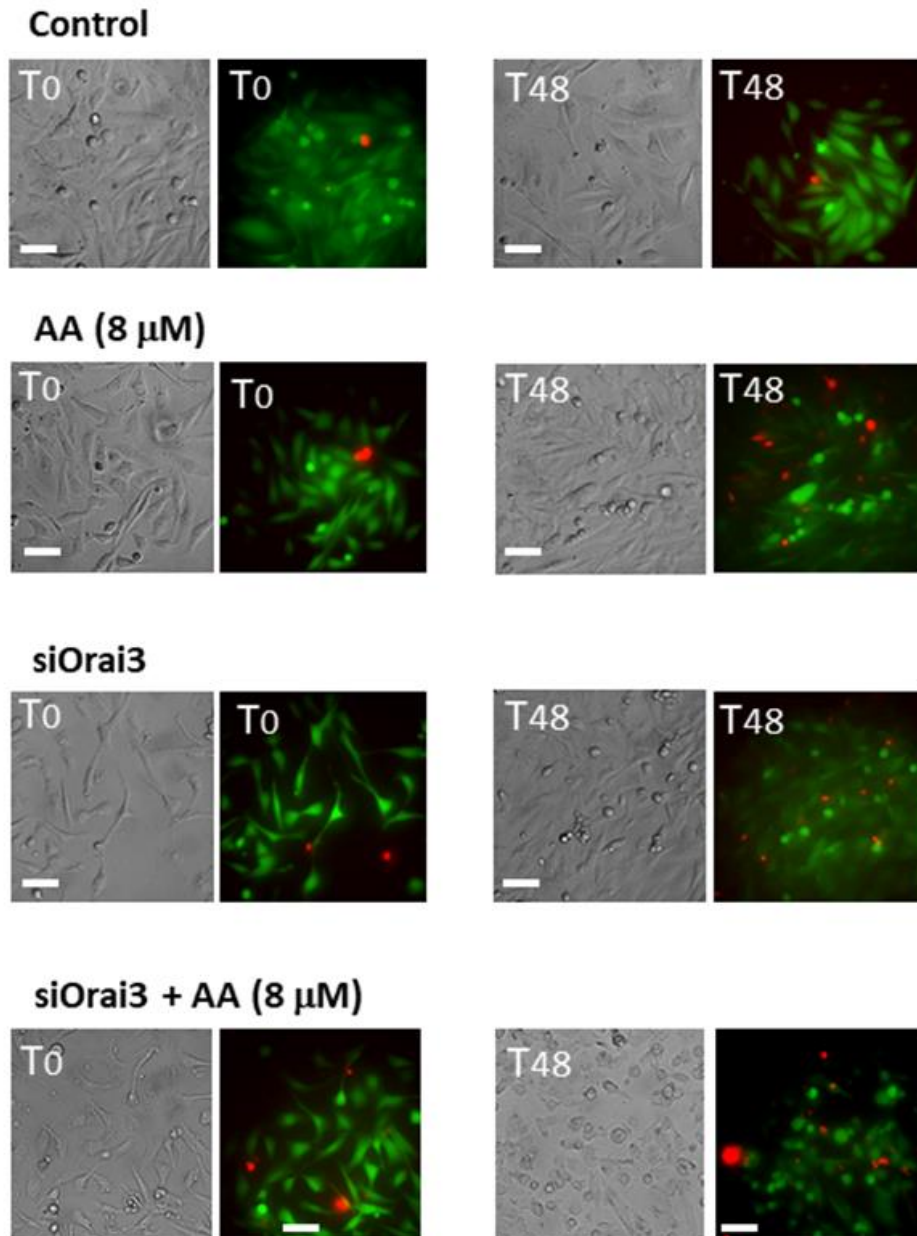


Figura 5.22. El AA induce muerte celular en MDA-MB-231. Las células MDA-MB-231 se transfectaron con siARN A o siOrai3 durante 48 h. Se mantuvieron en crecimiento en una placa de 6 pocillos durante 48 h en presencia del vehículo (control) o de 8 μ M de AA. En los tiempos indicados, el medio extracelular se suplementó con calceína-AM (45 min) y PI (30 min). Las imágenes se tomaron en los tiempos 0 y 48 h con un microscopio invertido de epifluorescencia con objetivo 40 \times de aceite de inmersión. La barra equivale a 30 μ m. El gráfico de barras representa la media \pm S.E.M. del incremento de la fluorescencia del PI con respecto a las células controles en el tiempo 0 h. Las imágenes son representativa de ocho campos diferentes provenientes de tres experimentos independientes. ***: $p < 0.001$ con respecto a los valores de fluorescencia del PI en las células controles para cada tiempo dado. \$\$: $p < 0.01$, \$\$\$: $p < 0.001$ con respecto a los valores de fluorescencia del PI en las células no tratadas con AA. Se realizó un estudio con pruebas ANOVA y de Tukey con diferencias significativas de $p > 0.05$.

5.3.6. – El AA induce la despolarización de la membrana mitocondrial y la activación de caspasas.

La muerte celular puede desencadenarse a partir de diferentes mecanismos incluyendo la apoptosis. Exploramos si la administración del AA en las células MDA-MB-231 podría desembocar en la activación de la apoptosis celular dependiente de la mitocondria. Las células MDA-MB-231 crecieron en presencia de AA durante 48 h y, en los tiempos indicados (0, 24, 48 h), se incubaron con JC-1, monitorizando el potencial de membrana mitocondrial como se describe en el Material y Métodos. La Figura 5.23 muestra el análisis de los cambios del ratio entre JC-1 agregados/monómeros en el tratamiento durante 24-48 h con AA que conduce a la despolarización del potencial mitocondrial ($p < 0.001$, $n = 12$).

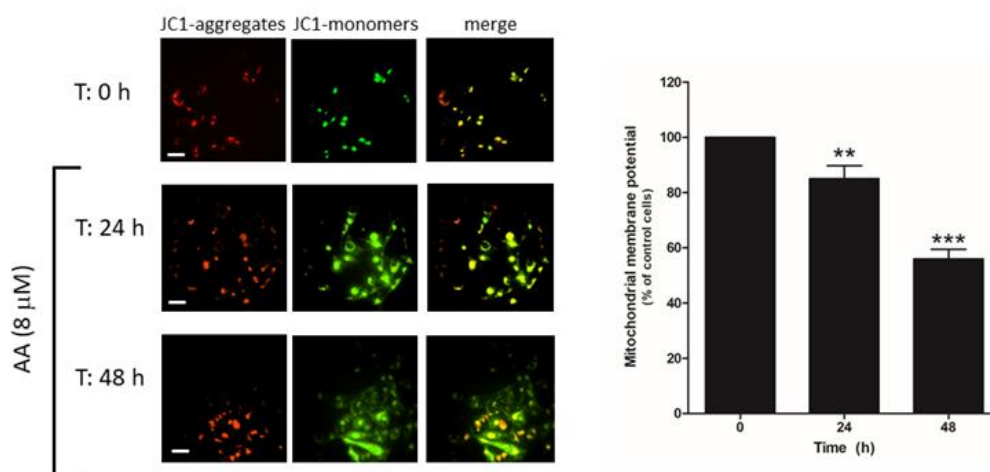


Figura 5.23. El AA altera el potencial de membrana mitocondrial de las células MDA-MB-231. Las células MDA-MB-231 crecieron en una placa de 6 pocillos durante 48 h en presencia de AA (8 μ M). En los tiempos indicados (0, 24 y 48 h), las células se incubaron con 2 μ M de JC-1 durante 30 min. Tras la incubación, las imágenes de las células se obtuvieron excitándolas a 488 nm y la fluorescencia emitida se registró alternativamente a 530 y 580 nm. La barra equivale a 30 μ m. Los porcentajes \pm S.E.M del ratio de fluorescencia de JC-1 (JC-1 agregados: rojo, 580 nm)/(JC-1 monómero: verde, 530 nm) en los diferentes tiempos evaluados están representados en los gráficos de barras. Las imágenes representan cuatro campos celulares de tres experimentos independientes. **: $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ con respecto al porcentaje del ratio JC-1 encontrado en las células a tiempo 0 h. Se usaron pruebas ANOVA y de Tukey con diferencias de $p < 0.05$.

Una vez confirmada la alteración del potencial de membrana mitocondrial inducido por el AA en la línea celular MDA-MB-231, evaluamos la posible activación de las caspasas usando sustratos fluorogénicos específicos. En la Figura 5.24, las células MDA-MB-231 se estimuladas durante 48 h con AA (8 μ M) mostraron un incremento significativo en la actividad de la caspasa-3 en comparación a la presente en las células sin tratar ($p < 0.001$, $n = 8$). La activación de la caspasa-3 por parte del AA fue mayor que la observada en la misma línea celular tras 24 h de incubación con TG (Figura 5.24; $p < 0.05$, $n = 4$). También el AA produjo una activación significativa de las caspasas-8 y -9; (Figura 5.24; $p < 0.001$, $n = 8$).

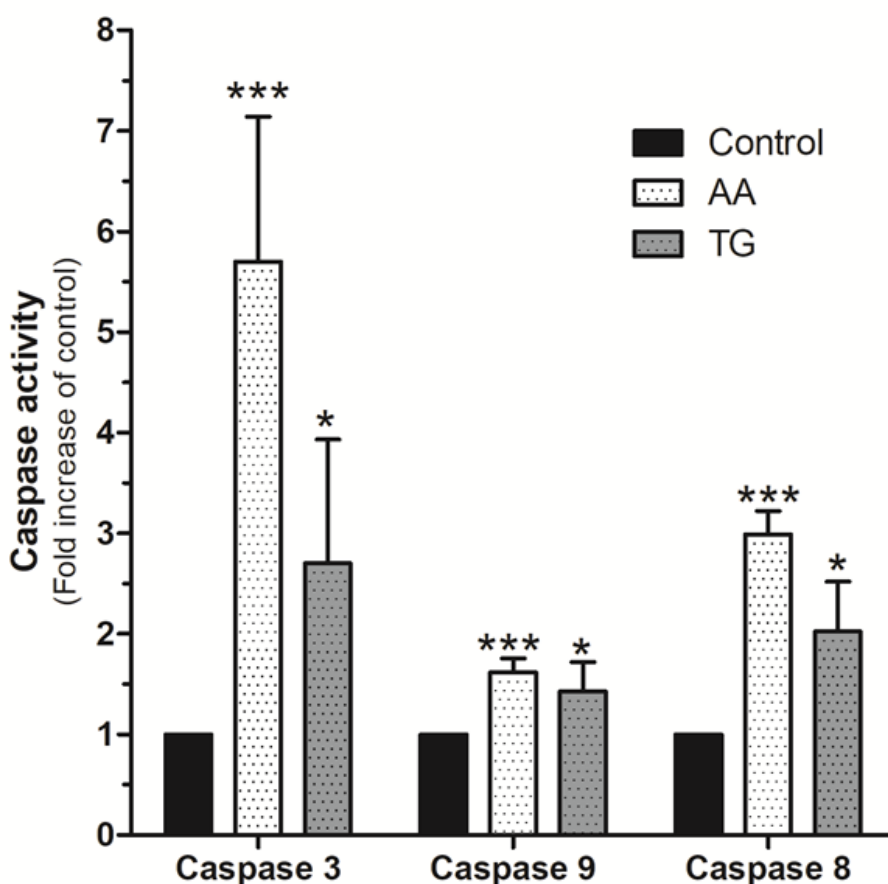


Figura 5.24. El AA activa las caspasas-3, -8 y -9 en células MDA-MB-231. Las células MDA-MB-231 se cultivaron durante 48 h, como está indicado, en presencia del vehículo, de 8 μ M de AA o bien de 1 μ M de TG durante 24 h. Las células se lisaron en el tiempo 0 h, 24 h o a las 48 h con una solución NP40 a 4 °C. Las muestras de células se incubaron con los diferentes sustratos fluorogénicos de caspasas. La fluorescencia derivada de la activación de cada una de las caspasas se monitorizó mediante un espectrofluorímetro y usando las siguientes longitudes de ondas: 400/505 nm (Ex/Em) o 360/400 nm (Ex/Em), dependiendo si los sustratos de las caspasas utilizados fueron aminometil-coumarin (AMC) o amino-trifluorometil coumarin (AFC), respectivamente. El gráfico de barras representa los cambios en el porcentaje \pm S.E.M. de la fluorescencia emitida por cada sustrato de la caspasa (a.u.) con respecto de las células controles considerando ocho experimentos independientes. *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$ con respecto a los valores hallados en las células control. Se utilizaron las pruebas ANOVA y de Tukey, con significación de $p < 0.05$.



DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN.

El cáncer de mama está presente en nuestra sociedad con una de las prevalencias más elevadas de entre todos los cánceres existentes (Siegel, Naishadham and Jemal, 2013), siendo la principal causa de muerte en mujeres de todo el mundo diagnosticadas de cáncer (Polyak and Metzger Filho, 2012). La comunidad científica coincide en que la transición de células sanas a células cancerígenas conlleva una serie de cambios intrínsecos de malignidad implícitos en los distintos procesos del cáncer, incluyendo pérdida de control de la proliferación, migración, invasión y/o metástasis (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011). Específicamente, en las células de cáncer de mama, la regulación de la $[Ca^{2+}]_c$ ejerce un papel fundamental a lo largo del desarrollo de la patología (Cross *et al.*, 2014). Tanto es así que la correlación existente entre las distintas proteínas responsables del transporte de Ca^{2+} y los pacientes diagnosticados puede ser decisiva en su supervivencia y éxito de tratamiento (McAndrew *et al.*, 2011; Azimi, Roberts-Thomson and Monteith, 2014; Peters *et al.*, 2016). Entendiendo el cáncer como una enfermedad multifactorial, es impensable justificar esta patología a partir de procesos de desregulación del ion Ca^{2+} . No obstante, aportar información hasta ahora desconocida acerca de su regulación y presentar nuevas herramientas y vías de control de su homeostasis es crucial para un mayor entendimiento del cáncer y optimización de los recursos.

El principal mecanismo de entrada de Ca^{2+} extracelular en células no excitables es la ECC, modulada por las familias de proteínas STIM, Orai y TRPC. Existe, además, una gran variedad de canales de Ca^{2+} expresados en las distintas líneas celulares de cáncer de mama y tejido tumoral, como son Orai1, Orai3, TRPC6, TRPV6 y TRPM8, entre otros (Bolanz, Hediger and Landowski, 2008; Chodon *et al.*, 2010; Faouzi *et al.*, 2011; McAndrew *et al.*, 2011). Esta ECC da como resultado una movilización de Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares seguida de una activación posterior de entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática, proceso denominado SOCE. Estudios, cada vez más numerosos, han demostrado como SOCE, entendido como todos los componentes que lo integran, regula una plétora de procesos cancerígenos y son varios los autores que han contribuido a este conocimiento en el cáncer de mama (Soboloff *et al.*, 2012; Prevarskaya *et al.*, 2014; Fiorio Pla, Kondratska and Prevarskaya, 2016). SOCE también se ha asociado directamente con el metabolismo de las células de cáncer de mama a través de MCU (Tang *et al.*, 2015). En los subtipos de cáncer de peor pronóstico y más agresivos se ha descrito un aumento de la ECC, ocasionado por una mayor expresión de STIM1/STIM2 o de los canales capacitativos (McAndrew *et al.*, 2011). Se podría decir que Orai1 y STIM1 en muestras de tejido tumoral se hallan sobreexpresados en comparación con tejidos pre- o no cancerígenos de pacientes (So *et al.*, 2019). Orai3, por otro lado, está altamente presente, tanto en ARNm como a nivel proteico, en muestras clínicas humanas y líneas celulares de cáncer de mama ER+ (Motiani, Abdullaev and

Trebak, 2010; Faouzi *et al.*, 2011; Chalmers and Monteith, 2018; Jardin, Diez-Bello, *et al.*, 2018). En general, los canales Orai son uno de los más estudiados tanto en líneas ER+ como en líneas TNBC (McAndrew *et al.*, 2011; Jardin, Diez-Bello, *et al.*, 2018). En relación con STIM1, la expresión de esta proteína no se mantiene constante entre las distintas líneas estudiadas (Motiani, Abdullaev and Trebak, 2010). Es más, si se compara con STIM2, STIM1 está de 2 a 5 veces más presente en las células de cáncer de mama a excepción del subtipo HER+ SK-BR-3, en el cual la expresión de STIM2 es 10 veces superior a la de STIM1 (McAndrew *et al.*, 2011). Además de Orai y de STIM, otras isoformas de la gran familia TRP (TRPC3, TRPM7, TRPM8 y TRPV6) se han correlacionado con la progresión de cáncer de mama (Chen *et al.*, 2014). Análisis complementarios del perfil génico de expresión de TRPC1 han demostrado que esta proteína se encuentra moderadamente sobre-regulada en la línea TNBC MDA-MB-231 con respecto a las tumorales (Azimi *et al.*, 2017) aunque su expresión a nivel proteico es muy baja (Jardin, Diez-Bello, *et al.*, 2018). Más recientemente, estudios de nuestro equipo de investigación han descrito que la isoforma TRPC6 está sobreexpresada en dos subtipos diferentes de mama (ER+ y TNBC) (Jardin, Diez-Bello, *et al.*, 2018).

Por todo ello y conscientes de la irrupción de nuevas variantes de los componentes de la ECC, tales como las variantes de Orai1, Orai1 α y Orai1 β , o las variantes de STIM2, STIM2.1, STIM2.2 y STIM2.3, y de nuevas proteínas reguladoras de la ECC (SARAF, EFHB, filamina A o STIMATE) y teniendo en cuenta, a la vez, que urge la necesidad de aunar el conocimiento actual sobre cómo estos componentes modulan las distintas funciones de las células de cáncer de mama, desarrollamos la presente tesis doctoral, sustentada en los resultados expuestos anteriormente.

En el primero de los trabajos presentados, **“El NO1, nuevo ligando fluorescente del Sigma2 Receptor/TMEM97, disminuye SOCE y promueve la apoptosis en las líneas celulares de cáncer de mama triple negativas”**, tuvimos la oportunidad de caracterizar el papel del NO1 como ligando de última generación del receptor σ_2 /TMEM97. En los modelos TNBC estudiados (MDA-MB-231 y MDA-MB-468), el NO1 tuvo un efecto antiproliferativo y antimigratorio a través de la activación de mecanismos de apoptosis celular, ocasionados por una disminución en la ECC. Así, inicialmente evaluamos la presencia de σ_2 R/TMEM97 en una línea TNBC a nivel proteico empleando técnicas de Western blotting y microscopía de fluorescencia, coincidiendo con las sobreexpresiones encontradas en otros tipos de cánceres e, incluso, en muestras de pacientes con cáncer de mama (Wheeler *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2012; Makvandi *et al.*, 2015). A continuación, la administración de dosis bajas de NO1 redujo la proliferación y migración en nuestros experimentos, como se recoge en la bibliografía (Sengupta *et al.*, 2015; Garg *et al.*, 2016; Olivieri *et al.*, 2016; Pati, Hornick, *et al.*, 2017). La causa subyacente a estos procesos se encontró vía apoptosis dependiente de mitocondria a través de la activación de la caspasa-9. Esta apoptosis fue mayor que la encontrada con altas dosis del antineoplásico cisplatino bajo las mismas

condiciones. Esta ruta, además, es común a la encontrada con otros ligandos (WC-26, SV119 y RHM-138) y en otra línea tumoral (MDA-MB-435) (Zeng *et al.*, 2007) pero única al no activarse otras vías como la de la autofagia (Zeng *et al.*, 2007). La activación apoptótica dependiente de caspasa-9 podría atribuirse la reducción en la concentración de ATP dentro de la mitocondria, interfiriendo en su capacidad funcional (Cassano *et al.*, 2009). Como ya se ha comentado con anterioridad en la revisión, la conexión entre la ECC y la mitocondria está más que descrita en la literatura. Aunque no pudimos discernir la localización en la mitocondria de $\sigma 2R/TMEM97$ mediante experimentos de confocalidad, nuestros estudios sobre la regulación de la movilización del Ca^{2+} intracelular muestran un efecto inhibitorio de NO1 sobre la ECC mediada por la inhibición de la interacción STIM1/Orai1. El efecto regulador de $\sigma 2R/TMEM97$ ha sido propuesto por otros autores utilizando diferentes ligandos, no obstante, al estudiar las propiedades farmacológicas de los mismos ligandos utilizados no pudieron asegurar la no activación simultánea de $\sigma 1R$ (Vilner and Bowen, 2000). Por tanto, nuestra hipótesis versa sobre la activación de la ECC a través de $\sigma 2R/TMEM97$ en dos vías, vía interacción/activación de STIM1 y aumentando el rendimiento en la mitocondria. El NO1 impediría el papel de $\sigma 2R/TMEM97$ en la ECC y desencadenaría la muerte en células MDA-MB-231. En apoyo de esta hipótesis, experimentos en la línea híbrida NG115-401L, eminentemente carente de expresión STIM1, demostraron que el NO1 no consiguió inducir la muerte celular en ningún caso, hasta que fue expresado STIM1 en la misma línea, reforzando una vez más la relevancia del eje STIM1- $\sigma 2R/TMEM97$. En resumen, el ligando del $\sigma 2R/TMEM97$ tiene un efecto anti-proliferativo y anti-migratorio en las líneas TNBC MDA-MB-231 y MDA-MB-468 a través de su acción sobre la ECC. El efecto inhibitorio sobre la ECC se llevó a cabo impidiendo la interacción STIM1/Orai1 probablemente por disociación del complejo STIM1- $\sigma 2R/TMEM97$, lo cual produce la activación de la apoptosis celular por la vía mitocondrial.

El receptor $\sigma 2/TMEM97$ se describió en la literatura científica como el único miembro de una nueva familia emparentada y a su vez diferenciada de $\sigma 1R$. Aunque en sus inicios fue considerado como PGRMC1 y hay autores que aún lo mantienen (Xu *et al.*, 2011; Bali *et al.*, 2013), las evidencias experimentales más recientes demuestran que se tratan de diferentes estructuras (Abate *et al.*, 2015; Chu *et al.*, 2015; Hiranita, 2016; Pati, Groza, *et al.*, 2017). Además de los componentes de la familia PGRMC y del receptor $\sigma 2/TMEM97$, en la línea TNBC MDA-MB-231 existe otra familia más, PAQR, que responden a P_4 . Puestos a contribuir al desarrollo científico en esta línea de alto valor biológico entre los subtipos más agresivos de cáncer de mama, nos propusimos evaluar la relación existente entre la P_4 y el PGRMC1 como vía reguladora del Ca^{2+} intracelular, ya que esta línea carece de las principales dianas clásicas de tratamiento hormonal. Así, con el título provisional de **“La progesterona disminuye la proliferación de las células MDA-MB-231 alterando la homeostasis intracelular del Ca^{2+} a través de la**

activación de PGRMC1” evaluamos el rol de la P₄ en la proliferación celular dependiente de PGRMC1.

Esta vía proliferativa ha sido ampliamente estudiada en cáncer ya que son varios los receptores que median la señalización de la P₄ (Liou *et al.*, 2005; Krietsch *et al.*, 2006; Wiebe *et al.*, 2013; Clark *et al.*, 2016; Rashmi *et al.*, 2019). De hecho, la P₄ aumenta la proliferación en las líneas luminales (T47D, MCF7) y no tumorales (MCF10A) de cáncer de mama (Tian *et al.*, 2018; Wang and Lee, 2018), efectos achacados a la expresión de los receptores clásicos de la progesterona y, en particular, al receptor nuclear de la progesterona (nPR), necesario para la maduración y proliferación de las células de cáncer de mama (Kastner *et al.*, 1990). En nuestros experimentos, observamos una disminución significativa de la proliferación de células MDA-MB-231 en presencia de P₄ y fuimos capaces de revertir esta misma situación al silenciar el PGRMC1. Ya que este mismo receptor juega un papel completamente opuesto en las células de cáncer colorrectal (HCT116) asociado a su dimerización (Kabe *et al.*, 2016), nos propusimos discernir el mecanismo subyacente responsable de los efectos anti-proliferativos en la línea TNBC.

La homeostasis del Ca²⁺ intracelular es esencial para la activación de procesos clave del ciclo celular, e incluso, alteraciones en estos flujos pueden afectar negativamente a la proliferación (H. G. Yu *et al.*, 2017). La P₄ modula la homeostasis intracelular del Ca²⁺. Ha sido descrito su papel en células *stem* embrionarias de ratón como responsable de la reducción de expresión de canales de Ca²⁺ y de proteínas asociadas a dicho ion (Kang, Choi and Jeung, 2016), y fue capaz de disminuir la [Ca²⁺]_c tras su administración prolongada en células de la granulosa (Peluso *et al.*, 2002). En la línea ER+ MCF7, se ha asociado a disrupciones de la membrana mitocondrial debidas a corrientes de Ca²⁺ provenientes del RE y vinculadas a alteraciones en la expresión de S100A11, S100A10, calreticulina, VDAC1, SERCA3 y SERCA1 (Azeez *et al.*, 2018). Nuestros resultados han puesto de manifiesto por primera vez en una línea TNBC (MDA-MB-231) y en otra ER+ (MCF7) una entrada de Ca²⁺ activada por P₄ dependiente de STIM2, Orai1 y TRPC1. Esta entrada, además, aumentó con el silenciamiento de PGRMC1, sugiriéndonos una función inhibitoria para este receptor

Puesto que la ECC favorece la translocación de NFAT1 al núcleo (Kar and Parekh, 2015; Albarran *et al.*, 2018) y una activación similar se ha descrito en células de miocito ventricular vía P₄ (Stathopoulos, Zheng and Ikura, 2009) dependientes ambas de Orai1 como efector de las corrientes de Ca²⁺ generadas (B. X. Yu *et al.*, 2017), en nuestro modelo celular observamos un aumento en la acumulación en el núcleo de NFAT1 al silenciar PGRMC1 y estimular las células con P₄ tras compararlas con su condición control. La acumulación de NFAT nuclear favorece la proliferación tanto de células de cáncer de próstata (Thebault *et al.*, 2006; Manda *et al.*, 2016) como de otros tipos de cáncer de páncreas y pulmón (Liu, Zhao and Wu, 2013; Baumgart *et al.*,

2016), coincidiendo con la tendencia proliferativa encontrada experimentalmente en nuestro modelo celular. A través de NFAT1, se activaría el oncogén MDM2 capaz de degradar p53 y favorecer mecanismos como la progresión del cáncer y la metástasis (Haupt *et al.*, 1997). Nuestros estudios sobre la p53 empleando una combinación de procesos de fraccionamiento celular y WB revelaron una acumulación nuclear del factor de transcripción pro-apoptótico p53 inducido por P₄. Además, ya que en las células donde silenciamos el PGRMC1 no hubo cambios en la acumulación en el núcleo de este factor comparado con las células en condiciones normales, concluimos que se revirtieron los efectos negativos de la P₄ en la proliferación. Una vez en el núcleo, p53 promovería la activación de otros factores pro-apoptóticos tales como PIG8, CD95, PIDD, TP53INP, RRM2B, Noxa, p21 y PUMA (van Ginkel *et al.*, 2015).

La observación experimental de que el silenciamiento de PGRMC1 aumentó la entrada de Ca²⁺ dependiente de P₄ y que revirtió exitosamente la inhibición en la proliferación celular nos indica la importancia de la regulación de la [Ca²⁺]_c, no obstante, no fuimos capaces de observar los cambios proliferativos esperados cuando silenciamos STIM2. Ante esta situación, hay autores que han establecido relaciones entre PGRMC1 y mPR α en la membrana plasmática (Thomas, Pang and Dong, 2014; Hiranita, 2016) activadas a su vez por la P₄ (Wiebe *et al.*, 2013). Independientemente y resumiendo todo lo anteriormente discutido, nuestros resultados han demostrado el papel inhibidor del PGRMC1 en la proliferación de la línea TNBC MDA-MB-231. También hemos caracterizado un nuevo mecanismo de entrada de Ca²⁺ inducido por la P₄ e inhibido por PGRMC1, que involucra a STIM2, Orai1 y TRPC1.

Los subtipos de cáncer de mama triple negativo son uno de los más agresivos y de peor pronóstico en los que las terapias clásicas de inhibición de receptores estrogénicos y de progesterona escasamente tienen efecto, como se ha comentado anteriormente. Junto con otros cánceres, presentan alteraciones en la [Ca²⁺]_c debido a la desregulación de los mecanismos de entrada de Ca²⁺ extracelular, entre otros (Jardin, Diez-Bello, *et al.*, 2018; Jardin, Lopez, *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019; Pierro *et al.*, 2019; Villalobos *et al.*, 2019; Cantonero *et al.*, 2020). I_{SOC}, I_{CRAC} e I_{ARC}, están descritas como las corrientes de Ca²⁺ más relevantes en células no excitables y tienen un papel muy relevante en el desarrollo de características el cáncer en varias células tumorales (Desai *et al.*, 2015; Cantonero *et al.*, 2019). El dominio N-terminal de Orai3 es el encargado de determinar la selectividad del AA para los canales ARC (Thompson, Mignen and Shuttleworth, 2010). La PLA2, además de degradar los fosfolípidos de membrana en AA y ácido lisofosfatídico (Kramer and Sharp, 1995), se encuentra sobreexpresada en células basales de cáncer de mama como MDA-MB-231 y SKBR3 (Yamashita *et al.*, 1993; Caiazza, Harvey and Thomas, 2010; Chiorazzo *et al.*, 2019). Aunque los efectos opuestos del AA sobre las líneas TNBC han generado controversia en los últimos años, parecen asociarse a la concentración utilizada (Chang *et al.*, 2013; De Chatterjee *et al.*, 2018). En el artículo **“El ácido araquidónico disminuye la**

proliferación, migración y viabilidad celular a través de mecanismos independientes a la entrada de calcio” mostramos cómo una baja dosis de AA extracelular redujo la proliferación y migración de la línea TNBC MDA-MB-231 a través de la despolarización mitocondrial y, puesto que no produjo cambios en la $[Ca^{2+}]_c$, independiente a I_{ARC} y careciendo de canales ARC funcionales.

Nuestros resultados preliminares revelaron que en la línea MDA-MB-231 no se activan canales de Ca^{2+} regulados por AA, pese a contener todos los componentes moleculares que integran los canales ARC. Esto resultó en la incapacidad del AA de producir cambios en la $[Ca^{2+}]_c$ *per se*, además, de no modificar la ECC, cuyo mecanismo está ampliamente estudiado en esta línea celular. Cuando reconstituimos un canal ARC funcional en esta línea celular, que denominamos GECO-ARC (Cherry-STIM1, Orai1-CFP y GECO-Orai3), la estimulación previa con AA en el medio sí produjo un cambio en la $[Ca^{2+}]_c$. Esta evidencia, de gran valor científico, junto a la no activación del canal GECO-Orai3 sobreexpresado en MDA-MB-231 bajo las mismas condiciones, nos desveló la carencia de activación de los canales ARC en células TNBC MDA-MB-231 no transfectadas. Suponemos que la estequiometría de los componentes del canal ARC (Orai1 y Orai3) en condiciones normales no es la apropiada para capacitar su activación. De hecho, en células MDA-MB-231, la ECC es el principal mecanismo de entrada de Ca^{2+} extracelular y, en este sentido, las subunidades Orai1 se disponen en su mayoría como parte de los canales capacitativos (Motiani, Abdullaev and Trebak, 2010). Además de la estequiometría, cabe destacar que la localización de los componentes de los canales ARC puede que no sea la más adecuada para conformar canales ARC funcionales (Mignen, Thompson and Shuttleworth, 2009). Por otra parte, Orai3 está presente y es funcional en esta misma línea como demostramos con los experimentos de WB y de microscopía. En este último caso, el 2-APB incrementó en las células MDA-MB-231 la $[Ca^{2+}]$ citosólica y/o reticular dependientes de Orai3, y no de Orai1 u Orai2, tal y como se presentó en células HeLa asociado a IP_3R (Leon-Aparicio *et al.*, 2017).

De hecho, los efectos nocivos del AA que encontramos en estas células parecen aumentar cuando disminuimos la expresión de la proteína Orai3, sugiriendo un papel protector frente al AA en la línea TNBC. Esta observación coincide con otros autores. Así, en células de adenocarcinoma de pulmón Orai3 regula su proliferación y ciclo celular vía Akt (Ay *et al.*, 2013). En células HeLa y HEK293, su silenciamiento disminuyó la proliferación celular por un mecanismo independiente de Ca^{2+} (Borowiec *et al.*, 2014). Y, en células ER+, Orai3 se asoció con la disminución de p53 en un mecanismo que implica la activación de la ruta PI3K/SgK-1/SeK-1 (Hasna *et al.*, 2018). Nuestros experimentos de proliferación, migración y viabilidad celular comparten la función del AA sobre la línea celular MDA-MB-231 y, además, se destaca el papel protector de Orai3. Estos hallazgos concernientes al papel del AA están en consonancia con estudios previos (Bocca *et al.*, 2008) pero en conflicto con otros (Chang *et al.*, 2013). Podríamos atribuir estas diferencias a los

distintos enfoques experimentales atendiendo a las concentraciones y tiempos de estimulación con AA. En nuestros resultados, no encontramos diferencias significativas en la $[Ca^{2+}]_c$ entre periodos cortos y largos de incubación con AA. Aunque hay estudios que han relacionado la activación de PPAR α a partir de bajas concentraciones de AA en el medio (Chang *et al.*, 2013) modulando la proliferación y senescencia de células de cáncer de mama vía CPT1C (Y. Chen *et al.*, 2017), la mayoría de los efectos nocivos del AA tanto en proliferación como en migración celular se atribuyen a la activación de vías apoptóticas en estas células. Tal es así que el AA induce apoptosis en una variedad de células cancerígenas y no tumorales tales como líneas de melanoma humano, de músculo liso vascular, de tumor cerebral y de cultivos de neuronas de médula espinal (Metzler *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 1998; Wolf and Laster, 1999; Garrido *et al.*, 2001). En estas últimas, bajas concentraciones de AA en el medio fueron capaces de activar las caspasas -3, -8 y -9 (Garrido *et al.*, 2001). En la línea celular de fibroblastos, C3HA, el AA produjo una alteración en la permeabilidad del poro mitocondrial independiente a los depósitos de Ca^{2+} (Maia, Culver and Laster, 2006; Shin and Kim, 2009), desencadenando una despolarización de membrana similar a la observada en nuestras células. Este hecho, junto a la activación de la caspasa-8, activaría la caspasa-9 y, en última estancia, la caspasa-3. Resumiendo, nuestros resultados demuestran los efectos nocivos del AA en células TNBC y podría usarse como una herramienta terapéutica posiblemente en combinación con una reducción de la expresión o función de la proteína Orai3.

En resumen, todos los resultados desarrollados en la presente tesis ponen de manifiesto la remodelación de los componentes de la ECC y su papel en la fisiopatología del cáncer de mama y denotan la potencialidad de dichas moléculas como dianas con fines terapéutico y de pronóstico contra el cáncer de mama.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES.

- ✚ El NO1, ligando del receptor σ 2R/TMEM97, aumenta la apoptosis y disminuye la migración de las líneas celulares triple negativas de cáncer de mama a través de la inhibición de la entrada capacitativa de calcio (ECC).
- ✚ La inhibición de la ECC en células de cáncer de mama triple negativo producida por NO1 resulta de impedir la interacción STIM1/Orai1 debido a la disociación del complejo STIM1- σ 2R/TMEM97 y, como consecuencia, activa la apoptosis de origen mitocondrial.
- ✚ El PGRMC1 atenúa la entrada de Ca^{2+} producida por la progesterona dependiente de STIM2, Orai1 y TRPC1.
- ✚ La activación del receptor PGRMC1 por progesterona induce la translocación de p53 al núcleo e impide la translocación nuclear de NFAT causando la inhibición de la proliferación en las células MDA-MB-231.
- ✚ El ácido araquidónico disminuye la capacidad proliferativa, migratoria y la viabilidad en las células MDA-MB-231 mediante un mecanismo independiente de la entrada de Ca^{2+} .
- ✚ Las células MDA-MB-231 no expresan un canal ARC funcional, si bien, expresan el canal Orai3 que parece jugar un papel protector frente a los efectos nocivos del ácido araquidónico.

7. CONCLUSIONS.

- ✚ NO1, σ 2R/TMEM97 receptor ligand, induces apoptosis and down-regulates migration in triple negative breast cancer cell lines via capacitative calcium entry inhibition.
- ✚ NO1-induced impairment of CCE in triple negative breast cancer cells attenuates STIM1/Orai1 interaction by dissociation of the STIM1 - σ 2R/TMEM97 complex leading to mitochondrial apoptosis.
- ✚ PGRMC1 attenuates a mechanism of Ca^{2+} entry activated by progesterone and mediated by STIM2, Orai1 and TRPC1.
- ✚ Progesterone -activated PGRMC1 receptor induces p53 nuclear translocation and avoids NFAT translocation leading to impairment of proliferation in MDA-MB-231 cells.
- ✚ Arachidonic acid negatively regulates proliferation, migration and viability of MDA-MB-231 cells by a Ca^{2+} -independent mechanism.
- ✚ MDA-MB-231 cells doesn't express functional ARC channels; nevertheless, they express Orai3 channels, which, in turn, play a protective role against arachidonic acid.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA.

- Abate, C., Niso, M., Infantino, V., Menga, A., & Berardi, F. (2015). Elements in support of the “non-identity” of the PGRMC1 protein with the σ_2 receptor. *European Journal of Pharmacology*, 758, 16–23.
- Adapala, R. K., Thoppil, R. J., Ghosh, K., Cappelli, H. C., Dudley, A. C., Paruchuri, S., Keshamouni, V., Klagsbrun, M., Meszaros, J. G., Chilian, W. M., Ingber, D. E., & Thodeti, C. K. (2016). Activation of mechanosensitive ion channel TRPV4 normalizes tumor vasculature and improves cancer therapy. *Oncogene*, 35(3), 314–322.
- Ades, F., Zardavas, D., Bozovic-Spasojevic, I., Pugliano, L., Fumagalli, D., De Azambuja, E., Viale, G., Sotiriou, C., & Piccart, M. (2014). Luminal B breast cancer: Molecular characterization, clinical management, and future perspectives. *Journal of Clinical Oncology*, 32(25), 2794–2803.
- Albarran, L., Lopez, J. J., Jardin, I., Sanchez-Collado, J., Berna-Erro, A., Smani, T., Camello, P. J., Salido, G. M., & Rosado, J. A. (2018). EFHB is a novel cytosolic Ca^{2+} sensor that modulates STIM1-SARAF interaction. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 51(3), 1164–1178.
- Albert Yen, Y., Herenyiova, M., & Weber, G. (1995). Quercetin: synergistic action with carboxyamidotriazole in human breast carcinoma cells. *Life Sciences*, 57(13), 1285–1292.
- Ali, H. R., Rueda, O. M., Chin, S. F., Curtis, C., Dunning, M. J., Aparicio, S. A. J. R., & Caldas, C. (2014). Genome-driven integrated classification of breast cancer validated in over 7,500 samples. *Genome Biology*, 15(8).
- Allbritton, N. L., Oancea, E., Kuhn, M. A., & Meyer, T. (1994). Source of nuclear calcium signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(26), 12458–12462.
- Almirza, W. H. M., Peters, P. H. J., van Zoelen, E. J. J., & Theuvenet, A. P. R. (2012). Role of Trpc channels, STIM1 and Orail in $\text{PGF}_2\alpha$ -induced calcium signaling in NRK fibroblasts. *Cell Calcium*, 51(1), 12–21.

- Altimimi, H. F., & Schnetkamp, P. P. M. (2007). $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}\text{-K}^+$ exchangers (NCKX) functional properties and physiological roles. *Channels*, 1(2), 62–69.
- Ambudkar, I. S., de Souza, L. B., & Ong, H. L. (2017). TRPC1, Orai1, and STIM1 in SOCE: friends in tight spaces. *Cell Calcium*, 63, 33–39.
- Ambudkar, I. S., Ong, H. L., Liu, X., Bandyopadhyay, B., & Cheng, K. T. (2007). TRPC1: The link between functionally distinct store-operated calcium channels. *Cell Calcium*, 42(2), 213–223.
- American Joint Committee on Cancer. (2010). AJCC Cancer Staging Handbook. En S. Edge, D. R. Byrd, C. C. Compton, A. G. Fritz, F. L. Greene, & A. Trotti (Eds.), *AJCC Cancer Staging Handbook* (7th ed.). Springer New York.
- Asanov, A., Sampieri, A., Moreno, C., Pacheco, J., Salgado, A., Sherry, R., & Vaca, L. (2015). Combined single channel and single molecule detection identifies subunit composition of STIM1-activated transient receptor potential canonical (TRPC) channels. *Cell Calcium*, 57(1), 1–13.
- Avila-Medina, J., Mayoral-Gonzalez, I., Dominguez-Rodriguez, A., Gallardo-Castillo, I., Ribas, J., Ordoñez, A., Rosado, J. A., & Smani, T. (2018). The complex role of store operated calcium entry pathways and related proteins in the function of cardiac, skeletal and vascular smooth muscle cells. *Frontiers in Physiology*, 9(3).
- Ay, A.-S., Benzerdjeb, N., Sevestre, H., Ahidouch, A., & Ouadid-Ahidouch, H. (2013). Orai3 constitutes a native store-operated calcium entry that regulates non small cell lung adenocarcinoma cell proliferation. *PLoS ONE*, 8(9), e72889.
- Aydar, E., Yeo, S., Djamgoz, M., & Palmer, C. (2009). Abnormal expression, localization and interaction of canonical transient receptor potential ion channels in human breast cancer cell lines and tissues: A potential target for breast cancer diagnosis and therapy. *Cancer Cell International*, 9(23).
- Azeez, J. M., Vini, R., Remadevi, V., Surendran, A., Jaleel, A., Santhosh Kumar, T. R., & Sreeja, S. (2018). VDAC1 and SERCA3 mediate progesterone-triggered Ca^{2+} signaling in breast cancer cells. *Journal of Proteome Research*, 17(1), 698–709.

- Azimi, I., Roberts-Thomson, S. J., & Monteith, G. R. (2014). Calcium influx pathways in breast cancer: Opportunities for pharmacological intervention. *British Journal of Pharmacology*, 171(4), 945–960.
- Azimi, I., Bong, A. H., Poo, G. X. H., Armitage, K., Lok, D., Roberts-Thomson, S. J., & Monteith, G. R. (2018). Pharmacological inhibition of store-operated calcium entry in MDA-MB-468 basal A breast cancer cells: consequences on calcium signalling, cell migration and proliferation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(24), 4525–4537.
- Azimi, I., Milevskiy, M. J. G., Chalmers, S. B., Yapa, K. T. D. S., Robitaille, M., Henry, C., Baillie, G. J., Thompson, E. W., Roberts-Thomson, S. J., & Monteith, G. R. (2019). Orai1 and Orai3 in breast cancer molecular subtypes and the identification of Orai3 as a hypoxia sensitive gene and a regulator of hypoxia responses. *Cancers*, 11(2).
- Azimi, I., Milevskiy, M. J. G., Kaemmerer, E., Turner, D., Yapa, K. T. D. S., Brown, M. A., Thompson, E. W., Roberts-Thomson, S. J., & Monteith, G. R. (2017). TRPC1 is a differential regulator of hypoxia-mediated events and Akt signalling in PTEN-deficient breast cancer cells. *Journal of Cell Science*, 130(14), 2292–2305.
- Baba, Y., Hayashi, K., Fujii, Y., Mizushima, A., Watarai, H., Wakamori, M., Numaga, T., Mori, Y., Iino, M., Hikida, M., & Kurosaki, T. (2006). Coupling of STIM1 to store-operated Ca²⁺ entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(45), 16704–16709.
- Babaer, D., Amara, S., Ivy, M., Zhao, Y., Lammers, P. E., Titze, J. M., & Tiriveedhi, V. (2018). High salt induces P-glycoprotein mediated treatment resistance in breast cancer cells through store operated calcium influx. *Oncotarget*, 9(38), 25193–25205.
- Badaoui, M., Mimsy-Julienne, C., Saby, C., Van Gulick, L., Peretti, M., Jeannesson, P., Morjani, H., & Ouadid-Ahidouch, H. (2018). Collagen type 1 promotes survival of human breast cancer cells by overexpressing Kv10.1 potassium and Orai1 calcium channels through DDR1-dependent pathway. *Oncotarget*, 9(37), 24653–24671.

- Badve, S., Dabbs, D. J., Schnitt, S. J., Baehner, F. L., Decker, T., Eusebi, V., Fox, S. B., Ichihara, S., Jacquemier, J., Lakhani, S. R., Palacios, J., Rakha, E. A., Richardson, A. L., Schmitt, F. C., Tan, P. H., Tse, G. M., Weigelt, B., Ellis, I. O., & Reis-Filho, J. S. (2011). Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Modern Pathology*, 24(2), 157–167.
- Baez-Nieto, D., Castillo, J. P., Dragicevic, C., Alvarez, O., & Latorre, R. (2011). Thermo-TRP channels: biophysics of polymodal receptors. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 704, 469–490.
- Baglia, M. L., Cook, L. S., Mei-Tzu, C., Wiggins, C., Hill, D., Porter, P., & Li, C. I. (2018). Alcohol, smoking, and risk of Her2-overexpressing and triple-negative breast cancer relative to estrogen receptor-positive breast cancer. *International Journal of Cancer*, 143(8), 1849–1857.
- Baglia, M. L., Tang, M. T. C., Malone, K. E., Porter, P., & Li, C. I. (2018). Family history and risk of second primary breast cancer after in situ breast carcinoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 27(3), 315–320.
- Bagur, R., & Hajnóczky, G. (2017). Intracellular Ca²⁺ sensing: its role in calcium homeostasis and signaling. *Molecular Cell*, 66(6), 780–788.
- Bai, X. C., Yan, Z., Wu, J., Li, Z., & Yan, N. (2016). The Central domain of RyR1 is the transducer for long-range allosteric gating of channel opening. *Cell Research*, 26(9), 995–1006.
- Bali, N., Arimoto, J. M., Morgan, T. E., & Finch, C. E. (2013). Progesterone antagonism of neurite outgrowth depends on microglial activation via PGRMC1/S2R. *Endocrinology*, 154(7), 2468–2480.
- Bandyopadhyay, B. C., Pingle, S. C., & Ahern, G. P. (2011). Store-operated Ca²⁺ signaling in dendritic cells occurs independently of STIM1. *Journal of Leukocyte Biology*, 89(1), 57–62.

- Baron, S., Struyf, S., Wuytack, F., Van Damme, J., Missiaen, L., Raeymaekers, L., & Vanoevelen, J. (2009). Contribution of intracellular Ca^{2+} stores to Ca^{2+} signaling during chemokinesis of human neutrophil granulocytes. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1793(6), 1041–1049.
- Baryshnikov, S. G., Pulina, M. V., Zulian, A., Linde, C. I., & Golovina, V. A. (2009). Orai1, a critical component of store-operated Ca^{2+} entry, is functionally associated with $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger and plasma membrane Ca^{2+} pump in proliferating human arterial myocytes. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 297(5), C1103-12.
- Baumgart, S., Chen, N. M., Zhang, J. S., Billadeau, D. D., Gaisina, I. N., Kozikowski, A. P., Singh, S. K., Fink, D., Ströbel, P., Klindt, C., Zhang, L., Bamlet, W. R., Koenig, A., Hessmann, E., Gress, T. M., Ellenrieder, V., & Neesse, A. (2016). GSK-3 β governs inflammation-induced NFATc2 signaling hubs to promote pancreatic cancer progression. *Molecular Cancer Therapeutics*, 15(3), 491–502.
- Baumgartner, H. K., Gerasimenko, J. V., Thorne, C., Ferdek, P., Pozzan, T., Tepikin, A. V., Petersen, O. H., Sutton, R., Watson, A. J. M., & Gerasimenko, O. V. (2009). Calcium elevation in mitochondria is the main Ca^{2+} requirement for mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening. *Journal of Biological Chemistry*, 284(31), 20796–20803.
- Bedard, P. L., Cardoso, F., & Piccart-Gebhart, M. J. (2009). Stemming resistance to HER-2 targeted therapy. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 14(1), 55–66.
- Bejarano, I., Espino, J., González-Flores, D., Casado, J. G., Redondo, P. C., Rosado, J. A., Barriga, C., Pariente, J. A., & Rodríguez, A. B. (2009). Role of calcium signals on hydrogen peroxide-induced apoptosis in human myeloid HL-60 cells. *International Journal of Biomedical Science: IJBS*, 5(3), 246–256.
- Belevych, A. E., Radwański, P. B., Carnes, C. A., & Györke, S. (2013). ‘Ryanopathy’: causes and manifestations of RyR2 dysfunction in heart failure. *Cardiovascular Research*, 98(2), 240–247.
- Bergmeier, W., Weidinger, C., Zee, I., & Feske, S. (2013). Emerging roles of store-operated Ca^{2+} entry through STIM and Orai proteins in immunity, hemostasis and cancer. *Channels*, 7(5), 379–391.

- Berna-Erro, A., Braun, A., Kraft, R., Kleinschnitz, C., Schuhmann, M. K., Stegner, D., Wultsch, T., Eilers, J., Meuth, S. G., Stoll, G., & Nieswandt, B. (2009). STIM2 regulates capacitive Ca^{2+} entry in neurons and plays a key role in hypoxic neuronal cell death. *Science Signaling*, 2(93).
- Berna-Erro, A., Galan, C., Dionisio, N., Gomez, L. J., Salido, G. M., & Rosado, J. A. (2012). Capacitative and non-capacitative signaling complexes in human platelets. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1823(8), 1242–1251.
- Berna-Erro, A., Jardin, I., Salido, G. M., & Rosado, J. A. (2017). Role of STIM2 in cell function and physiopathology. *Journal of Physiology*, 595(10), 3111–3128.
- Bernard, P. S., Parker, J. S., Mullins, M., Cheung, M. C. U., Leung, S., Voduc, D., Vickery, T., Davies, S., Fauron, C., He, X., Hu, Z., Quackenbush, J. F., Stijleman, I. J., Palazzo, J., Matron, J. S., Nobel, A. B., Mardis, E., Nielsen, T. O., Ellis, M. J., & Perou, C. M. (2009). Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *Journal of Clinical Oncology*, 27(8), 1160–1167.
- Berridge, M. J. (2001). The versatility and complexity of calcium signalling. *Novartis Foundation Symposium*, 239, 52–64.
- Berridge, M. J. (1984). Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *The Biochemical journal*, 220(2), 345–360.
- Berridge, M. J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, 361(6410), 315–325.
- Berridge, M. J. (2012). Calcium signalling remodelling and disease. *Biochemical Society Transactions*, 40(2), 297–309.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., & Roderick, H. L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(7), 517–529.
- Berridge, M. J., & Irvine, R. F. (1984). Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, 312(5992), 315–321.

- Berridge, M. J., Lipp, P., & Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(1), 11–21.
- Besserer, G. M., Ottolia, M., Nicoll, D. A., Chaptal, V., Cascio, D., Philipson, K. D., & Abramson, J. (2007). The second Ca^{2+} -binding domain of the Na^+ - Ca^{2+} exchanger is essential for regulation: crystal structures and mutational analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(47), 18467–18472.
- Betzenhauser, M. J., Wagner, L. E., Iwai, M., Michikawa, T., Mikoshiba, K., & Yule, D. I. (2008). ATP modulation of Ca^{2+} release by type-2 and type-3 inositol (1, 4, 5)-triphosphate receptors: differing ATP sensitivities and molecular determinants of action. *Journal of Biological Chemistry*, 283(31), 21579–21587.
- Bezprozvanny, I., Watras, J., & Ehrlich, B. E. (1991). Bell-shaped calcium-response curves of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ - and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature*, 351(6329), 751–754.
- Bird, G., Aziz, O., Lievremont, J.-P., Wedel, B., Trebak, M., Vazquez, G., & Putney Jr., J. (2005). Mechanisms of phospholipase C-regulated calcium entry. *Current Molecular Medicine*, 4(3), 291–301.
- Birnbaumer, L., Zhu, X., Jiang, M., Boulay, G., Peyton, M., Vannier, B., Brown, D., Platano, D., Sadeghi, H., Stefani, E., & Birnbaumer, M. (1996). On the molecular basis and regulation of cellular capacitative calcium entry: roles for Trp proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(26), 15195–15202.
- Blaustein, M. P., & Lederer, W. J. (1999). Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiological Reviews*, 79(3), 763–854.
- Bocca, C., Bozzo, F., Martinasso, G., Canuto, R. A., & Miglietta, A. (2008). Involvement of PPAR α in the growth inhibitory effect of arachidonic acid on breast cancer cells. *British Journal of Nutrition*, 100(4), 739–750.
- Bolanz, K. A., Hediger, M. A., & Landowski, C. P. (2008). The role of TRPV6 in breast carcinogenesis. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(2), 271–279.

- Bootman, M. D., Berridge, M. J., & Roderick, H. L. (2002). Calcium signalling: more messengers, more channels, more complexity. *Current Biology*, 12(16).
- Bootman, M. D., Collins, T. J., Peppiatt, C. M., Prothero, L. S., MacKenzie, L., De Smet, P., Travers, M., Tovey, S. C., Seo, J. T., Berridge, M. J., Ciccolini, F., & Lipp, P. (2001). Calcium signalling - An overview. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 12(1), 3–10.
- Borowiec, A.-S., Bidaux, G., Tacine, R., Dubar, P., Pigat, N., Delcourt, P., Mignen, O., & Capiod, T. (2014). Are Orai1 and Orai3 channels more important than calcium influx for cell proliferation? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843(2), 464–472.
- Bosanac, I., Yamazaki, H., Matsu-Ura, T., Michikawa, T., Mikoshiba, K., & Ikura, M. (2005). Crystal structure of the ligand binding suppressor domain of type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Molecular Cell*, 17(2), 193–203.
- Boyle, P., Levin, B., International Agency for Research on Cancer, & World Health Organization. (2008). World cancer report 2008. *International Agency for Research on Cancer*.
- Boyman, L., Mikhasenko, H., Hiller, R., & Khananshvil, D. (2009). Kinetic and equilibrium properties of regulatory calcium sensors of NCX1 protein. *Journal of Biological Chemistry*, 284(10), 6185–6191.
- Brady, P. N., & Macnaughtan, M. A. (2015). Evaluation of colorimetric assays for analyzing reductively methylated proteins: biases and mechanistic insights. *Analytical Biochemistry*, 491, 43–51.
- Braithwaite, D., Miglioretti, D. L., Zhu, W., Demb, J., Trentham-Dietz, A., Sprague, B., Tice, J. A., Onega, T., Henderson, L. M., Buist, D. S. M., Ziv, E., Walter, L. C., Kerlikowske, K., Avins, A., Benefield, T., Bowles, E. A., Bowman, M., Burian, D., Butler, M., ... Yankaskas, B. (2018). Family history and breast cancer risk among older women in the breast cancer surveillance consortium cohort. *JAMA Internal Medicine*, 178(4), 494–501.
- Brandman, O., Liou, J., Park, W. S., & Meyer, T. (2007). STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ levels. *Cell*, 131(7), 1327–1339.

- Bréchar, S., Melchior, C., Plançon, S., Schenten, V., & Tschirhart, E. J. (2008). Store-operated Ca^{2+} channels formed by TRPC1, TRPC6 and Orai1 and non-store-operated channels formed by TRPC3 are involved in the regulation of NADPH oxidase in HL-60 granulocytes. *Cell Calcium*, 44(5), 492–506.
- Brenton, J. D., Carey, L. A., Ahmed, A., & Caldas, C. (2005). Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *Journal of Clinical Oncology*, 23(29), 7350–7360.
- Brewer, H. R., Jones, M. E., Schoemaker, M. J., Ashworth, A., & Swerdlow, A. J. (2017). Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. *Breast Cancer Research and Treatment*, 165(1), 193–200.
- Brini, M., Murgia, M., Pasti, L., Picard, D., Pozzan, T., & Rizzuto, R. (1993). Nuclear Ca^{2+} concentration measured with specifically targeted recombinant aequorin. *The EMBO Journal*, 12(12), 4813–4819.
- Brini, M., Cali, T., Ottolini, D., & Carafoli, E. (2013). Intracellular calcium homeostasis and signaling. *Springer*, 119–168.
- Brodin, P., Falchetto, R., Vorherr, T., & Carafoli, E. (1992). Identification of two domains which mediate the binding of activating phospholipids to the plasma-membrane Ca^{2+} pump. *European Journal of Biochemistry*, 204(2), 939–946.
- Bruce, J. I. E. (2018). Metabolic regulation of the PMCA: role in cell death and survival. *Cell Calcium*, 69, 28–36.
- Bublitz, M., Preben Morth, J., & Nissen, P. (2011). P-type ATPases at a glance. *Journal of Cell Science*, 124(15), 2515–2519.
- Bygrave, F. L., & Benedetti, A. (1996). What is the concentration of calcium ions in the endoplasmic reticulum? *Cell Calcium*, 19(6), 547–551.
- Cai, X. (2007). Molecular evolution and structural analysis of the Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel subunit, Orai. *Journal of Molecular Biology*, 368(5), 1284–1291.

- Caiazza, F., Harvey, B. J., & Thomas, W. (2010). Cytosolic phospholipase A2 activation correlates with HER2 overexpression and mediates estrogen-dependent breast cancer cell growth. *Molecular Endocrinology*, 24(5), 953–968.
- Calcraft, P. J., Ruas, M., Pan, Z., Cheng, X., Arredouani, A., Hao, X., Tang, J., Rietdorf, K., Teboul, L., Chuang, K. T., Lin, P., Xiao, R., Wang, C., Zhu, Y., Lin, Y., Wyatt, C. N., Parrington, J., Ma, J., Evans, A. M., ... Zhu, M. X. (2009). NAADP mobilizes calcium from acidic organelles through two-pore channels. *Nature*, 459(7246), 596–600.
- Callaghan, R., Luk, F., & Bebawy, M. (2014). Inhibition of the multidrug resistance P-glycoprotein: Time for a change of strategy? *Drug Metabolism and Disposition*, 42(4), 623–631.
- Calloway, N., Holowka, D., & Baird, B. (2010). A basic sequence in STIM1 promotes Ca²⁺ influx by interacting with the C-terminal acidic coiled coil of Orai1. *Biochemistry*, 49(6), 1067–1071.
- Calloway, N., Owens, T., Corwith, K., Rodgers, W., Holowka, D., & Baird, B. (2011). Stimulated association of STIM1 and Orai1 is regulated by the balance of PtdIns(4,5)P₂ between distinct membrane pools. *Journal of Cell Science*, 124(15), 2602–2610.
- Cantonero, C., Sanchez-Collado, J., Gonzalez-Nuñez, M. A., Salido, G. M., Lopez, J. J., Jardin, I., & Rosado, J. A. (2019). Store-independent Orai1-mediated Ca²⁺ entry and cancer. *Cell Calcium*, 80, 1–7.
- Cantonero, C., Camello, P. J., Abate, C., Berardi, F., Salido, G. M., Rosado, J. A., & Redondo, P. C. (2020). NO1, a new Sigma 2 Receptor/TMEM97 fluorescent ligand, downregulates SOCE and promotes apoptosis in the triple negative breast cancer cell lines. *Cancers*, 12(2), 257.
- Carafoli, E. (1991). Calcium pump of the plasma membrane. *Physiological Reviews*, 71(1), 129–153.
- Carafoli, E. (1994). Biogenesis: Plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme 1. *The FASEB Journal*, 8(13), 993–1002.
- Casals-Felip, R., Martin-Ezquerro, G., Pallares, R. E., & Torres, J. M. C. (2007). Paget Disease of the Breast. *Medicina Clinica*, 129(11), 440.

- Cassano, G., Gasparre, G., Niso, M., Contino, M., Scalera, V., & Colabufo, N. A. (2009). F281, synthetic agonist of the sigma-2 receptor, induces Ca^{2+} efflux from the endoplasmic reticulum and mitochondria in SK-N-SH cells. *Cell Calcium*, 45(4), 340–345.
- Casteels, R., & Droogmans, G. (1981). Exchange characteristics of the noradrenaline-sensitive calcium store in vascular smooth muscle cells or rabbit ear artery. *The Journal of Physiology*, 317(1), 263–279.
- Catterall, W. A. (2010). Ion channel voltage sensors: Structure, function, and pathophysiology. *Neuron*, 67(6), 915–928.
- Catterall, W. A. (2011). Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(8), 1–23.
- Chadwick, C. C., Saito, A., & Fleischer, S. (1990). Isolation and characterization of the inositol trisphosphate receptor from smooth muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(6), 2132–2136.
- Chakraborty, S., Ghosh, S., Banerjee, B., Santra, A., Adhikary, A., Misra, A. K., & Sen, P. C. (2016). Phemindole, a synthetic di-indole derivative maneuvers the Store Operated Calcium Entry (SOCE) to induce potent anti-carcinogenic activity in human triple negative breast cancer cells. *Frontiers in Pharmacology*, 7(5).
- Chalmers, S. B., & Monteith, G. R. (2018). ORAI channels and cancer. *Cell Calcium*, 74, 160–167.
- Chan, J., Yamazaki, H., Ishiyama, N., Seo, M. D., Mal, T. K., Michikawa, T., Mikoshiba, K., & Ikura, M. (2010). Structural studies of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: coupling ligand binding to channel gating. *Journal of Biological Chemistry*, 285(46), 36092–36099.
- Chang, N.-W., Wu, C.-T., Chen, D.-R., Yeh, C.-Y., & Lin, C. (2013). High levels of arachidonic acid and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in breast cancer tissues are associated with promoting cancer cell proliferation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(1), 274–281.

- Chantôme, A., Potier-Cartereau, M., Clarysse, L., Fromont, G., Marionneau-Lambot, S., Guéguinou, M., Pagés, J. C., Collin, C., Oullier, T., Girault, A., Arbion, F., Haelters, J. P., Jaffrés, P. A., Pinault, M., Besson, P., Joulin, V., Bougnoux, P., & Vandier, C. (2013). Pivotal role of the lipid raft SK3-orai1 complex in human cancer cell migration and bone metastases. *Cancer Research*, 73(15), 4852–4861.
- Cheang, M. C. U., Chia, S. K., Voduc, D., Gao, D., Leung, S., Snider, J., Watson, M., Davies, S., Bernard, P. S., Parker, J. S., Perou, C. M., Ellis, M. J., & Nielsen, T. O. (2009). Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 101(10), 736–750.
- Chen, J., Luan, Y., Yu, R., Zhang, Z., Zhang, J., & Wang, W. (2014). Transient receptor potential (TRP) channels, promising potential diagnostic and therapeutic tools for cancer. *BioScience Trends*, 8(1).
- Chen, Y. F., Chen, L. H., & Shen, M. R. (2019). The distinct role of STIM1 and STIM2 in the regulation of store-operated Ca^{2+} entry and cellular function. *Journal of Cellular Physiology*, 234(6), 8727–8739.
- Chen, Y. F., Chen, Y. T., Chiu, W. T., & Shen, M. R. (2013). Remodeling of calcium signaling in tumor progression. *Journal of Biomedical Science*, 20(1), 23.
- Chen, Y. W., Chen, Y. F., Chen, Y. T., Chiu, W. T., & Shen, M. R. (2016). The STIM1-Orai1 pathway of store-operated Ca^{2+} entry controls the checkpoint in cell cycle G1/S transition. *Scientific Reports*, 6, 22142.
- Chen, Y. W., Chen, Y. F., Chiu, W. T., Chen, H. C., & Shen, M. R. (2017). STIM1-dependent Ca^{2+} signaling regulates podosome formation to facilitate cancer cell invasion. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12.
- Chen, Y., Wang, Y., Huang, Y., Zeng, H., Hu, B., Guan, L., Zhang, H., Yu, A.-M., Johnson, C. H., Gonzalez, F. J., Huang, M., & Bi, H. (2017). PPAR α regulates tumor cell proliferation and senescence via a novel target gene carnitine palmitoyltransferase 1C. *Carcinogenesis*, 38(4), 474–483.
- Cheng, H., Wang, S., & Feng, R. (2016). STIM1 plays an important role in TGF- β -induced suppression of breast cancer cell proliferation. *Oncotarget*, 7(13), 16866–16878.

- Cheng, K. T., Liu, X., Ong, H. L., Swaim, W., & Ambudkar, I. S. (2011). Local Ca^{2+} entry via Orai1 regulates plasma membrane recruitment of TRPC1 and controls cytosolic Ca^{2+} signals required for specific cell functions. *PLoS Biology*, 9(3).
- Chini, E. N., Beers, K. W., & Dousa, T. P. (1995). Nicotinate adenine dinucleotide phosphate (NAADP) triggers a specific calcium release system in sea urchin eggs. *Journal of Biological Chemistry*, 270(7), 3216–3223.
- Chini, E. N., & Dousa, T. P. (1996). Nicotinate-adenine dinucleotide phosphate-induced Ca^{2+} release does not behave as a Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release system. *Biochemical Journal*, 316(3), 709–711.
- Chiorazzo, M. G., Tunset, H. M., Popov, A. V., Johansen, B., Moestue, S., & Delikatny, E. J. (2019). Detection and differentiation of breast cancer sub-types using a cPLA2 α activatable fluorophore. *Scientific Reports*, 9(1), 6122.
- Chodon, D., Guilbert, A., Dhennin-Duthille, I., Gautier, M., Telliez, M. S., Sevestre, H., & Ouadid-Ahidouch, H. (2010). Estrogen regulation of TRPM8 expression in breast cancer cells. *BMC Cancer*, 10.
- Christensen, K. A., Myers, J. T., & Swanson, J. A. (2002). pH-dependent regulation of lysosomal calcium in macrophages. *Journal of Cell Science*, 115(3), 599–607.
- Chu, U. B., Mavlyutov, T. A., Chu, M. L., Yang, H., Schulman, A., Mesangeau, C., McCurdy, C. R., Guo, L. W., & Ruoho, A. E. (2015). The Sigma-2 receptor and progesterone receptor membrane component 1 are different binding sites derived from independent genes. *EBioMedicine*, 2(11), 1806–1813.
- Clapham, D. E., Runnels, L. W., & Strübing, C. (2001). The TRP ion channel family. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(6), 387–396.
- Clark, N. C., Friel, A. M., Pru, C. A., Zhang, L., Shioda, T., Rueda, B. R., Peluso, J. J., & Pru, J. K. (2016). Progesterone receptor membrane component 1 promotes survival of human breast cancer cells and the growth of xenograft tumors. *Cancer Biology & Therapy*, 17(3), 262–271.

- Clarysse, L., Guéguinou, M., Potier-Cartereau, M., Vandecasteele, G., Bougnoux, P., Chevalier, S., Chantôme, A., & Vandier, C. (2014). cAMP–PKA inhibition of SK3 channel reduced both Ca²⁺ entry and cancer cell migration by regulation of SK3–Orai1 complex. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 466(10), 1921–1932.
- Cohen, C., Guarner, J., & De Rose, P. (1993). Mammary Paget's disease and associated carcinoma. An immunohistochemical study. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 117(3), 291–294.
- Cohen, P. R., Schulze, K. E., Tschen, J. A., Hetherington, G. W., & Nelson, B. R. (2006). Treatment of extramammary Paget disease with topical imiquimod cream: case report and literature review. *Southern Medical Journal*, 99(4), 396–402.
- Coleman, M. P., Quaresma, M., Berrino, F., Lutz, J. M., De Angelis, R., Capocaccia, R., Baili, P., Rachet, B., Gatta, G., Hakulinen, T., Micheli, A., Sant, M., Weir, H. K., Elwood, J. M., Tsukuma, H., Koifman, S., e Silva, G. A., Francisci, S., Santaquilani, M., ... Young, J. L. (2008). Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *The Lancet Oncology*, 9(8), 730–756.
- Colón-González, F., & Kazanietz, M. G. (2006). C1 domains exposed: from diacylglycerol binding to protein-protein interactions. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1761(8), 827–837.
- Cross, B. M., Breitwieser, G. E., Reinhardt, T. A., & Rao, R. (2014). Cellular calcium dynamics in lactation and breast cancer: from physiology to pathology. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 306 (6), C515.
- Csordás, G., Golenár, T., Seifert, E. L., Kamer, K. J., Sancak, Y., Perocchi, F., Moffat, C., Weaver, D., De la Fuente, S., Bogorad, R., Kotliansky, V., Adijanto, J., Mootha, V. K., & Hajnóczky, G. (2013). MICU1 controls both the threshold and cooperative activation of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter. *Cell Metabolism*, 17(6), 976–987.
- Cui, J., Bian, J. S., Kagan, A., & McDonald, T. V. (2002). CaT1 contributes to the stores-operated calcium current in Jurkat T-lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 277(49), 47175–47183.

- Cui, X., Schiff, R., Arpino, G., Osborne, C. K., & Lee, A. V. (2005). Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 23(30), 7721–7735.
- Curtis, C., Shah, S. P., Chin, S. F., Turashvili, G., Rueda, O. M., Dunning, M. J., Speed, D., Lynch, A. G., Samarajiwa, S., Yuan, Y., Gräf, S., Ha, G., Haffari, G., Bashashati, A., Russell, R., McKinney, S., Aparicio, S., Brenton, J. D., Ellis, I., ... Caldas, C. (2012). The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*, 486(7403), 346–352.
- Dai, X., Chen, A., & Bai, Z. (2014). Integrative investigation on breast cancer in ER, PR and HER2-defined subgroups using mRNA and miRNA expression profiling. *Scientific Reports*, 3.
- Dandamudi, A., Tommie, J., Nommsen-Rivers, L., & Couch, S. (2018). Dietary patterns and breast cancer risk: a systematic review. *Anticancer Research*, 38(6), 3209–3222.
- Davis, F. M., Azimi, I., Faville, R. A., Peters, A. A., Jalink, K., Putney, J. W., Goodhill, G. J., Thompson, E. W., Roberts-Thomson, S. J., & Monteith, G. R. (2014). Induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cells is calcium signal dependent. *Oncogene*, 33(18), 2307–2316.
- Davis, F. M., Peters, A. A., Grice, D. M., Cabot, P. J., Parat, M. O., Roberts-Thomson, S. J., & Monteith, G. R. (2012). Non-stimulated, agonist-stimulated and store-operated Ca²⁺ influx in MDA-MB-468 breast cancer cells and the effect of EGF-induced EMT on calcium entry. *PLoS ONE*, 7(5).
- De Chatterjee, A., Roy, D., Guevara, P., Pal, R., Narayan, M., Roychowdhury, S., & Das, S. (2018). Arachidonic acid induces the migration of MDA-MB-231 cells by activating raft-associated leukotriene B4 receptors. *Clinical Cancer Drugs*, 5(1), 28–41.
- De Cicco, P., Catani, M. V., Gasperi, V., Sibilano, M., Quaglietta, M., & Savini, I. (2019). Nutrition and breast cancer: a literature review on prevention, treatment and recurrence. *Nutrients*, 11(7).

- De La Fuente, S., Fonteriz, R. I., De, P. J., Cruz, L. A., Montero, M., & Alvarez, J. (2012). Mitochondrial free $[Ca^{2+}]$ dynamics measured with a novel low- Ca^{2+} -affinity aequorin probe. *Biochem. J*, 445, 371–376.
- De la Fuente, S., Fonteriz, R. I., Montero, M., & Alvarez, J. (2013). Ca^{2+} homeostasis in the endoplasmic reticulum measured with a new low- Ca^{2+} -affinity targeted aequorin. *Cell Calcium*, 54(1), 37–45.
- De Souza, J. A., Marques, E. F., Guatelli, C., Girão, D. S., Queroz, T., Graziano, L., Macedo, M., Iyeyasu, H., & Chojniak, R. (2011). Malignant phyllodes tumor of the breast: case report. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 57(5), 495–497.
- Demandolx, D., & Davoust, J. (1997). Multicolour analysis and local image correlation in confocal microscopy. *Journal of Microscopy*, 185(1), 21–36.
- Demuro, A., Penna, A., Safrina, O., Yeromin, A. V., Amcheslavsky, A., Cahalan, M. D., & Parker, I. (2011). Subunit stoichiometry of human Orai1 and Orai3 channels in closed and open states. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(43), 17832–17837.
- Deng, X., Wang, Y., Zhou, Y., Soboloff, J., & Gill, D. L. (2009). STIM and orai: Dynamic intermembrane coupling to control cellular calcium signals. *Journal of Biological Chemistry*, 284(34), 22501–22505.
- Derler, I., Fahrner, M., Muik, M., Lackner, B., Schindl, R., Groschner, K., & Romanin, C. (2009). A Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CRAC) modulatory domain (CMD) within STIM1 mediates fast Ca^{2+} -dependent inactivation of Orai1 channels. *Journal of Biological Chemistry*, 284(37), 24933–24938.
- Derler, I., Madl, J., Schütz, G., & Romanin, C. (2012). Structure, regulation and biophysics of ICRAC, STIM/Orai1. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 740, 383–410.
- Derler, I., Plenk, P., Fahrner, M., Muik, M., Jardin, I., Schindl, R., Gruber, H. J., Groschner, K., & Romanin, C. (2013). The extended transmembrane orai1 N-terminal (ETON) region combines binding interface and gate for orai1 activation by STIM1. *Journal of Biological Chemistry*, 288(40), 29025–29034.

- Derler, I., Schindl, R., Fritsch, R., Heftberger, P., Riedl, M. C., Begg, M., House, D., & Romanin, C. (2013). The action of selective CRAC channel blockers is affected by the Orai pore geometry. *Cell Calcium*, 53(2), 139–151.
- Des Georges, A., Clarke, O. B., Zalk, R., Yuan, Q., Condon, K. J., Grassucci, R. A., Hendrickson, W. A., Marks, A. R., & Frank, J. (2016). Structural basis for gating and activation of RyR1. *Cell*, 167(1), 145–157.
- Desai, P. N., Zhang, X., Wu, S., Janoshazi, A., Bolimuntha, S., Putney, J. W., & Trebak, M. (2015). Multiple types of calcium channels arising from alternative translation initiation of the Orai1 message. *Science Signaling*, 8(387), 74.
- Dhennin-Duthille, I., Gautier, M., Faouzi, M., Guilbert, A., Brevet, M., Vaudry, D., Ahidouch, A., Sevestre, H., & Ouadid-Ahidouch, H. (2011). High expression of transient receptor potential channels in human breast cancer epithelial cells and tissues: correlation with pathological parameters. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 28(5), 813–822.
- Didiasova, M., Zakrzewicz, D., Magdolen, V., Nagaraj, C., Bálint, Z., Rohde, M., Preissner, K. T., & Wygrecka, M. (2015). STIM1/Orai1-mediated Ca^{2+} influx regulates enolase-1 exteriorization. *Journal of Biological Chemistry*, 290(19), 11983–11999.
- Dionisio, N., Albarran, L., Berna-Erro, A., Hernandez-Cruz, J. M., Salido, G. M., & Rosado, J. A. (2011). Functional role of the calmodulin- and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-binding (CIRB) site of TRPC6 in human platelet activation. *Cellular Signalling*, 23(11), 1850–1856.
- DiPolo, R., & Beaugé, L. (2006). Sodium/calcium exchanger: influence of metabolic regulation on ion carrier interactions. *Physiological Reviews*, 86(1), 155–203.
- Divecha, N., Banfić, H., & Irvine, R. F. (1993). Inositides and the nucleus and inositides in the nucleus. *Cell*, 74(3), 405–407.
- Dode, L., Andersen, J. P., Leslie, N., Dhitavat, J., Vilsen, B., & Hovnanian, A. (2003). Dissection of the functional differences between sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) 1 and 2 isoforms and characterization of darier disease (SERCA2) mutants by steady-state and transient kinetic analyses. *Journal of Biological Chemistry*, 278(48), 47877–47889.

- Dode, L., Andersen, J. P., Raeymaekers, L., Missiaen, L., Vilsen, B., & Wuytack, F. (2005). Functional comparison between secretory pathway $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase (SPCA) 1 and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) 1 isoforms by steady-state and transient kinetic analyses. *Journal of Biological Chemistry*, 280(47), 39124–39134.
- Dode, L., Andersen, J. P., Vanoevelen, J., Raeymaekers, L., Missiaen, L., Vilsen, B., & Wuytack, F. (2006). Dissection of the functional differences between human secretory pathway $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase (SPCA) 1 and 2 isoenzymes by steady-state and transient kinetic analyses. *Journal of Biological Chemistry*, 281(6), 3182–3189.
- Dode, L., De Greef, C., Mountian, I., Attard, M., Town, M. M., Casteels, R., & Wuytack, F. (1998). Structure of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 3 gene: promoter analysis and alternative splicing of the SERCA3 pre-mRNA. *Journal of Biological Chemistry*, 273(22), 13982–13994.
- Dolphin, A. C. (2006). A short history of voltage-gated calcium channels. *British Journal of Pharmacology*, 147(SUPPL. 1).
- Domínguez-Rodríguez, A., Díaz, I., Rodríguez-Moyano, M., Calderón-Sánchez, E., Rosado, J. A., Ordóñez, A., & Smani, T. (2012). Urotensin-II signaling mechanism in rat coronary artery: role of STIM1 and Orai1-dependent store operated calcium influx in vasoconstriction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(5), 1325–1332.
- Dong, H., Sharma, M., Zhou, H. X., & Cross, T. A. (2012). Glycines: Role in α -helical membrane protein structures and a potential indicator of native conformation. *Biochemistry*, 51(24), 4779–4789.
- Duchen, M. R. (2000). Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *Journal of Physiology*, 529(1), 57–68.
- Dupont, W. D., Parl, F. F., Hartmann, W. H., Brinton, L. A., Winfield, A. C., Worrell, J. A., Schuyler, P. A., & Plummer, W. D. (1993). Breast cancer risk associated with proliferative breast disease and atypical hyperplasia. *Cancer*, 71(4), 1258–1265.

- Dynes, J. L., Amcheslavsky, A., & Cahalan, M. D. (2016). Genetically targeted single-channel optical recording reveals multiple Orai1 gating states and oscillations in calcium influx. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(2), 440–445.
- Echevarria, W., Leite, M. F., Guerra, M. T., Zipfel, W. R., & Nathanson, M. H. (2003). Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nature Cell Biology*, 5(5), 440–446.
- Ellingjord-Dale, M., Vos, L., Hjerkind, K. V., Hjartåker, A., Russnes, H. G., Tretli, S., Hofvind, S., Dos-Santos-Silva, I., & Ursin, G. (2017). Alcohol, physical activity, smoking, and breast cancer subtypes in a large, nested case–control study from the Norwegian Breast Cancer Screening Program. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 26(12), 1736–1744.
- Emeriau, N., de Clippele, M., Gailly, P., & Tajeddine, N. (2018). Store operated calcium entry is altered by the inhibition of receptors tyrosine kinase. *Oncotarget*, 9(22), 16059–16073.
- Ethier, J. L., Ocaña, A., Rodríguez Lescure, A., Ruíz, A., Alba, E., Calvo, L., Ruíz-Borrego, M., Santaballa, A., Rodríguez, C. A., Crespo, C., Ramos, M., Gracia Marco, J., Lluch, A., Álvarez, I., Casas, M., Sánchez-Aragó, M., Carrasco, E., Caballero, R., Amir, E., & Martin, M. (2018). Outcomes of single versus double hormone receptor–positive breast cancer. A GEICAM/9906 sub-study. *European Journal of Cancer*, 94, 199–205.
- Faddy, H. M., Smart, C. E., Xu, R., Lee, G. Y., Kenny, P. A., Feng, M., Rao, R., Brown, M. A., Bissell, M. J., Roberts-Thomson, S. J., & Monteith, G. R. (2008). Localization of plasma membrane and secretory calcium pumps in the mammary gland. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 369(3), 977–981.
- Fahrner, M., Derler, I., Jardin, I., & Romanin, C. (2013). The STIM1/Orai signaling machinery. *Channels*, 7(5), 330–343.
- Fahrner, M., Muik, M., Schindl, R., Butorac, C., Stathopoulos, P., Zheng, L., Jardin, I., Ikura, M., & Romanin, C. (2014). A coiled-coil clamp controls both conformation and clustering of stromal interaction molecule 1 (STIM1). *Journal of Biological Chemistry*, 289(48), 33231–33244.

- Fairclough, R. J., Dode, L., Vanoevelen, J., Andersen, J. P., Missiaen, L., Raeymaekers, L., Wuytack, F., & Hovnanian, A. (2003). Effect of Hailey-Hailey disease mutations on the function of a new variant of human secretory pathway $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase (hSPCA1). *Journal of Biological Chemistry*, 278(27), 24721–24730.
- Falchetto, R., Vorherr, T., Brunner, J., & Carafolis, E. (1991). The plasma membrane Ca^{2+} pump contains a site that interacts with its calmodulin-binding domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(5).
- Falchetto, R., Vorherr, T., & Carafoli, E. (1992). The calmodulin-binding site of the plasma membrane Ca^{2+} pump interacts with the transduction domain of the enzyme. *Protein Science*, 1(12), 1613–1621.
- Fan, C., Oh, D. S., Wessels, L., Weigelt, B., Nuyten, D. S. A., Nobel, A. B., Van't Veer, L. J., & Perou, C. M. (2006). Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 355(6), 560–569.
- Faouzi, M., Hague, F., Geerts, D., Ay, A. S., Potier-Cartereau, M., Ahidouch, A., & Ouadid-Ahidouch, H. (2016). Functional cooperation between KCa3.1 and TRPC1 channels in human breast cancer: role in cell proliferation and patient prognosis. *Oncotarget*, 7(24), 36419–36435.
- Faouzi, M., Hague, F., Potier, M., Ahidouch, A., Sevestre, H., & Ouadid-Ahidouch, H. (2011). Down-regulation of Orai3 arrests cell-cycle progression and induces apoptosis in breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells. *Journal of Cellular Physiology*, 226(2), 542–551.
- Faouzi, M., Kischel, P., Hague, F., Ahidouch, A., Benzerdjeb, N., Sevestre, H., Penner, R., & Ouadid-Ahidouch, H. (2013). Orai3 silencing alters cell proliferation and cell cycle progression via c-myc pathway in breast cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833(3), 752–760.
- Fasolato, C., Hoth, M., & Penner, R. (1993). A GTP-dependent step in the activation mechanism of capacitative calcium influx. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(28).

- Fatherazi, S., Presland, R. B., Belton, C. M., Goodwin, P., Al-Qutub, M., Trbic, Z., MacDonald, G., Schubert, M. M., & Izutsu, K. T. (2007). Evidence that TRPC4 supports the calcium selective ICRC-like current in human gingival keratinocytes. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 453(6), 879–889.
- Feng, M., Grice, D. M., Faddy, H. M., Nguyen, N., Leitch, S., Wang, Y., Muend, S., Kenny, P. A., Sukumar, S., Roberts-Thomson, S. J., Monteith, G. R., & Rao, R. (2010). Store-independent activation of orai1 by SPCA2 in mammary tumors. *Cell*, 143(1), 84–98.
- Feske, S. (2009). Orai1 and STIM1 deficiency in human and mice: roles of store-operated Ca^{2+} entry in the immune system and beyond. *Immunological Reviews*, 231(1), 189–209.
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S. H., Tanasa, B., Hogan, P. G., Lewis, R. S., Daly, M., & Rao, A. (2006). A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*, 441(7090), 179–185.
- Feske, S., Skolnik, E. Y., & Prakriya, M. (2012). Ion channels and transporters in lymphocyte function and immunity. *Nature Reviews Immunology*, 12(7), 532–547.
- Fill, M., & Copello, J. A. (2002). Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiological Reviews*, 82(4), 893–922.
- Fiorio Pla, A., Kondratska, K., & Prevarskaya, N. (2016). STIM and Orai proteins: crucial roles in hallmarks of cancer. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 310(7), 509–519.
- Fiorio Pla, A., Ong, H. L., Cheng, K. T., Brossa, A., Bussolati, B., Lockwich, T., Paria, B., Munaron, L., & Ambudkar, I. S. (2012). TRPV4 mediates tumor-derived endothelial cell migration via arachidonic acid-activated actin remodeling. *Oncogene*, 31(2), 200–212.
- Fiorio Pla, A., Grange, C., Antoniotti, S., Tomatis, C., Merlino, A., Bussolati, B., & Munaron, L. (2008). Arachidonic acid-induced Ca^{2+} entry is involved in early steps of tumor angiogenesis. *Mol Cancer Res*, 6(4) 535-545.

- Frischauf, I., Muik, M., Derler, I., Bergsmann, J., Fahmer, M., Schindl, R., Groschner, K., & Romanin, C. (2009). Molecular determinants of the coupling between STIM1 and Orai channels: differential activation of Orai1-3 channels by a STIM1 coiled-coil mutant. *Journal of Biological Chemistry*, 284(32), 21696–21706.
- Frischauf, I., Schindl, R., Derler, I., Bergsmann, J., Fahrner, M., & Romanin, C. (2008). The STIM/Orai coupling machinery. *Channels*, 2(4), 261–268.
- Fukushima, M., Tomita, T., Janoshazi, A., & Putney, J. W. (2012). Alternative translation initiation gives rise to two isoforms of Orai1 with distinct plasma membrane mobilities. *Journal of Cell Science*, 125(18), 4354–4361.
- Furukawa, K. I., Tawada, Y., & Shigekawa, M. (1988). Regulation of the plasma membrane Ca^{2+} pump by cyclic nucleotides in cultured vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, 263(17), 8058–8065.
- Gachet, C. (2008). P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. *Thrombosis and Haemostasis*, 99(3), 466–472.
- Galán, C., Zbidi, H., Bartegi, A., Salido, G. M., & Rosado, J. A. (2009). STIM1, Orai1 and hTRPC1 are important for thrombin- and ADP-induced aggregation in human platelets. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 490(2), 137–144.
- Galione, A. (2011). NAADP Receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(1), 1–17.
- Galione, A., Parrington, J., & Funnell, T. (2011). Physiological roles of NAADP-mediated Ca^{2+} signaling. *Science China Life Sciences*, 54(8), 725–732.
- Ganz, P. A. (2005). Breast cancer, menopause, and long-term survivorship: critical issues for the 21st century. *American Journal of Medicine*, 118(12 SUPPL. 2), 136–141.
- Gao, Y. D., Hanley, P. J., Rinné, S., Zuzarte, M., & Daut, J. (2010). Calcium-activated K^{+} channel (KCa3.1) activity during Ca^{2+} store depletion and store-operated Ca^{2+} entry in human macrophages. *Cell Calcium*, 48(1), 19–27.
- Garcia-Estevez, L., & Moreno-Bueno, G. (2019). Updating the role of obesity and cholesterol in breast cancer. *Breast Cancer Research*, 21(1), 35.

- Garg, G., Kumar, D., Asim, M., Husain, S. A., Das, B. C., & Kar, P. (2016). Multiplex reverse transcriptase-PCR for simultaneous detection of hepatitis B, C, and E virus. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 6(1), 33–39.
- Garrido, R., Mattson, M. P., Hennig, B., & Toborek, M. (2001). Nicotine protects against arachidonic-acid-induced caspase activation, cytochrome c release and apoptosis of cultured spinal cord neurons. *Journal of Neurochemistry*, 76(5), 1395–1403.
- Gees, M., Colsoul, B., & Nilius, B. (2010). The role of transient receptor potential cation channels in Ca²⁺ signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(10).
- Geisler, D., Boyle, M., Malnar, K., McGee, J., Nolen, M., Fortner, S., & Broughan, T. (2000). Phyllodes tumors of the breast: a review of 32 cases. *The American Surgeon*, 66(4), 360–366.
- Gélébart, P., Martin, V., Enouf, J., & Papp, B. (2003). Identification of a new SERCA2 splice variant regulated during monocytic differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 303(2), 676–684.
- Giladi, M., Shor, R., Lisnyansky, M., & Khananshvil, D. (2016). Structure-functional basis of ion transport in sodium–calcium exchanger (NCX) proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(11).
- Goldenberg, N. M., Wang, L., Ranke, H., Liedtke, W., Tabuchi, A., & Kuebler, W. M. (2015). TRPV4 is required for hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Anesthesiology*, 122(6), 1338–1348.
- Greeb, J., & Shull, G. E. (1989). Molecular cloning of a third isoform of the calmodulin-sensitive plasma membrane Ca²⁺-transporting ATPase that is expressed predominantly in brain and skeletal muscle. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(31).
- Gregorio-Teruel, L., Valente, P., González-Ros, J. M., Fernández-Ballester, G., & Ferrer-Montiel, A. (2014). Mutation of I696 and W697 in the TRP box of vanilloid receptor subtype I modulates allosteric channel activation. *Journal of General Physiology*, 143(3), 361–375.

- Grice, D. M., Vetter, I., Faddy, H. M., Kenny, P. A., Roberts-Thomson, S. J., & Monteith, G. R. (2010). Golgi calcium pump secretory pathway calcium ATPase 1 (SPCA1) is a key regulator of Insulin-like Growth Factor Receptor (IGF1R) processing in the basal-like breast cancer cell line MDA-MB-231. *Journal of Biological Chemistry*, 285(48), 37458–37466.
- Gross, S. A., Wissenbach, U., Philipp, S. E., Freichel, M., Cavalié, A., & Flockerzi, V. (2007). Murine Orai2 splice variants form functional Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CRAC) channels. *Journal of Biological Chemistry*, 282(27), 19375–19384.
- Grunicke, H. H. (2009). Coordinated regulation of Ras-, Rac-, and Ca^{2+} -dependent signaling pathways. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 19(2), 139–169.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., & Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry*, 260(6), 3440–3450.
- Guatimosim, S., Amaya, M. J., Guerra, M. T., Aguiar, C. J., Goes, A. M., Gómez-Viquez, N. L., Rodrigues, M. A., Gomes, D. A., Martins-Cruz, J., Lederer, W. J., & Leite, M. F. (2008). Nuclear Ca^{2+} regulates cardiomyocyte function. *Cell Calcium*, 44(2), 230–242.
- Gueder, N., Allan, G., Telliez, M.-S., Hague, F., Fernandez, J. M., Sanchez-Fernandez, E. M., Ortiz-Mellet, C., Ahidouch, A., & Ouadid-Ahidouch, H. (2017). sp 2 -Iminosugar α -glucosidase inhibitor 1- C -octyl-2-oxa-3-oxocastanospermine specifically affected breast cancer cell migration through Stim1, β 1-integrin, and FAK signaling pathways. *Journal of Cellular Physiology*, 232(12), 3631–3640.
- Guéguinou, M., Harnois, T., Crottes, D., Uguen, A., Deliot, N., Gambade, A., Chantôme, A., Haelters, J. P., Jaffrès, P. A., Jourdan, M. L., Weber, G., Soriani, O., Bougnoux, P., Mignen, O., Bourmeyster, N., Constantin, B., Lecomte, T., Vandier, C., & Potier-Cartreau, M. (2016). SK3/TRPC1/Orai1 complex regulates SOCE-dependent colon cancer cell migration: a novel opportunity to modulate anti- EGFR mAb action by the alkyl-lipid Ohmlin. *Oncotarget*, 7(24), 36168–36184.
- Guilbert, A., Gautier, M., Dhennin-Duthille, I., Haren, N., Sevestre, H., & Ouadid-Ahidouch, H. (2009). Evidence that TRPM7 is required for breast cancer cell proliferation. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 297(3).

- Gwack, Y., Srikanth, S., Feske, S., Cruz-Guilloty, F., Oh-hora, M., Neems, D. S., Hogan, P. G., & Rao, A. (2007). Biochemical and functional characterization of orai proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 282(22), 16232–16243.
- Gwack, Y., Srikanth, S., Oh-hora, M., Hogan, P. G., Lamperti, E. D., Yamashita, M., Gelinias, C., Neems, D. S., Sasaki, Y., Feske, S., Prakriya, M., Rajewsky, K., & Rao, A. (2008). Hair loss and defective T-and B-cell function in mice lacking Orai1. *Molecular and Cellular Biology*, 28(17), 5209–5222.
- Hamajima, N., Hirose, K., Tajima, K., Rohan, T., Friedenreich, C. M., Calle, E. E., Gapstur, S. M., Patel, A. V., Coates, R. J., Liff, J. M., Talamini, R., Chantarakul, N., Koetsawang, S., Rachawat, D., Marcou, Y., Kakouri, E., Duffy, S. W., Morabia, A., Schuman, L., ... Fukao, A. (2012). Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *The Lancet Oncology*, 13(11), 1141–1151.
- Hammadi, M., Chopin, V., Matifat, F., Dhennin-Duthille, I., Chasseraud, M., Sevestre, H., & Ouadid-Ahidouch, H. (2012). Human ether à-gogo K⁺ channel 1 (hEag1) regulates MDA-MB-231 breast cancer cell migration through Orai1-dependent calcium entry. *Journal of Cellular Physiology*, 227(12), 3837–3846.
- Hammond, M. E. H., Hayes, D. F., Dowsett, M., Allred, D. C., Hagerty, K. L., Badve, S., Fitzgibbons, P. L., Francis, G., Goldstein, N. S., Hayes, M., Hicks, D. G., Lester, S., Love, R., Mangu, P. B., McShane, L., Miller, K., Osborne, C. K., Paik, S., Perlmutter, J., ... Wolff, A. C. (2010). American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28(16), 2784–2795.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
- Hardie, R. C., & Minke, B. (1992). The trp gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron*, 8(4), 643–651.

- Hartmann, L. C., Sellers, T. A., Frost, M. H., Lingle, W. L., Degnim, A. C., Ghosh, K., Vierkant, R. A., Maloney, S. D., Pankratz, V. S., Hillman, D. W., Suman, V. J., Johnson, J., Blake, C., Tlsty, T., Vachon, C. M., Melton, L. J., & Visscher, D. W. (2005). Benign breast disease and the risk of breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 353(3), 229–237.
- Hasna, J., Hague, F., Rodat-Despoix, L., Geerts, D., Leroy, C., Tulasne, D., Ouadid-Ahidouch, H., & Kischel, P. (2018). Orai3 calcium channel and resistance to chemotherapy in breast cancer cells: the p53 connection. *Cell Death and Differentiation*, 25(4), 691–705.
- Hatanaka, H., & Amano, T. (1981). A mouse neuroblastoma × rat glioma hybrid cell produces immunoreactive substance P-like material. *Brain Research*, 215(1–2), 305–316.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., & Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 387(6630), 296–299.
- Hawkins, B. J., Irrinki, K. M., Mallilankaraman, K., Lien, Y. C., Wang, Y., Bhanumathy, C. D., Subbiah, R., Ritchie, M. F., Soboloff, J., Baba, Y., Kurosaki, T., Joseph, S. K., Gill, D. L., & Madesh, M. (2010). S-glutathionylation activates STIM1 and alters mitochondrial homeostasis. *Journal of Cell Biology*, 190(3), 391–405.
- He, W., & Hu, Z. (2012). The role of the golgi-resident SPCA $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ pump in ionic homeostasis and neural function. *Neurochemical Research*, 37(3), 455–468.
- Heller, S. L., Lin, L. L. Y., Melsaether, A. N., Moy, L., & Gao, Y. (2018). Hormonal effects on breast density, fibroglandular tissue, and background parenchymal enhancement. *Radiographics*, 38(4), 983–996.
- Hellmich, U. A., & Gaudet, R. (2014). Structural biology of TRP channels. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 223, 963–990.
- Hennager, D. J., Welsh, M. J., & DeLisle, S. (1995). Changes in either cytosolic or nucleoplasmic inositol 1,4,5-trisphosphate levels can control nuclear Ca^{2+} concentration. *Journal of Biological Chemistry*, 270(10), 4959–4962.
- Hewavitharana, T., Deng, X., Soboloff, J., & Gill, D. L. (2007). Role of STIM and Orai proteins in the store-operated calcium signaling pathway. *Cell Calcium*, 42(2), 173–182.

- Hiani, Y. El, Ahidouch, A., Roudbaraki, M., Guenin, S., Brûlé, G., & Ouadid-Ahidouch, H. (2006). Calcium-sensing receptor stimulation induces nonselective cation channel activation in breast cancer cells. *Journal of Membrane Biology*, 211(2), 127–137.
- Hickey, M., McNamara, H. C., & Mishra, G. D. (2018). Menopausal estrogen therapy and breast cancer mortality. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 319(2), 193.
- Hille, B. (1992). Ionic channels of excitable membranes, Ed 2. *FEBS Letters*.
- Hiranita, T. (2016). Identification of the Sigma-2 Receptor: distinct from the Progesterone Receptor Membrane Component 1 (PGRMC1). *Journal of Alcoholism and Drug Dependence*, 4.
- Hofer, A. M., Fasolato, C., & Pozzan, T. (1998). Capacitative Ca^{2+} entry is closely linked to the filling state of internal Ca^{2+} stores: a study using simultaneous measurements of I(CRAC) and intraluminal $[\text{Ca}^{2+}]$. *Journal of Cell Biology*, 140(2), 325–334.
- Hofmann, F., James, P., Vorherr, T., & Carafolub, E. (1993). The C-terminal domain of the plasma membrane Ca^{2+} pump contains three high affinity Ca^{2+} binding sites. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(14).
- Hogan, P G, Chen, L., Nardone, J., & Anjana, Rao. (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.*, 17(18), 2205–2232.
- Hogan, P. G. (2015). The STIM1-Orai1 microdomain. *Cell Calcium*, 58(4), 357–367.
- Hon Cheung Lee, & Aarhus, R. (1995). A derivative of NADP mobilizes calcium stores insensitive to inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose. *Journal of Biological Chemistry*, 270(5), 2152–2157.
- Hooper, R., Samakai, E., Kedra, J., & Soboloff, J. (2013). Multifaceted roles of STIM proteins. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 465(10), 1383–1396.
- Hoth, M., & Penner, R. (1993). Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *The Journal of Physiology*, 465(1), 359–386.

- Hoth, M. (1995). Calcium and barium permeation through calcium release-activated calcium (CRAC) channels. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 430(3), 315–322.
- Hoth, M., & Niemeyer, B. A. (2013). The neglected CRAC proteins: Orai2, Orai3, and STIM2. *Current Topics in Membranes*, 71, 237–271.
- Hoth, M., & Penner, R. (1992). Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*, 355(6358), 353–356.
- Hou, X., Pedi, L., Diver, M. M., & Long, S. B. (2012). Crystal structure of the calcium release-activated calcium channel orai. *Science*, 338(6112), 1308–1313.
- Howie, D., Nolan, K. F., Daley, S., Butterfield, E., Adams, E., Garcia-Rueda, H., Thompson, C., Saunders, N. J., Cobbold, S. P., Tone, Y., Tone, M., & Waldmann, H. (2009). MS4A4B is a GPCR-associated membrane adapter, expressed by regulatory T cells, which modulates T cell activation. *The Journal of Immunology*, 183(7), 4197–4204.
- Hu, R., Warri, A., Jin, L., Zwart, A., Riggins, R. B., Fang, H.-B., & Clarke, R. (2015). NF- κ B signaling is required for XBP1 (unspliced and spliced)-mediated effects on antiestrogen responsiveness and cell fate decisions in breast cancer. *Am Soc Microbiol*, 35(2), 379–390.
- Hu, Z., Bonifas, J. M., Beech, J., Bench, G., Shigihara, T., Ogawa, H., Ikeda, S., Mauro, T., & Epstein, E. H. (2000). Mutations in ATP2C1, encoding a calcium pump, cause Hailey-Hailey disease. *Nature Genetics*, 24(1), 61–65.
- Huang, G. N., Zeng, W., Kim, J. Y., Yuan, J. P., Han, L., Muallem, S., & Worley, P. F. (2006). STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, Icrac and TRPC1 channels. *Nature Cell Biology*, 8(9), 1003–1010.
- Hunter, D. J. (2017). Oral contraceptives and the small increased risk of breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 377(23), 2276–2277.
- Inesi, G., Sumbilla, C., & Kirtley, M. E. (1990). Relationships of molecular structure and function in Ca²⁺-transport ATPase. *Physiological Reviews*, 70(3), 749–760.

- Irvine, R. F., McNulty, T. J., & Schell, M. J. (1999). Inositol 1, 3, 4, 5-tetrakisphosphate as a second messenger - a special role in neurones? *Chemistry and Physics of Lipids*, 98(1–2), 49–57.
- Ishibashi, K., Suzuki, M., & Imai, M. (2000). Molecular cloning of a novel form (two-repeat) protein related to voltage-gated sodium and calcium channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 270(2), 370–376.
- Islam, M. S. (2020). Calcium signaling: from basic to bedside. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1131, 1–6.
- Islami, F., Liu, Y., Jemal, A., Zhou, J., Weiderpass, E., Colditz, G., Boffetta, P., & Weiss, M. (2015). Breastfeeding and breast cancer risk by receptor status—a systematic review and meta-analysis. *Annals of Oncology*, 26(12), 2398–2407.
- Ivshina, A. V., George, J., Senko, O., Mow, B., Putti, T. C., Smeds, J., Lindahl, T., Pawitan, Y., Hall, P., Nordgren, H., Wong, J. E. L., Liu, E. T., Bergh, J., Kuznetsov, V. A., & Miller, L. D. (2006). Genetic reclassification of histologic grade delineates new clinical subtypes of breast cancer. *Cancer Research*, 66(21), 10292–10301.
- Jahn, H., Osther, P. J., Nielsen, E. H., Rasmussen, G., & Andersen, J. (1995). An electron microscopic study of clinical Paget's disease of the nipple. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 103(7–8), 628–634.
- James, P., Maedaq, M., Fischers, R., Vermall, A. K., Krebs, J., Pennistonll, J. T., Carafoli, E., & Ii, S. (1988). Identification and primary structure of a calmodulin binding domain of the Ca^{2+} pump of human erythrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(6).
- Jardin, I., Diez-Bello, R., Lopez, J. J., Redondo, P. C., Salido, G. M., Smani, T., & Rosado, J. A. (2018). TRPC6 channels are required for proliferation, migration and invasion of breast cancer cell lines by modulation of Orai1 and Orai3 surface exposure. *Cancers*, 10(9), 331.
- Jardin, I., G, L. J., Salido, G. M., & Rosado, J. A. (2009). Dynamic interaction of hTRPC6 with the Orai1-STIM1 complex or hTRPC3 mediates its role in capacitative or non-capacitative Ca^{2+} entry pathways. *Biochem. J*, 420, 267–276.

- Jardín, I., Lopez, J. J., Salido, G. M., & Rosado, J. A. (2008). Orai1 mediates the interaction between STIM1 and hTRPC1 and regulates the mode of activation of hTRPC1-forming Ca²⁺ channels. *Journal of Biological Chemistry*, 283(37), 25296–25304.
- Jardín, I., Lopez, J., Salido, G., & Rosado, J. (2018). Store-operated Ca²⁺ entry in breast cancer cells: remodeling and functional role. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 4053.
- Jardín, I., Redondo, P. C., Salido, G. M., & Rosado, J. A. (2008). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate enhances store-operated calcium entry through hTRPC6 channel in human platelets. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1783(1), 84–97.
- Jensen, E. C. (2012). The basics of western blotting. *The Anatomical Record: advances in integrative anatomy and evolutionary biology*, 295(3), 369–371.
- Jernigan, N. L. (2015). Smooth muscle acid-sensing ion channel 1: pathophysiological implication in hypoxic pulmonary hypertension. *Experimental Physiology*, 100(2), 111–120.
- Ji, W., Xu, P., Li, Z., Lu, J., Liu, L., Zhan, Y., Chen, Y., Hille, B., Xu, T., & Chen, L. (2008). Functional stoichiometry of the unitary calcium-release-activated calcium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(36), 13668–13673.
- Johnstone, L. S., Graham, S. J. L., & Dziadek, M. A. (2010). STIM proteins: integrators of signalling pathways in development, differentiation and disease. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(7), 1890–1903.
- Jones, M. E., Schoemaker, M. J., Wright, L. B., Ashworth, A., & Swerdlow, A. J. (2017). Smoking and risk of breast cancer in the Generations Study cohort. *Breast Cancer Research*, 19(1).
- Jousset, H., Frieden, M., & Demaurex, N. (2007). STIM1 knockdown reveals that store-operated Ca²⁺ channels located close to sarco/endoplasmic Ca²⁺ ATPases (SERCA) pumps silently refill the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 282(15), 11456–11464.

- Juhaszova, M., Church, P., Blaustein, M. P., & Stanley, E. F. (2000). Location of calcium transporters at presynaptic terminals. *European Journal of Neuroscience*, 12(3), 839–846.
- Kabe, Y., Nakane, T., Koike, I., Yamamoto, T., Sugiura, Y., Harada, E., Sugase, K., Shimamura, T., Ohmura, M., Muraoka, K., Yamamoto, A., Uchida, T., Iwata, S., Yamaguchi, Y., Krayukhina, E., Noda, M., Handa, H., Ishimori, K., Uchiyama, S., ... Suematsu, M. (2016). Haem-dependent dimerization of PGRMC1/Sigma-2 receptor facilitates cancer proliferation and chemoresistance. *Nature Communications*, 7(1), 1–13.
- Kaemmerer, E., Turner, D., Peters, A. A., Roberts-Thomson, S. J., & Monteith, G. R. (2018). An automated epifluorescence microscopy imaging assay for the identification of phospho-AKT level modulators in breast cancer cells. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 92, 13–19.
- Kalimutho, M., Nones, K., Srihari, S., Duijf, P. H. G., Waddell, N., & Khanna, K. K. (2019). Patterns of genomic instability in breast cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*, 40(3), 198–211.
- Kamer, K. J., Grabarek, Z., & Mootha, V. K. (2017). High-affinity cooperative Ca^{2+} binding by MICU 1– MICU 2 serves as an on–off switch for the uniporter. *EMBO Reports*, 18(8), 1397–1411.
- Kamer, K. J., Jiang, W., Kaushik, V. K., Mootha, V. K., & Grabarek, Z. (2019). Crystal structure of MICU2 and comparison with MICU1 reveal insights into the uniporter gating mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(9), 3546–3555.
- Kang, H. Y., Choi, Y. K., & Jeung, E. B. (2016). Inhibitory effect of progesterone during early embryonic development: suppression of myocardial differentiation and calcium-related transcriptome by progesterone in mESCs: progesterone disturb cardiac differentiation of mESCs through lower cytosolic Ca^{2+} . *Reproductive Toxicology*, 64, 169–179.
- Kar, P., & Parekh, A. B. (2015). Distinct spatial Ca^{2+} signatures selectively activate different NFAT transcription factor isoforms. *Molecular Cell*, 58(2), 232–243.

- Kar, P., Samanta, K., Kramer, H., Morris, O., Bakowski, D., & Parekh, A. B. (2014). Dynamic assembly of a membrane signaling complex enables selective activation of NFAT by orai1. *Current Biology*, 24(12), 1361–1368.
- Karakas, C. (2011). Paget's disease of the breast. *Journal of Carcinogenesis*, 10.
- Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., & Chambon, P. (1990). Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *The EMBO Journal*, 9(5), 1603–1614.
- Kawasaki, T., Lange, I., & Feske, S. (2009). A minimal regulatory domain in the C terminus of STIM1 binds to and activates Orai1 CRAC channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 385(1), 49–54.
- Kennedy, M. B. (2016). Synaptic signaling in learning and memory. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(2), 1–16.
- Key, T. J., Verkasalo, P. K., & Banks, E. (2001). Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncology*, 2(3), 133–140.
- Khananshvili, D. (1990). Distinction between the two basic mechanisms of cation transport in the cardiac $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchange system. *Biochemistry*, 29(10), 2437–2442.
- Khananshvili, D. (2013). The SLC8 gene family of sodium-calcium exchangers (NCX)-structure, function, and regulation in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2–3), 220–235.
- Khananshvili, D. (2014). Sodium-calcium exchangers (NCX): molecular hallmarks underlying the tissue-specific and systemic functions. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 466(1), 43–60.
- Kim, M. S., Zeng, W., Yuan, J. P., Shin, D. M., Worley, P. F., & Muallem, S. (2009). Native store-operated Ca^{2+} influx requires the channel function of Orai1 and TRPC1. *Journal of Biological Chemistry*, 284(15), 9733–9741.

- Kim, S. Y., Yang, D., Myeong, J., Ha, K., Kim, S. H., Park, E. J., Kim, I. G., Cho, N. H., Lee, K. P., Jeon, J. H., & So, I. (2013). Regulation of calcium influx and signaling pathway in cancer cells via TRPV6-Numb1 interaction. *Cell Calcium*, 53(2), 102–111.
- Kindman, L. A., Kim, S., McDonald, T. V., & Li, P. G. (1994). Characterization of a novel intracellular sphingolipid-gated Ca^{2+} -permeable channel from rat basophilic leukemia cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(18).
- Kirichok, Y., Krapivinsky, G., & Clapham, D. E. (2004). The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature*, 427(6972), 360–364.
- Knabben, L., & Mueller, M. D. (2017). Breast cancer and pregnancy. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 32(1).
- Knight, J. A., Fan, J., Malone, K. E., John, E. M., Lynch, C. F., Langballe, R., Bernstein, L., Shore, R. E., Brooks, J. D., Reiner, A. S., Woods, M., Liang, X., & Bernstein, J. L. (2017). Alcohol consumption and cigarette smoking in combination: a predictor of contralateral breast cancer risk in the WECARE study. *International Journal of Cancer*, 141(5), 916–924.
- Koboldt, D. C., Fulton, R. S., McLellan, M. D., Schmidt, H., Kalicki-Veizer, J., McMichael, J. F., Fulton, L. L., Dooling, D. J., Ding, L., Mardis, E. R., Wilson, R. K., Ally, A., Balasundaram, M., Butterfield, Y. S. N., Carlsen, R., Carter, C., Chu, A., Chuah, E., Chun, H. J. E., ... Palchik, J. D. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 490(7418), 61–70.
- Korzeniowski, M. K., Manjarrés, I. M., Varnai, P., & Balla, T. (2010). Activation of STIM1-Orai1 involves an intramolecular switching mechanism. *Science Signaling*, 3(148).
- Korzeniowski, M. K., Popovic, M. A., Szentpetery, Z., Varnai, P., Stojilkovic, S. S., & Balla, T. (2009). Dependence of STIM1/Orai1-mediated calcium entry on plasma membrane phosphoinositides. *Journal of Biological Chemistry*, 284(31), 21027–21035.
- Koss, D. J., Riedel, G., Bence, K., & Platt, B. (2013). Store-operated Ca^{2+} entry in hippocampal neurons: regulation by protein tyrosine phosphatase PTP1B. *Cell Calcium*, 53(2), 125–138.

- Kramer, R. M., & Sharp, J. D. (1995). Recent insights into the structure, function and biology of cPLA2. *Novel Molecular Approaches to Anti-Inflammatory Therapy*, (65–76).
- Kraschnewski, J., & Schmitz, K. (2017). Exercise in the prevention and treatment of breast cancer: what clinicians need to tell their patients. *Translational Journal of the American College of Sports Medicine*, 2(15), 92.
- Krietsch, T., Fernandes, M. S., Kero, J., Lösel, R., Heyens, M., Lam, E. W.-F., Huhtaniemi, I., Brosens, J. J., & Gellersen, B. (2006). Human homologs of the putative G protein-coupled membrane progesterin receptors (mPR α , β , and γ) localize to the endoplasmic reticulum and are not activated by progesterone. *Molecular Endocrinology*, 20(12), 3146–3164.
- Kwong, T. C., Liu, X., Hwei, L. O., & Ambudkar, I. S. (2008). Functional requirement for Orai1 in store-operated TRPC1-STIM1 channels. *Journal of Biological Chemistry*, 283(19), 12935–12940.
- Kyu, P. L., Yuan, J. P., Zeng, W., So, I., Worley, P. F., & Muallem, S. (2009). Molecular determinants of fast Ca²⁺-dependent inactivation and gating of the Orai channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(34), 14687–14692.
- Lacey, J. V., Kreimer, A. R., Buys, S. S., Marcus, P. M., Chang, S. C., Leitzmann, M. F., Hoover, R. N., Prorok, P. C., Berg, C. D., & Hartge, P. (2009). Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the prostate, lung, colorectal and ovarian (PLCO) cancer screening trial cohort. *BMC Cancer*, 9.
- Lacruz, R. S., & Feske, S. (2015). Diseases caused by mutations in Orai1 and STIM1. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1356(1), 45–79.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Lage, D., Sasseron, M. D. G., Arruda, L., Volpini, C. D. A., & Daldon, P. (2010). Paget's disease: the importance of the specialist. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 85(3), 365–367.

- Lagios, M. D., Westdahl, P. R., Rose, M. R., & Concannon, S. (1984). Paget's disease of the nipple. Alternative management in cases without or with minimal extent of underlying breast carcinoma. *Cancer*, 54(3), 545–551.
- Lecoecur, H. (2002). Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous endonucleases. *Experimental Cell Research*, 277(1), 1–14.
- Lee, A. G., & East, J. M. (2001). What the structure of a calcium pump tells us about its mechanism. *Biochem. J.*, (356).
- Lee, H. C. (2012). Cyclic ADP-ribose and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) as messengers for calcium mobilization. *Journal of Biological Chemistry*, 287(38), 31633–31640.
- Lee, K. P., Choi, S., Hong, J. H., Ahuja, M., Graham, S., Ma, R., So, I., Shin, D. M., Muallem, S., & Yuan, J. P. (2014). Molecular determinants mediating gating of transient receptor potential canonical (TRPC) channels by stromal interaction molecule 1 (STIM1). *Journal of Biological Chemistry*, 289(10), 6372–6382.
- Lefkimmatis, K., Srikanthan, M., Maiellaro, I., Moyer, M. P., Curci, S., & Hofer, A. M. (2009). Store-operated cyclic AMP signalling mediated by STIM1. *Nature Cell Biology*, 11(4), 433–442.
- Lehen'kyi, V., Raphaël, M., & Prevarskaya, N. (2012). The role of the TRPV6 channel in cancer. *Journal of Physiology*, 590(6), 1369–1376.
- Leon-Aparicio, D., Pacheco, J., Chavez-Reyes, J., Galindo, J. M., Valdes, J., Vaca, L., & Guerrero-Hernandez, A. (2017). Orai3 channel is the 2-APB-induced endoplasmic reticulum calcium leak. *Cell Calcium*, 65, 91–101.
- Li, S., Yao, M., Niu, C., Liu, D., Tang, Z., Gu, C., Zhao, H., Ke, J., Wu, S., Wang, X., & Wu, F. (2019). Inhibition of MCF-7 breast cancer cell proliferation by a synthetic peptide derived from the C-terminal sequence of Orai channel. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 516(4), 1066–1072.

- Li, Z., Lu, J., Xu, P., Xie, X., Chen, L., & Xu, T. (2007). Mapping the interacting domains of STIM1 and Orai1 in Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel activation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(40), 29448–29456.
- Liang, C. C., Park, A. Y., & Guan, J. L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*, 2(2), 329–333.
- Liang, M., Chini, E. N., Cheng, J., & Dousa, T. P. (1999). Synthesis of NAADP and cADPR in mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 371(2), 317–325.
- Liao, Y., Erxleben, C., Yildirim, E., Abramowitz, J., Armstrong, D. L., & Birnbaumer, L. (2007). Orai proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(11), 4682–4687.
- Linde, C. I., Di Leva, F., Domi, T., Tosatto, S. C. E., Brini, M., & Carafoli, E. (2008). Inhibitory interaction of the 14-3-3 proteins with ubiquitous (PMCA1) and tissue-specific (PMCA3) isoforms of the plasma membrane Ca^{2+} pump. *Cell Calcium*, 43(6), 550–561.
- Liou, J., Kim, M. L., Won, D. H., Jones, J. T., Myers, J. W., Ferrell, J. E., & Meyer, T. (2005). STIM is a Ca^{2+} sensor essential for Ca^{2+} -store-depletion-triggered Ca^{2+} influx. *Current Biology*, 15(13), 1235–1241.
- Lioudyno, M. I., Kozak, J. A., Penna, A., Safrina, O., Zhang, S. L., Sen, D., Roos, J., Stauderman, K. A., & Cahalan, M. D. (2008). Orai1 and STIM1 move to the immunological synapse and are up-regulated during T cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(6), 2011–2016.
- Lis, A., Peinelt, C., Beck, A., Parvez, S., Monteilh-Zoller, M., Fleig, A., & Penner, R. (2007). CRACM1, CRACM2, and CRACM3 Are store-operated Ca^{2+} channels with distinct functional properties. *Current Biology*, 17(9), 794–800.
- Liu, J. fu, Zhao, S. hua, & Wu, S. shan. (2013). Depleting NFAT1 expression inhibits the ability of invasion and migration of human lung cancer cells. *Cancer Cell International*, 13(1), 1–7.

- Liu, X., Wang, T., Wang, Y., Chen, Z., Hua, D., Yao, X., Ma, X., & Zhang, P. (2018). Orai1 is critical for Notch-driven aggressiveness under hypoxic conditions in triple-negative breast cancers. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1864(4), 975–986.
- Liu, X., Cheng, K. T., Bandyopadhyay, B. C., Pani, B., Dietrich, A., Paria, B. C., Swaim, W. D., Beech, D., Yildirim, E., Singh, B. B., Birnbaumer, L., & Ambudkar, I. S. (2007). Attenuation of store-operated Ca^{2+} current impairs salivary gland fluid secretion in TRPC1(-/-) mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(44), 17542–17547.
- Lloyd-Evans, E., Morgan, A. J., He, X., Smith, D. A., Elliot-Smith, E., Sillence, D. J., Churchill, G. C., Schuchman, E. H., Galione, A., & Platt, F. M. (2008). Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. *Nature Medicine*, 14(11), 1247–1255.
- Lloyd, J., & Flanagan, A. M. (2000). Mammary and extramammary Paget's disease. *Journal of Clinical Pathology*, 53(10), 742–749.
- Lodola, F., Laforenza, U., Cattaneo, F., Ruffinatti, F. A., Poletto, V., Massa, M., Tancredi, R., Zuccolo, E., Khdar, D. A., Riccardi, A., Biggiogera, M., Rosti, V., Guerra, G., & Moccia, F. (2017). VEGF-induced intracellular Ca^{2+} oscillations are down-regulated and do not stimulate angiogenesis in breast cancer-derived endothelial colony forming cells. *Oncotarget*, 8(56), 95223–95246.
- Lopes Filho, L. L., Lopes, I. M. R. S., Lopes, L. R. S., Enokihara, M. M. S. S., Michalany, A. O., & Matsunaga, N. (2015). Mammary and extramammary Paget's disease. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 90(2), 219–231.
- López, E., Berna-Erro, A., Salido, G. M., Rosado, J. A., & Redondo, P. C. (2013). FKBP52 is involved in the regulation of SOCE channels in the human platelets and MEG 01 cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833(3), 652–662.
- López, J. J., Redondo, P. C., Salido, G. M., Pariente, J. A., & Rosado, J. A. (2009). N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine induces apoptosis through the activation of caspases-3 and -8 in human platelets. A role for endoplasmic reticulum stress. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7(6), 992–999.

- Lu, M., Bränström, R., Berglund, E., Höög, A., Björklund, P., Westin, G., Larsson, C., Farneboand, L. O., & Forsberg, L. (2010). Expression and association of TRPC subtypes with Orai1 and STIM1 in human parathyroid. *Journal of Molecular Endocrinology*, 44(5), 285–294.
- Luik, R. M., Wang, B., Prakriya, M., Wu, M. M., & Lewis, R. S. (2008). Oligomerization of STIM1 couples ER calcium depletion to CRAC channel activation. *Nature*, 454(7203), 538–542.
- Lytton, J., Westlin, M., Burk, S. E., Shull, G. E., & MacLennan, D. H. (1992). Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *Journal of Biological Chemistry*, 267(20), 14483–14489.
- Lyttons, J., & Macleennanq, D. H. (1988). Molecular cloning of cDNAs from human kidney coding for two alternatively spliced products of the cardiac Ca²⁺-ATPase gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(29).
- Ma, G., Wei, M., He, L., Liu, C., Wu, B., Zhang, S. L., Jing, J., Liang, X., Senes, A., Tan, P., Li, S., Sun, A., Bi, Y., Zhong, L., Si, H., Shen, Y., Li, M., Lee, M. S., Zhou, W., ... Zhou, Y. (2015). Inside-out Ca²⁺ signalling prompted by STIM1 conformational switch. *Nature Communications*, 6.
- Macian, F. (2005). NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nature Reviews Immunology*, 5(6), 472–484.
- MacLennan, D. H., Rice, W. J., & Green, N. M. (1997). The mechanism of Ca²⁺ transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases. *Journal of Biological Chemistry*, 272(46), 28815–28818.
- MacPhee, D. J. (2010). Methodological considerations for improving Western blot analysis. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 61(2), 171–177.
- Madl, J., Weghuber, J., Fritsch, R., Derler, I., Fahrner, M., Frischauf, I., Lackner, B., Romanin, C., & Schütz, G. J. (2010). Resting state Orai1 diffuses as homotetramer in the plasma membrane of live mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, 285(52), 41135–41142.

- Maeda, N., Niinobe, M., & Mikoshiba, K. (1990). A cerebellar Purkinje cell marker P400 protein is an inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP3) receptor protein. Purification and characterization of InsP3 receptor complex. *The EMBO Journal*, 9(1), 61.
- Maia, R. C., Culver, C. A., & Laster, S. M. (2006). Evidence against calcium as a mediator of mitochondrial dysfunction during apoptosis induced by arachidonic acid and other free fatty acids. *The Journal of Immunology*, 177(9), 6398–6404.
- Makvandi, M., Tilahun, E. D., Lieberman, B. P., Anderson, R. C., Zeng, C., Xu, K., Hou, C., McDonald, E. S., Pryma, D. A., & Mach, R. H. (2015). The sigma-2 receptor as a therapeutic target for drug delivery in triple negative breast cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 467(4), 1070–1075.
- Malleter, M., Tauzin, S., Bessede, A., Castellano, R., Goubard, A., Godey, F., Levêque, J., Jézéquel, P., Campion, L., Campone, M., Ducret, T., MacGrogan, G., Debure, L., Collette, Y., Vacher, P., & Legembre, P. (2013). CD95L cell surface cleavage triggers a prometastatic signaling pathway in triple-negative breast cancer. *Cancer Research*, 73(22), 6711–6721.
- Mallilankaraman, K., Doonan, P., Cárdenas, C., Chandramoorthy, H. C., Müller, M., Miller, R., Hoffman, N. E., Gandhirajan, R. K., Molgó, J., Birnbaum, M. J., Rothberg, B. S., Mak, D. O. D., Foskett, J. K., & Madesh, M. (2012). MICU1 is an essential gatekeeper for mcu-mediated mitochondrial Ca²⁺ uptake that regulates cell survival. *Cell*, 151(3), 630–644.
- Mancarella, S., Wang, Y., Deng, X., Landesberg, G., Scalia, R., Panettieri, R. A., Mallilankaraman, K., Tang, X. D., Madesh, M., & Gill, D. L. (2011). Hypoxia-induced acidosis uncouples the STIM-orai calcium signaling complex. *Journal of Biological Chemistry*, 286(52), 44788–44798.
- Mancarella, S., Wang, Y., & Gill, D. L. (2011). Signal transduction: STIM1 senses both Ca²⁺ and heat. *Nature Chemical Biology*, 7(6), 344–345.
- Manda, K. R., Tripathi, P., Hsi, A. C., Ning, J., Ruzinova, M. B., Liapis, H., Bailey, M., Zhang, H., Maher, C. A., Humphrey, P. A., Andriole, G. L., Ding, L., You, Z., & Chen, F. (2016). NFATc1 promotes prostate tumorigenesis and overcomes PTEN loss-induced senescence. *Oncogene*, 35(25), 3282–3292.

- Mandavilli, S., Singh, B. B., & Sahmoun, A. E. (2012). Serum calcium levels, TRPM7, TRPC1, microcalcifications, and breast cancer using breast imaging reporting and data system scores. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 5(1), 1.
- Manders, E. M. M., Verbeek, F. J., & Aten, J. A. (1993). Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *Journal of Microscopy*, 169(3), 375–382.
- Mao, C., Kim, S. H., Almenoff, J. S., Rudner, X. L., Kearney, D. M., & Kindman, L. A. (1996). Molecular cloning and characterization of SCaMPER, a sphingolipid Ca²⁺ release-mediating protein from endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(5), 1993–1996.
- Marinelli, F., Almagor, L., Hiller, R., Giladi, M., Khananshvili, D., & Faraldo-Gómez, J. D. (2014). Sodium recognition by the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in the outward-facing conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(50), E5354–E5362.
- Martelli, A. M., Bortul, R., Tabellini, G., Aluigi, M., Peruzzi, D., Bareggi, R., Narducci, P., & Cocco, L. (2001). Re-examination of the mechanisms regulating nuclear inositol lipid metabolism. *FEBS Letters*, 505(1), 1–6.
- Martin, A. C. L., Willoughby, D., Ciruela, A., Ayling, L. J., Pagano, M., Wachten, S., Tengholm, A., & Cooper, D. M. F. (2009). Capacitative Ca²⁺ entry via orai1 and stromal interacting molecule 1 (STIM1) regulates adenylyl cyclase type 8. *Molecular Pharmacology*, 75(4), 830–842.
- Martin, V., Bredoux, R., Corvazier, E., Van Gorp, R., Kovács, T., Gélébart, P., & Enouf, J. (2002). Three novel sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) 3 isoforms: expression, regulation, and function of the members of the SERCA3 family. *Journal of Biological Chemistry*, 277(27), 24442–24452.
- Maruyama, Y., Ogura, T., Mio, K., Kato, K., Kaneko, T., Kiyonaka, S., Mori, Y., & Sato, C. (2009). Tetrameric Orai1 is a teardrop-shaped molecule with a long, tapered cytoplasmic domain. *Journal of Biological Chemistry*, 284(20), 13676–13685.

- Masuda, H., Baggerly, K. A., Wang, Y., Zhang, Y., Gonzalez-Angulo, A. M., Meric-Bernstam, F., Valero, V., Lehmann, B. D., Pietenpol, J. A., Hortobagyi, G. N., Symmans, W. F., & Ueno, N. T. (2013). Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes. *Clinical Cancer Research*, 19(19), 5533–5540.
- Matsuoka, S., Nicoll, D. A., Reilly, R. F., Hilgemann, D. W., & Philipson, K. D. (1993). Initial localization of regulatory regions of the cardiac sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(9), 3870–3874.
- Maul-Pavicic, A., Chiang, S. C. C., Rensing-Ehl, A., Jessen, B., Fauriat, C., Wood, S. M., Sjöqvist, S., Hufnagel, M., Schulze, I., Bass, T., Schamel, W. W., Fuchs, S., Pircher, H., McCarl, C. A., Mikoshiba, K., Schwarz, K., Feske, S., Bryceson, Y. T., & Ehl, S. (2011). Orai1-mediated calcium influx is required for human cytotoxic lymphocyte degranulation and target cell lysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(8), 3324–3329.
- Mayor, R., & Etienne-Manneville, S. (2016). The front and rear of collective cell migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(2), 97–109.
- McAndrew, D., Grice, D. M., Peters, A. A., Davis, F. M., Stewart, T., Rice, M., Smart, C. E., Brown, M. A., Kenny, P. A., Roberts-Thomson, S. J., & Monteith, G. R. (2011). Orai1-mediated calcium influx in lactation and in breast cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(3), 448–460.
- Mcnally, B. A., Somasundaram, A., Jairaman, A., Yamashita, M., & Prakriya, M. (2013). The C- and N-terminal STIM1 binding sites on Orai1 are required for both trapping and gating CRAC channels. *Journal of Physiology*, 591(11), 2833–2850.
- Meis, L., & Vianna, A. L. (1979). Energy interconversion by the Ca²⁺-dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annual Review of Biochemistry*, 48(1), 275–292.
- Meldolesi, J., & Pozzan, T. (1987). Pathways of Ca²⁺ influx at the plasma membrane: voltage-, receptor-, and second messenger-operated channels. *Experimental Cell Research*, 171(2), 271–283.

- Mellor, H., & Parker, P. J. (1998). The extended protein kinase C superfamily. *Biochemical Journal*, 332(2), 281–292.
- Mercer, J. C., DeHaven, W. I., Smyth, J. T., Wedel, B., Boyles, R. R., Bird, G. S., & Putney, J. W. (2006). Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, STIM1. *Journal of Biological Chemistry*, 281(34), 24979–24990.
- Metzler, B., Hu, Y., Sturm, G., Wick, G., & Xu, Q. (1998). Induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 by arachidonic acid in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, 273(50), 33320–33326.
- Michell, R. H. (1975). Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *BBA - Reviews on Biomembranes*, 415(1), 81–147.
- Miederer, A. M., Alansary, D., Schwär, G., Lee, P. H., Jung, M., Helms, V., & Niemeyer, B. A. (2015). A STIM2 splice variant negatively regulates store-operated calcium entry. *Nature Communications*, 6.
- Mignen, O., & Shuttleworth, T. J. (2000). I(ARC), a novel arachidonate-regulated, noncapacitative Ca^{2+} entry channel. *Journal of Biological Chemistry*, 275(13), 9114–9119.
- Mignen, O., Thompson, J. L., & Shuttleworth, T. J. (2007). STIM1 regulates Ca^{2+} entry via arachidonate-regulated Ca^{2+} -selective (ARC) channels without store depletion or translocation to the plasma membrane. *Journal of Physiology*, 579(3), 703–715.
- Mignen, O., Thompson, J. L., & Shuttleworth, T. J. (2008). Both Orai1 and Orai3 are essential components of the arachidonate-regulated Ca^{2+} -selective (ARC) channels. *Journal of Physiology*, 586(1), 185–195.
- Mignen, O., Thompson, J. L., & Shuttleworth, T. J. (2009). The molecular architecture of the arachidonate-regulated Ca^{2+} -selective ARC channel is a pentameric assembly of Orai1 and Orai3 subunits. *Journal of Physiology*, 587(17), 4181–4197.
- Minke, B., & Cook, B. (2002). TRP channel proteins and signal transduction. *Physiological Reviews*, 82(2), 429–472.

- Møller, J. V., Olesen, C., Winther, A. M. L., & Nissen, P. (2010). The sarcoplasmic Ca^{2+} -ATPase: design of a perfect chemi-osmotic pump. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 43(4), 501–566.
- Monteith, G. R., Wanigasekara, Y., & Roufogalis, B. D. (1998). The plasma membrane calcium pump, its role and regulation: new complexities and possibilities. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 40(4), 183–190.
- Montell, C., Birnbaumer, L., & Flockerzi, V. (2002). The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell*, 108(5), 595–598.
- Montero, M., Alonso, M. T., Carnicero, E., Cuchillo-Ibáñez, I., Albillos, A., García, A. G., García-Sancho, J., & Alvarez, J. (2000). Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca^{2+} transients that modulate secretion. *Nature Cell Biology*, 2(2), 57–61.
- Mook, S., Schmidt, M. K., Rutgers, E. J., van de Velde, A. O., Visser, O., Rutgers, S. M., Armstrong, N., van't Veer, L. J., & Ravdin, P. M. (2009). Calibration and discriminatory accuracy of prognosis calculation for breast cancer with the online Adjuvant! Program: a hospital-based retrospective cohort study. *The Lancet Oncology*, 10(11), 1070–1076.
- Morgan, A. J., Platt, F. M., Lloyd-Evans, E., & Galione, A. (2011). Molecular mechanisms of endolysosomal Ca^{2+} signalling in health and disease. *Biochemical Journal*, 439(3), 349–374.
- Mori, Y., Wakamori, M., Miyakawa, T., Hermosura, M., Hara, Y., Nishida, M., Hirose, K., Mizushima, A., Kurosaki, M., Mori, E., Gotoh, K., Okada, T., Fleig, A., Penner, R., Iino, M., & Kurosaki, T. (2002). Transient receptor potential 1 regulates capacitative Ca^{2+} entry and Ca^{2+} release from endoplasmic reticulum in B lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 195(6), 673–681.
- Motiani, R. K., Abdullaev, I. F., & Trebak, M. (2010). A novel native store-operated calcium channel encoded by Orai3: selective requirement of Orai3 versus Orai1 in estrogen receptor-positive versus estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 285(25), 19173–19183.

- Motiani, R. K., Stolwijk, J. A., Newton, R. L., Zhang, X., & Trebak, M. (2013). Emerging roles of Orai3 in pathophysiology. *Channels*, 7(5), 392–401.
- Motiani, R. K., Zhang, X., Harmon, K. E., Keller, R. S., Matrougui, K., Bennett, J. A., & Trebak, M. (2013). Orai3 is an estrogen receptor α -regulated Ca^{2+} channel that promotes tumorigenesis. *FASEB Journal*, 27(1), 63–75.
- Muallem, S., Beeker, T., & Pandol, S. J. (1988). Role of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange and the plasma membrane Ca^{2+} pump in hormone-mediated Ca^{2+} efflux from pancreatic acini. *The Journal of Membrane Biology*, 102(2), 153–162.
- Muik, M., Fahrner, M., Derler, I., Schindl, R., Bergsmann, J., Frischauf, I., Groschner, K., & Romanin, C. (2009). A cytosolic homomerization and a modulatory domain within STIM1 C terminus determine coupling to Orai1 channels. *Journal of Biological Chemistry*, 284(13), 8421–8426.
- Muik, M., Fahrner, M., Schindl, R., Stathopoulos, P., Frischauf, I., Derler, I., Plenk, P., Lackner, B., Groschner, K., Ikura, M., & Romanin, C. (2011). STIM1 couples to Orai1 via an intramolecular transition into an extended conformation. *EMBO Journal*, 30(9), 1678–1689.
- Muik, M., Frischauf, I., Derler, I., Fahrner, M., Bergsmann, J., Eder, P., Schindl, R., Hesch, C., Polzinger, B., Fritsch, R., Kahr, H., Madl, J., Gruber, H., Groschner, K., & Romanin, C. (2008). Dynamic coupling of the putative coiled-coil domain of Orai1 with STIM1 mediates Orai1 channel activation. *Journal of Biological Chemistry*, 283(12), 8014–8022.
- Mullins, F. M., Chan, Y. P., Dolmetsch, R. E., & Lewis, R. S. (2009). STIM1 and calmodulin interact with Orai1 to induce Ca^{2+} -dependent inactivation of CRAC channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(36), 15495–15500.
- Nabbi, A., & Riabowol, K. (2015). Rapid isolation of nuclei from cells in vitro. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2015(8), 769–772.
- Newton, A. C., Bootman, M. D., & Scott, J. (2016). Second messengers. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(8).

- Neyses, L., Reinlib, L., & Carafoli, E. (1985). Phosphorylation of the Ca^{2+} -pumping ATPase of heart sarcolemma and erythrocyte plasma membrane by the CAMP-dependent protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(18).
- Nicoll, D. A., Ottolia, M., & Philipson, K. D. (2006). Toward a topological model of the NCX1 exchanger. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 976(1), 11–18.
- Nicoll, D. A., Sawaya, M. R., Kwon, S., Cascio, D., Philipson, K. D., & Abramson, J. (2006). The crystal structure of the primary Ca^{2+} sensor of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger reveals a novel Ca^{2+} binding motif. *Journal of Biological Chemistry*, 281(31), 21577–21581.
- Niggli, V., & Adunyahffj, E. S. (1981). Purified (Ca^{2+} - Mg^{2+})-ATPase of the erythrocyte membrane. Reconstitution and effect of calmodulin and phospholipids. *Journal of Biological Chemistry*, 256(1).
- Niggli, V., Adunyahs, E. S., & Carafoli, E. (1981). Acidic phospholipids, unsaturated fatty acids, and limited proteolysis mimic the effect of calmodulin on the purified erythrocyte Ca^{2+} -ATPase. *American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 256(16).
- Nik-Zainal, S., Davies, H., Staaf, J., Ramakrishna, M., Glodzik, D., Zou, X., Martincorena, I., Alexandrov, L. B., Martin, S., Wedge, D. C., Van Loo, P., Ju, Y. S., Smid, M., Brinkman, A. B., Morganella, S., Aure, M. R., Lingjærde, O. C., Langerød, A., Ringnér, M., ... Stratton, M. R. (2016). Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature*, 534(7605), 47–54.
- Nik-Zainal, S., & Morganella, S. (2017). Mutational signatures in breast cancer: the problem at the DNA level. *Clinical Cancer Research*, 23(11), 2617–2629.
- Nishizuka, Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*, 258(5082), 607–614.
- Noble, J. E., Knight, A. E., Reason, A. J., Di Matola, A., & Bailey, M. J. A. (2007). A comparison of protein quantitation assays for biopharmaceutical applications. *Molecular Biotechnology*, 37(2), 99–111.

- Oh-hora, M., Yamashita, M., Hogan, P. G., Sharma, S., Lamperti, E., Chung, W., Prakriya, M., Feske, S., & Rao, A. (2008). Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance. *Nature Immunology*, 9(4), 432–443.
- Ohba, T., Watanabe, H., Murakami, M., Takahashi, Y., Iino, K., Kuromitsu, S., Mori, Y., Ono, K., Iijima, T., & Ito, H. (2007). Upregulation of TRPC1 in the development of cardiac hypertrophy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 42(3), 498–507.
- Ohkubo, T., & Yamazaki, J. (2012). T-type voltage-activated calcium channel Cav3.1, but not Cav3.2, is involved in the inhibition of proliferation and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *International Journal of Oncology*, 41(1), 267–275.
- Okamura, H., Aramburu, J., García-Rodríguez, C., Viola, J. P. B., Raghavan, A., Tahliliani, M., Zhang, X., Qin, J., Hogan, P. G., & Rao, A. (2000). Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Molecular Cell*, 6(3), 539–550.
- Oláh, T., Fodor, J., Ruzsnavszky, O., Vincze, J., Berbey, C., Allard, B., & Csernoch, L. (2011). Overexpression of transient receptor potential canonical type 1 (TRPC1) alters both store operated calcium entry and depolarization-evoked calcium signals in C2C12 cells. *Cell Calcium*, 49(6), 415–425.
- Olesen, C., Picard, M., Winther, A. M. L., Gyruup, C., Morth, J. P., Oxvig, C., Møller, J. V., & Nissen, P. (2007). The structural basis of calcium transport by the calcium pump. *Nature*, 450(7172), 1036–1042.
- Olesen, C., Sørensen, T. L. M., Nielsen, R. C., Møller, J. V., & Nissen, P. (2004). Dephosphorylation of the calcium pump coupled to counterion occlusion. *Science*, 306(5705), 2251–2255.
- Olivieri, M., Amata, E., Vinciguerra, S., Fiorito, J., Giurdanella, G., Drago, F., Caporarello, N., Prezzavento, O., Arena, E., Salerno, L., Rescifina, A., Lupo, G., Anfuso, C. D., & Marrazzo, A. (2016). Antiangiogenic effect of (±)-haloperidol metabolite II valproate ester [(±)-MRJF22] in human microvascular retinal endothelial cells. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(21), 9960–9966.

- 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., Gill, D., & Ambudkar, I. S. (2007). Dynamic assembly of TRPC1/STIM1/Orai1 ternary complex is involved in store operated calcium influx: evidence for similarities in SOC and CRAC channel components. *J Biol Chem*, 282(12):9105-9116.
- Osowski, C. M., & Urano, F. (2011). Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Methods in Enzymology*, 490(C), 71–92.
- Owens, H., Gamble, G. D., Bjornholdt, M. C., Boyce, N. K., & Keung, L. (2007). Hailey-Hailey disease is caused by mutations in ATP2C1 encoding a novel Ca²⁺ pump. *Cornea*, 26(3), 312–318.
- Oxenoid, K., Dong, Y., Cao, C., Cui, T., Sancak, Y., Markhard, A. L., Grabarek, Z., Kong, L., Liu, Z., Ouyang, B., Cong, Y., Mootha, V. K., & Chou, J. J. (2016). Architecture of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 533, 269–273.
- Palty, R., Raveh, A., Kaminsky, I., Meller, R., & Reuveny, E. (2012). SARAF inactivates the store operated calcium entry machinery to prevent excess calcium refilling. *Cell*, 149(2), 425–438.
- Palty, R., Silverman, W. F., Hershinkel, M., Caporale, T., Sensi, S. L., Parnis, J., Nolte, C., Fishman, D., Shoshan-Barmatz, V., Herrmann, S., Khananshvili, D., & Sekler, I. (2010). NCLX is an essential component of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(1), 436–441.
- Palty, R., Stanley, C., & Isacoff, E. Y. (2015). Critical role for Orai1 C-terminal domain and TM4 in CRAC channel gating. *Cell Research*, 25(8), 963–980.
- Paredes, R. M., Etzler, J. C., Watts, L. T., Zheng, W., & Lechleiter, J. D. (2008). Chemical calcium indicators. *Methods*, 46(3), 143–151.
- Parekh, A. B., & Penner, R. (1997). Store depletion and calcium influx. *Physiological Reviews*, 77(4), 901–930.
- Parekh, A. B., & Putney, J. W. (2005). Store-operated calcium channels. *Physiological Reviews*, 85(2), 757–810.

- Park, C. Y., Hoover, P. J., Mullins, F. M., Bachhawat, P., Covington, E. D., Raunser, S., Walz, T., Garcia, K. C., Dolmetsch, R. E., & Lewis, R. S. (2009). STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell*, 136(5), 876–890.
- Park, C. Y., Shcheglovitov, A., & Dolmetsch, R. (2010). The CRAC channel activator STIM1 binds and inhibits L-type voltage-gated calcium channels. *Science*, 330(6000), 101–105.
- Parkash, J., & Asotra, K. (2010). Calcium wave signaling in cancer cells. *Life Sciences*, 87(19–22), 587–595.
- Parvez, S., Beck, A., Peinelt, C., Soboloff, J., Lis, A., Monteilh-Zoller, M., Gill, D. L., Fleig, A., & Penner, R. (2008). STIM2 protein mediates distinct store-dependent and store-independent modes of CRAC channel activation. *The FASEB Journal*, 22(3), 752–761.
- Parys, J. B., & De Smedt, H. (2012). Inositol 1,4,5-trisphosphate and its receptors. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 740, 255–279.
- Patel, S., Ramakrishnan, L., Rahman, T., Hamdoun, A., Marchant, J. S., Taylor, C. W., & Brailoiu, E. (2011). The endo-lysosomal system as an NAADP-sensitive acidic Ca²⁺ store: role for the two-pore channels. *Cell Calcium*, 50(2), 157–167.
- Pathak, T., & Trebak, M. (2018). Mitochondrial Ca²⁺ signaling. *Pharmacology and Therapeutics*, 192, 112–123.
- Pati, M. L., Groza, D., Riganti, C., Kopecka, J., Niso, M., Berardi, F., Hager, S., Heffeter, P., Hirai, M., Tsugawa, H., Kabe, Y., Suematsu, M., & Abate, C. (2017). Sigma-2 receptor and progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) are two different proteins: proofs by fluorescent labeling and binding of sigma-2 receptor ligands to PGRMC1. *Pharmacological Research*, 117, 67–74.
- Pati, M. L., Hornick, J. R., Niso, M., Berardi, F., Spitzer, D., Abate, C., & Hawkins, W. (2017). Sigma-2 receptor agonist derivatives of 1-Cyclohexyl-4-[3-(5-methoxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl)propyl]piperazine (PB28) induce cell death via mitochondrial superoxide production and caspase activation in pancreatic cancer. *BMC Cancer*, 17(1).

- Patron, M., Checchetto, V., Raffaello, A., Teardo, E., VecellioReane, D., Mantoan, M., Granatiero, V., Szabò, I., DeStefani, D., & Rizzuto, R. (2014). MICU1 and MICU2 finely tune the mitochondrial Ca^{2+} uniporter by exerting opposite effects on MCU activity. *Molecular Cell*, 53(5), 726–737.
- Peel, S. E., Liu, B., & Hall, I. P. (2008). Orai and store-operated calcium influx in human airway smooth muscle cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 38(6), 744–749.
- Peluso, J. J., Fernandez, G., Pappalardo, A., & White, B. A. (2002). Membrane-initiated events account for progesterone's ability to regulate intracellular free calcium levels and inhibit rat granulosa cell mitosis. *Biology of Reproduction*, 67(2), 379–385.
- Penna, A., Demuro, A., Yeromin, A. V., Zhang, S. L., Safrina, O., Parker, I., & Cahalan, M. D. (2008). The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers. *Nature*, 456(7218), 116–120.
- Peppercorn, J., Perou, C. M., & Carey, L. A. (2008). Molecular subtypes in breast cancer evaluation and management: divide and conquer. *Cancer Investigation*, 26(1), 1–10.
- Pereira, B., Chin, S. F., Rueda, O. M., Vollan, H. K. M., Provenzano, E., Bardwell, H. A., Pugh, M., Jones, L., Russell, R., Sammut, S. J., Tsui, D. W. Y., Liu, B., Dawson, S. J., Abraham, J., Northen, H., Peden, J. F., Mukherjee, A., Turashvili, G., Green, A. R., ... Caldas, C. (2016). The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refines their genomic and transcriptomic landscapes. *Nature Communications*, 7.
- Peretti, M., Badaoui, M., Girault, A., Van Gulick, L., Mabile, M. P., Tebbakha, R., Sevestre, H., Morjani, H., & Ouadid-Ahidouch, H. (2019). Original association of ion transporters mediates the ECM-induced breast cancer cell survival: Kv10.1-Orai1-SPCA2 partnership. *Scientific Reports*, 9(1), 1–14.
- Periasamy, M., & Kalyanasundaram, A. (2007). SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle and Nerve*, 35(4), 430–442.

- Perou, C. M., Sørile, T., Eisen, M. B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S. S., Ress, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, Ø., Pergammenschlkov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A. L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747–752.
- Peters, A. A., Milevskiy, M. J. G., Lee, W. C., Curry, M. C., Smart, C. E., Saunus, J. M., Reid, L., Da Silva, L., Marcial, D. L., Dray, E., Brown, M. A., Lakhani, S. R., Roberts-Thomson, S. J., & Monteith, G. R. (2016). The calcium pump plasma membrane Ca^{2+} -ATPase 2 (PMCA2) regulates breast cancer cell proliferation and sensitivity to doxorubicin. *Scientific Reports*, 6(1), 1–13.
- Peters, A. A., Simpson, P. T., Bassett, J. J., Lee, J. M., Da Silva, L., Reid, L. E., Song, S., Parat, M.-O., Lakhani, S. R., Kenny, P. A., Roberts-Thomson, S. J., & Monteith, G. R. (2012). Therapeutic discovery calcium channel TRPV6 as a potential therapeutic target in estrogen receptor-negative breast cancer. *Mol Cancer Ther*, 11(10), 2158-2168.
- Philipp, S., Strauss, B., Hirnet, D., Wissenbach, U., Mé Ry, L., Flockerzi, V., & Hoth, M. (2003). TRPC3 mediates T-cell receptor-dependent calcium entry in human T-lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 26629-26638.
- Philipson, K. D., & Nicoll, D. A. (2000). Sodium-calcium exchange: a molecular perspective. *Annual Review of Physiology*, 62(1), 111–133.
- Picon-Ruiz, M., Morata-Tarifa, C., Valle-Goffin, J. J., Friedman, E. R., & Slingerland, J. M. (2017). Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: mechanistic insights and strategies for intervention. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67(5), 378–397.
- Pierro, C., Sneyers, F., Bultynck, G., & Roderick, H. L. (2019). ER Ca^{2+} release and store-operated Ca^{2+} entry – partners in crime or independent actors in oncogenic transformation? *Cell Calcium*, 82, 102061.
- Plovanich, M., Bogorad, R. L., Sancak, Y., Kamer, K. J., Strittmatter, L., Li, A. A., Girgis, H. S., Kuchimanchi, S., De Groot, J., Speciner, L., Taneja, N., OShea, J., Koteliansky, V., & Mootha, V. K. (2013). MICU2, a paralog of MICU1, resides within the mitochondrial uniporter complex to regulate calcium handling. *PLoS ONE*, 8(2).

- Podo, F., Buydens, L. M. C., Degani, H., Hilhorst, R., Klipp, E., Gribbestad, I. S., Van Huffel, S., W.M. van Laarhoven, H., Luts, J., Monleon, D., Postma, G. J., Schneiderhan-Marra, N., Santoro, F., Wouters, H., Russnes, H. G., Sørli, T., Tagliabue, E., & Børresen-Dale, A. L. (2010). Triple-negative breast cancer: present challenges and new perspectives. *Molecular Oncology*, 4(3), 209–229.
- Polyak, K., & Metzger Filho, O. (2012). SnapShot: breast cancer. *Cancer Cell*, 22(4), 562–562.
- Pozzan, T., Arslan, P., Tsien, R. Y., & Rink, T. J. (1982). Anti-immunoglobulin, cytoplasmic free calcium, and capping in B lymphocytes. *Journal of Cell Biology*, 94(2), 335–340.
- Prakriya, M., Feske, S., Gwack, Y., Srikanth, S., Rao, A., & Hogan, P. G. (2006). Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature*, 443(7108), 230–233.
- Prakriya, M., & Lewis, R. S. (2015). Store-operated calcium channels. *Physiological Reviews*, 95(4), 1383–1436.
- Prasad, V. V. T. S., & Gopalan, R. O. G. (2015). Continued use of MDA-MB-435, a melanoma cell line, as a model for human breast cancer, even in year, 2014. *npj Breast Cancer*, 1, 15002.
- Prevarskaya, N., Ouadid-Ahidouch, H., Skryma, R., & Shuba, Y. (2014). Remodelling of Ca²⁺ transport in cancer: how it contributes to cancer hallmarks? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1638).
- Prevarskaya, N., Skryma, R., & Shuba, Y. (2011). Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors. *Nature Reviews Cancer*, 11(8), 609–618.
- Prins, D., Groenendyk, J., Touret, N., & Michalak, M. (2011). Modulation of STIM1 and capacitative Ca²⁺ entry by the endoplasmic reticulum luminal oxidoreductase ERp57. *EMBO Reports*, 12(11), 1182–1188.
- Prins, D., & Michalak, M. (2011). Organellar calcium buffers. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(3), 1–16.
- Provenzano, E., Ulaner, G. A., & Chin, S. F. (2018). Molecular classification of breast cancer. *PET Clinics*, 13(3), 325–338.

- Prudent, J., Popgeorgiev, N., Gadet, R., Deygas, M., Rimokh, R., & Gillet, G. (2016). Mitochondrial Ca^{2+} uptake controls actin cytoskeleton dynamics during cell migration. *Scientific Reports*, 6(1), 1–13.
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A.-S., McNamara, J. O., & White, L. E. (2008). *Neuroscience*. 112-6.
- Pusztai, L., Mazouni, C., Anderson, K., Wu, Y., & Symmans, W. F. (2006). Molecular classification of breast cancer: limitations and potential. *The Oncologist*, 11(8), 868–877.
- Putney, J. W. (1990). Capacitative calcium entry revisited. Review article. *Cell Calcium*, 11(10), 611–624.
- Putney, J. W. (1999). Ca^{2+} stores and Ca^{2+} pools. En: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, *et al.*, editors. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*.
- Putney, J. W. (2004). The enigmatic TRPCs: multifunctional cation channels. *Trends in Cell Biology*, 14(6), 282–286.
- Putney, J. W. (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*, 7(1), 1–12.
- Putney, J. W. (2005). Capacitative calcium entry: sensing the calcium stores. *Journal of Cell Biology*, 169(3), 381–382.
- Putney, J. W., & Bird, G. S. J. (1993). The inositol phosphate-calcium signaling system in nonexcitable cells. *Endocrine Reviews*, 14(5), 610–631.
- Qin, F. (2007). Regulation of TRP ion channels by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Transient Receptor Potential (TRP) Channels*, 179(179), 509–525.
- Quintana, A., Pasche, M., Junker, C., Al-Ansary, D., Rieger, H., Kummerow, C., Nuñez, L., Villalobos, C., Meraner, P., Becherer, U., Rettig, J., Niemeyer, B. A., & Hoth, M. (2011). Calcium microdomains at the immunological synapse: how Orai channels, mitochondria and calcium pumps generate local calcium signals for efficient T-cell activation. *EMBO Journal*, 30(19), 3895–3912.

- Rabinovich, G. A., Gabrilovich, D., & Sotomayor, E. M. (2007). Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annual Review of Immunology*, 25(1), 267–296.
- Rana, A., Yen, M., Sadaghiani, A. M., Malmersjö, S., Park, C. Y., Dolmetsch, R. E., & Lewis, R. S. (2015). Alternative splicing converts STIM2 from an activator to an inhibitor of store-operated calcium channels. *Journal of Cell Biology*, 209(5), 653–670.
- Rashmi, K. C., Harsha Raj, M., Paul, M., Girish, K. S., Salimath, B. P., & Aparna, H. S. (2019). A new pyrrole based small molecule from *Tinospora cordifolia* induces apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells via ROS mediated mitochondrial damage and restoration of p53 activity. *Chemico-Biological Interactions*, 299, 120–130.
- Reaves, B. J., & Wolstenholme, A. J. (2007). The TRP channel superfamily: insights into how structure, protein-lipid interactions and localization influence function. *Biochemical Society Transactions*, 35(1), 77–80.
- Reeves, J. P., & Hale, C. C. (1984). The stoichiometry of the cardiac sodium-calcium exchange system. *Journal of Biological Chemistry*, 259(12), 7733–7739.
- Renart, J., Reiser, J., & Stark, G. R. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzylxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(7), 3116–3120.
- Rimessi, A., Coletto, L., Pinton, P., Rizzuto, R., Brini, M., & Carafoli, E. (2005). Inhibitory interaction of the 14-3-3 ϵ protein with isoform 4 of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase pump. *Journal of Biological Chemistry*, 280(44), 37195–37203.
- Rizzuto, R., Bernardi, P., & Pozzan, T. (2000). Mitochondria as all-round players of the calcium game. *Journal of Physiology*, 529(1), 37–47.
- Rizzuto, R., & Pozzan, T. (2006). Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences. *Physiological Reviews*, 86(1), 369–408.

- Roos, J., DiGregorio, P. J., Yeromin, A. V., Ohlsen, K., Liudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J. A., Wagner, S. L., Cahalan, M. D., Velicelebi, G., & Stauderman, K. A. (2005). STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca^{2+} channel function. *Journal of Cell Biology*, 169(3), 435–445.
- Rosado, J. A. (2017). Introduction: overview of the pathophysiological implications of store-operated calcium entry in mammalian cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 993, 391–395.
- Rosado, J. A., Brownlow, S. L., & Sage, S. O. (2002). Endogenously expressed Trp1 is involved in store-mediated Ca^{2+} entry by conformational coupling in human platelets. *Journal of Biological Chemistry*, 277(44), 42157–42163.
- Rosado, J. A., Diez, R., Smani, T., & Jardín, I. (2016). STIM and orai1 variants in store-operated calcium entry. *Frontiers in Pharmacology*, 6(JAN), 325.
- Rosado, J. A., & Sage, S. O. (2000). Regulation of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase by small GTPases and phosphoinositides in human platelets. *The Journal of biological chemistry*, 275(26), 19529–19535.
- Rosen, D., Lewis, A. M., Mizote, A., Thomas, J. M., Aley, P. K., Vasudevan, S. R., Parkesh, R., Galione, A., Izumi, M., Ganesan, A., & Churchill, G. C. (2009). Analogues of the nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) antagonist Ned-19 indicate two binding sites on the NAADP receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 284(50), 34930–34934.
- Rudolph, H. K., Antebi, A., Fink, G. R., Buckley, C. M., Dorman, T. E., LeVitre, J. A., Davidow, L. S., Mao, J. i., & Moir, D. T. (1989). The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in PMR1, a member of a Ca^{2+} ATPase family. *Cell*, 58(1), 133–145.
- Sage, S. O., Merritt, J. E., Hallam, T. J., & Rink, T. J. (1989). Receptor-mediated calcium entry in Fura-2-loaded human platelets stimulated with ADP and thrombin. Dual-wavelengths studies with Mn^{2+} . *Biochemical Journal*, 258(3), 923–926.
- Saitoh, N., Oritani, K., Saito, K., Yokota, T., Ichii, M., Sudo, T., Fujita, N., Nakajima, K., Okada, M., & Kanakura, Y. (2011). Identification of functional domains and novel binding partners of STIM proteins. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(1), 147–156.

- Samanta, K., Mirams, G. R., & Parekh, A. B. (2018). Sequential forward and reverse transport of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger generates Ca^{2+} oscillations within mitochondria. *Nature Communications*, 9(1).
- Samavat, H., & Kurzer, M. S. (2015). Estrogen metabolism and breast cancer. *Cancer Letters*, 356(2), 231–243.
- Samson, M. E., Adams, S. A., Mulatya, C. M., Zhang, J., Bennett, C. L., Hebert, J., & Steck, S. E. (2017). Types of oral contraceptives and breast cancer survival among women enrolled in Medicaid: a competing-risk model. *Maturitas*, 95, 42–49.
- Sanchez-Collado, J., Lopez, J. J., Jardin, I., Camello, P. J., Falcon, D., Regodon, S., Salido, G. M., Smani, T., & Rosado, J. A. (2019). Adenylyl cyclase type 8 overexpression impairs phosphorylation-dependent orai1 inactivation and promotes migration in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancers*, 11(11).
- Santella, L., & Kyojuka, K. (1997). Effects of 1-methyladenine on nuclear Ca^{2+} transients and meiosis resumption in starfish oocytes are mimicked by the nuclear injection of inositol 1,4,5-trisphosphate and cADP-ribose. *Cell Calcium*, 22(1), 11–20.
- Savolainen-Peltonen, H., Vihma, V., Wang, F., Turpeinen, U., Hämäläinen, E., Haanpää, M., Leidenius, M., Tikkanen, M. J., & Mikkola, T. S. (2018). Estrogen biosynthesis in breast adipose tissue during menstrual cycle in women with and without breast cancer. *Gynecological Endocrinology*, 34(12), 1039–1043.
- Schaar, A., Sukumaran, P., Sun, Y., Dhasarathy, A., & Singh, B. B. (2016). TRPC1-STIM1 activation modulates transforming growth factor β -induced epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncotarget*, 7(49), 80554–80567.
- Schaefer, M. (2005). Homo- and heteromeric assembly of TRP channel subunits. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 451(1), 35–42.
- Schelfhout, V. R. J., Coene, E. D., Delaey, B., Thys, S., Page, D. L., & De Potter, C. R. (2000). Pathogenesis of Paget's Disease: epidermal heregulin-, motility factor, and the HER receptor family. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 92(8), 622–628.

- Schuster, S., Marhl, M., & Höfer, T. (2002). Modelling of simple and complex calcium oscillations from single-cell responses to intercellular signalling. *European Journal of Biochemistry*, 269(5), 1333–1355.
- Schwaller, B. (2010). Cytosolic Ca²⁺ buffers. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(11).
- Schwarz, E. C., Kummerow, C., Wenning, A. S., Wagner, K., Sappok, A., Waggershauer, K., Griesemer, D., Strauß, B., Wolfs, M.-J., Quintana, A., & Hoth, M. (2007). Calcium dependence of T cell proliferation following focal stimulation. *European Journal of Immunology*, 37(10), 2723–2733.
- Selli, C., Erac, Y., Kosova, B., & Tosun, M. (2009). Post-transcriptional silencing of TRPC1 ion channel gene by RNA interference upregulates TRPC6 expression and store-operated Ca²⁺ entry in A7r5 vascular smooth muscle cells. *Vascular Pharmacology*, 51(2–3), 96–100.
- Sengupta, S., Lingnurkar, R., Carey, T. S., Pomaville, M., Kar, P., Feig, M., Wilson, C. A., Knott, J. G., Arnosti, D. N., & Henry, R. W. (2015). The evolutionary conserved C-terminal domains in the mammalian retinoblastoma tumor suppressor family serve as dual regulators of protein stability and transcriptional potency. *Journal of Biological Chemistry*, 290(23), 14462–14475.
- Shah, R., Rosso, K., & Nathanson, S. D. (2014). Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer. *World Journal of Clinical Oncology*, 5(3), 283–298.
- Shin, S. M., & Kim, S. G. (2009). Inhibition of arachidonic acid and iron-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis by oltipraz and novel 1,2-dithiole-3-thione congeners. *Molecular Pharmacology*, 75(1), 242–253.
- Shiovitz, S., & Korde, L. A. (2015). Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Annals of Oncology*, 26(7), 1291–1299.
- Shoshan-Barmatz, V., & De, S. (2017). Mitochondrial VDAC, the Na⁺/Ca²⁺ exchanger, and the Ca²⁺ uniporter in Ca²⁺ dynamics and signaling. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 981, 323–347.

- Shuttleworth, T. J. (2012). Orai3 - the 'exceptional' Orai? *The Journal of Physiology*, 590(2), 241–257.
- Siaw, W. N., Di Capite, J., Singaravelu, K., & Parekh, A. B. (2008). Sustained activation of the tyrosine kinase syk by antigen in mast cells requires local Ca^{2+} influx through Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channels. *Journal of Biological Chemistry*, 283(46), 31348–31355.
- Siegel, R., Naishadham, D., & Jemal, A. (2013). Cancer statistics, 2013. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 63(1), 11–30.
- Sinkins, W. G., Estacion, M., & Schilling, W. P. (1998). Functional expression of TRPC1: a human homologue of the *Drosophila* Trp channel. *Biochem. J*, 331.
- Slamon, D., Clark, G., Wong, S., Levin, W., Ullrich, A., & McGuire, W. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 235(4785), 177–182.
- Smallwood, J. I., Gügi, B., & Rasmussen, H. (1988). Regulation of erythrocyte Ca^{2+} pump activity by protein kinase C. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(5), 2195–2202.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76–85.
- Smyth, J. T., DeHaven, W. I., Bird, G. S., & Putney, J. W. (2008). Ca^{2+} -store-dependent and -independent reversal of STIM1 localization and function. *Journal of Cell Science*, 121(6), 762–772.
- So, C. L., Saunus, J. M., Roberts-Thomson, S. J., & Monteith, G. R. (2019). Calcium signalling and breast cancer. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 94, 74–83.
- Sobin, L. H., Gospodarowicz, M. K., & Wittekind, C. (2011). TNM Classification of Malignant Tumours. En *International Union Against Cancer*.
- Soboloff, J., Madesh, M., & Gill, D. L. (2011). Sensing cellular stress through STIM proteins. *Nature Chemical Biology*, 7(8), 488–492.

- Soboloff, J., Rothberg, B. S., Madesh, M., & Gill, D. L. (2012). STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(9), 549–565.
- Soboloff, J., Spassova, M. A., Hewavitharana, T., He, L. P., Xu, W., Johnstone, L. S., Dziadek, M. A., & Gill, D. L. (2006). STIM2 is an inhibitor of STIM1-mediated store-operated Ca²⁺ entry. *Current Biology*, 16(14), 1465–1470.
- Sørensen, T. L. M., Møller, J. V., & Nissen, P. (2004). Phosphoryl transfer and calcium ion occlusion in the calcium pump. *Science*, 304(5677), 1672–1675.
- Sørli, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S. S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J. C., Brown, P. O., Botstein, D., Lønning, P. E., & Børresen-Dale, A. L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), 10869–10874.
- Sørli, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J. S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., Demeter, J., Perou, C. M., Lønning, P. E., Brown, P. O., Børresen-Dale, A. L., & Botstein, D. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(14), 8418–8423.
- Sotiriou, C., Neo, S. Y., McShane, L. M., Korn, E. L., Long, P. M., Jazaeri, A., Martiat, P., Fox, S. B., Harris, A. L., & Liu, E. T. (2003). Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(18), 10393–10398.
- Sotiriou, C., & Pusztai, L. (2009). Gene-expression signatures in breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 360(8), 790.
- Sotiriou, C., Wirapati, P., Loi, S., Harris, A., Fox, S., Smeds, J., Nordgren, H., Farmer, P., Praz, V., Haibe-Kains, B., Desmedt, C., Larsimont, D., Cardoso, F., Peterse, H., Nuyten, D., Buyse, M., Van de Vijver, M. J., Bergh, J., Piccart, M., & Delorenzi, M. (2006). Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 98(4), 262–272.

- Spassova, M. A., Soboloff, J., He, L. P., Xu, W., Dziadek, M. A., & Gill, D. L. (2006). STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca^{2+} channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(11), 4040–4045.
- Srikanth, S., Jung, H. J., Ribalet, B., & Gwack, Y. (2010). The intracellular loop of Orai1 plays a central role in fast inactivation of Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channels. *Journal of Biological Chemistry*, 285(7), 5066–5075.
- Stanisz, H., Stark, A., Kilch, T., Schwarz, E. C., Müller, C. S. L., Peinelt, C., Hoth, M., Niemeyer, B. A., Vogt, T., & Bogeski, I. (2012). Orai1 Ca^{2+} channels control endothelin-1-induced mitogenesis and melanogenesis in primary human melanocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(5), 1443–1451.
- Stathopulos, P. B., & Ikura, M. (2013). Structural aspects of calcium-release activated calcium channel function. *Channels*, 7(5), 344–353.
- Stathopulos, P. B., & Ikura, M. (2010). Partial unfolding and oligomerization of stromal interaction molecules as an initiation mechanism of store operated calcium entry. *Biochemistry and Cell Biology*, 88(2), 175–183.
- Stathopulos, P. B., Li, G. Y., Plevin, M. J., Ames, J. B., & Ikura, M. (2006). Stored Ca^{2+} depletion-induced oligomerization of stromal interaction molecule 1 (STIM1) via the EF-SAM region: an initiation mechanism for capacitive Ca^{2+} entry. *Journal of Biological Chemistry*, 281(47), 35855–35862.
- Stathopulos, P. B., Schindl, R., Fahrner, M., Zheng, L., Gasmi-Seabrook, G. M., Muik, M., Romanin, C., & Ikura, M. (2013). STIM1/Orai1 coiled-coil interplay in the regulation of store-operated calcium entry. *Nature Communications*, 4.
- Stathopulos, P. B., Zheng, L., & Ikura, M. (2009). Stromal interaction molecule (STIM) 1 and STIM2 calcium sensing regions exhibit distinct unfolding and oligomerization kinetics. *Journal of Biological Chemistry*, 284(2), 728–732.
- Stathopulos, P. B., Zheng, L., Li, G. Y., Plevin, M. J., & Ikura, M. (2008). Structural and mechanistic insights into STIM1-mediated initiation of store-operated calcium entry. *Cell*, 135(1), 110–122.

- Stauffer, T. P., Guerini, D., & Carafoli, E. (1995). Tissue distribution of the four gene products of the plasma membrane Ca^{2+} pump: a study using specific antibodies. *Journal of Biological Chemistry*, 270(20), 12184–12190.
- Stewart, T. A., Azimi, I., Thompson, E. W., Roberts-Thomson, S. J., & Monteith, G. R. (2015). A role for calcium in the regulation of ATP-binding cassette, sub-family C, member 3 (ABCC3) gene expression in a model of epidermal growth factor-mediated breast cancer epithelial-mesenchymal transition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 458(3), 509–514.
- Streb, H., Irvine, R. F., Berridge, M. J., & Schulz, I. (1983). Release of Ca^{2+} from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature*, 306(5938), 67–69.
- Strehler, E. E., & Zacharias, D. A. (2001). Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiological Reviews*, 81(1), 21–50.
- Sundivakkam, P. C., Freichel, M., Singh, V., Yuan, J. P., Vogel, S. M., Flockerzi, V., Malik, A. B., & Tirupathi, C. (2012). The Ca^{2+} sensor stromal interaction molecule 1 (STIM1) is necessary and sufficient for the store-operated Ca^{2+} entry function of transient receptor potential canonical (TRPC) 1 and 4 channels in endothelial cells. *Molecular Pharmacology*, 81(4), 510–526.
- Szász, I., Sarkadi, B., Schubert, A., & Gárdos, G. (1978). Effects of lanthanum on calcium-dependent phenomena in human red cells. *BBA - Biomembranes*, 512(2), 331–340.
- Takahashi, Y., Murakami, M., Watanabe, H., Hasegawa, H., Ohba, T., Munehisa, Y., Nobori, K., Ono, K., Iijima, T., & Ito, H. (2007). Essential role of the N-terminus of murine Orai1 in store-operated Ca^{2+} entry. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 356(1), 45–52.
- Takemura, H., Hughes, A. R., Thastrup, O., & Putney, J. W. (1989). Activation of calcium entry by the tumor promoter thapsigargin in parotid acinar cells. Evidence that an intracellular calcium pool, and not an inositol phosphate, regulates calcium fluxes at the plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 264(21), 12266–12271.

- Talmadge, J. E., & Fidler, I. J. (2010). AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Research*, 70(14), 5649–5669.
- Tang, S., Wang, X., Shen, Q., Yang, X., Yu, C., Cai, C., Cai, G., Meng, X., & Zou, F. (2015). Mitochondrial Ca^{2+} uniporter is critical for store-operated Ca^{2+} entry-dependent breast cancer cell migration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 458(1), 186–193.
- Tarasov, A. I., Griffiths, E. J., & Rutter, G. A. (2012). Regulation of ATP production by mitochondrial Ca^{2+} . *Cell Calcium*, 52(1), 28–35.
- Taylor, C. W., & Richardson, A. (1991). Structure and function of inositol triphosphate receptors. *Pharmacology and Therapeutics*, 51(1), 97–137.
- Thastrup, O., Dawson, A. P., Scharff, O., Foder, B., Cullen, P. J., Drøbak, B. K., Bjerrum, P. J., Christensen, S. B., & Hanley, M. R. (1989). Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. *Agents and Actions*, 27(1–2), 17–23.
- Thebault, S., Flourakis, M., Vanoverberghe, K., Vandermoere, F., Roudbaraki, M., Lehen'kyi, V., Slomianny, C., Beck, B., Mariot, P., Bonnal, J. L., Mauroy, B., Shuba, Y., Capiod, T., Skryma, R., & Prevarskaya, N. (2006). Differential role of transient receptor potential channels in Ca^{2+} entry and proliferation of prostate cancer epithelial cells. *Cancer Research*, 66(4), 2038–2047.
- Thomas, P., Pang, Y., & Dong, J. (2014). Enhancement of cell surface expression and receptor functions of Membrane Progesterin Receptor α (mPR α) by Progesterone Receptor Membrane Component 1 (PGRMC1): evidence for a role of PGRMC1 as an adaptor protein for steroid receptors. *Endocrinology*, 155(3), 1107–1119.
- Thompson, J. L., Mignen, O., & Shuttleworth, T. J. (2010). The N-terminal domain of Orai3 determines selectivity for activation of the store-independent ARC channel by arachidonic acid. *Channels*, 4(5).
- Tian, J. M., Ran, B., Zhang, C. L., Yan, D. M., & Li, X. H. (2018). Estrogen and progesterone promote breast cancer cell proliferation by inducing cyclin G1 expression. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 51(3), 1–7.

- Torii, S., Yamamoto, T., Tsuchiya, Y., & Nishida, E. (2006). ERK MAP kinase in G1 cell cycle progression and cancer. *Cancer Science*, 97(8), 697–702.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), 4350–4354.
- Toyoshima, C. (2008). Structural aspects of ion pumping by Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476(1), 3–11.
- Toyoshima, C., & Inesi, G. (2004). Structural basis of ion pumping by Ca²⁺-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annual Review of Biochemistry*, 73(1), 269–292.
- Toyoshima, C., & Mizutani, T. (2004). Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. *Nature*, 430(6999), 529–535.
- Toyoshima, C., Nomura, H., & Tsuda, T. (2004). Lumenal gating mechanism revealed in calcium pump crystal structures with phosphate analogues. *Nature*, 432(7015), 361–368.
- Trebak, M. (2012). STIM/Orai signalling complexes in vascular smooth muscle. *The Journal of Physiology*, 590(17), 4201–4208.
- Trebak, M., & Putney, J. W. (2017). Orai calcium channels. *Physiology*, 32(4), 332–342.
- Tsai, M. F., Jiang, D., Zhao, L., Clapham, D., & Miller, C. (2014). Functional reconstitution of the mitochondrial Ca²⁺/H⁺ antiporter letm1. *Journal of General Physiology*, 143(1), 67–73.
- Tsang, J. Y. S., & Tse, G. M. (2020). Molecular classification of breast cancer. *Advances in Anatomic Pathology*, 27(1), 27–35.
- Tsien, R. W., & Tsien, R. Y. (1990). Calcium channels, stores, and oscillations. *Annual Review of Cell Biology*, 6, 715–760.

- Tsui, M. M., & York, J. D. (2010). Roles of inositol phosphates and inositol pyrophosphates in development, cell signaling and nuclear processes. *Advances in Enzyme Regulation*, 50(1), 324–337.
- Uccelletti, D., Farina, F., Pinton, P., Goffrini, P., Mancini, P., Talora, C., Rizzuto, R., & Palleschi, C. (2005). The Golgi Ca²⁺-ATPase KIPmr1p function is required for oxidative stress response by controlling the expression of the heat-shock element HSP60 in *Kluyveromyces lactis*. *Molecular Biology of the Cell*, 16(10), 4636–4647.
- Vais, H., Mallilankaraman, K., Mak, D. O. D., Hoff, H., Payne, R., Tanis, J. E., & Foskett, J. K. (2016). EMRE is a matrix Ca²⁺ sensor that governs gatekeeping of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter. *Cell Reports*, 14(3), 403–410.
- Van, B. K., Dode, L., Vanoevelen, J., Callewaert, G., De, S. H., Missiaen, L., Parys, J. B., Raeymaekers, L., & Wuytack, F. (2004). The Ca²⁺/Mn²⁺ pumps in the Golgi apparatus. *Biochim Biophys Acta*, 1742, 103–112.
- Van Ginkel, P. R., Yan, M. B., Bhattacharya, S., Polans, A. S., & Kenealey, J. D. (2015). Natural products induce a G protein-mediated calcium pathway activating p53 in cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 288(3), 453–462.
- Vanoevelen, J., Dode, L., Van Baelen, K., Fairclough, R. J., Missiaen, L., Raeymaekers, L., & Wuytack, F. (2005). The secretory pathway Ca²⁺/Mn²⁺-ATPase 2 is a Golgi-localized pump with high affinity for Ca²⁺ ions. *Journal of Biological Chemistry*, 280(24), 22800–22808.
- Venkatachalam, K., & Montell, C. (2007). TRP Channels. *Annual Review of Biochemistry*, 76(1), 387–417.
- Vennekens, R., Voets, T., Bindels, R. J. M., Droogmans, G., & Nilius, B. (2002). Current understanding of mammalian TRP homologues. *Cell Calcium*, 31(6), 253–264.
- Verboomen, H., Wuytack, F., Van den Bosch, L., Mertens, L., & Casteels, R. (1994). The functional importance of the extreme C-terminal tail in the gene 2 organellar Ca²⁺-transport ATPase (SERCA2a/b). *Biochemical Journal*, 303(3), 979–984.

- Vig, M., Peinelt, C., Beck, A., Koomoa, D. L., Rabah, D., Koblan-Huberson, M., Kraft, S., Turner, H., Fleig, A., Penner, R., & Kinet, J. P. (2006). CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca^{2+} entry. *Science*, 312(5777), 1220–1223.
- Villalobos, C., Hernández-Morales, M., Gutiérrez, L. G., & Núñez, L. (2019). TRPC1 and Orai1 channels in colon cancer. *Cell Calcium*, 81, 59–66.
- Vilner, B. J., & Bowen, W. D. (2000). Modulation of cellular calcium by sigma-2 receptors: release from intracellular stores in human SK-N-SH neuroblastoma cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 292(3).
- Voduc, K. D., Cheang, M. C. U., Tyldesley, S., Gelmon, K., Nielsen, T. O., & Kennecke, H. (2010). Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *Journal of Clinical Oncology*, 28(10), 1684–1691.
- Walsh, C. M., Chvanov, M., Haynes, L. P., Petersen, O. H., Tepikin, A. V., & Burgoyne, R. D. (2010). Role of phosphoinositides in STIM1 dynamics and store-operated calcium entry. *Biochemical Journal*, 425(1), 159–168.
- Walsh, C. M., Doherty, M. K., Tepikin, A. V., & Burgoyne, R. D. (2010). Evidence for an interaction between Golli and STIM1 in store-operated calcium entry. *Biochemical Journal*, 430(3), 453–460.
- Wang, H. C., & Lee, W. Sen. (2018). Molecular mechanisms underlying progesterone-induced cytoplasmic retention of p27 in breast cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 183, 202–209.
- Wang, J., Yin, Y., Hua, H., Li, M., Luo, T., Xu, L., Wang, R., Liu, D., Zhang, Y., & Jiang, Y. (2009). Blockade of GRP78 sensitizes breast cancer cells to microtubules-interfering agents that induce the unfolded protein response. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(9 B), 3888–3897.
- Wang, Y., Qi, Y.-X., Qi, Z., & Tsang, S.-Y. (2019). TRPC3 regulates the proliferation and apoptosis resistance of triple negative breast cancer cells through the TRPC3/RASA4/MAPK pathway. *Cancers*, 11(4), 558.

- Wang, Y., Nguyen, N. X., She, J., Zeng, W., Yang, Y., Bai, X. chen, & Jiang, Y. (2019). Structural mechanism of EMRE-dependent gating of the human mitochondrial calcium uniporter. *Cell*, 177(5), 1252-1261.
- Wang, Y., Deng, X., Mancarella, S., Hendron, E., Eguchi, S., Soboloff, J., Tang, X. D., & Gill, D. L. (2010). The calcium store sensor, STIM1, reciprocally controls Orai and CaV1.2 channels. *Science*, 330(6000), 105–109.
- Wang, Y., Xu, J., Xia, X., Yang, M., Vangveravong, S., Chen, J., MacH, R. H., & Xia, Y. (2012). SV119-gold nanocage conjugates: a new platform for targeting cancer cells via sigma-2 receptors. *Nanoscale*, 4(2), 421–424.
- Wedel, B. J., Vazquez, G., McKay, R. R., Bird, G. S. J., & Putney, J. W. (2003). A calmodulin/inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor-binding region targets TRPC3 to the plasma membrane in a calmodulin/IP3 receptor-independent process. *Journal of Biological Chemistry*, 278(28), 25758–25765.
- Wei, Y., Chen, J., Rosas, G., Tompkins, D. A., Holt, P. A., & Rao, R. (2000). Phenotypic screening of mutations in Pmr1, the yeast secretory pathway Ca²⁺/Mn²⁺-ATPase, reveals residues critical for ion selectivity and transport. *Journal of Biological Chemistry*, 275(31), 23927–23932.
- Weidinger, C., Shaw, P. J., & Feske, S. (2013). STIM1 and STIM2-mediated Ca²⁺ influx regulates antitumour immunity by CD8+ T cells. *EMBO Molecular Medicine*, 5(9), 1311–1321.
- Weigelt, B., Baehner, F. L., & Reis-Filho, J. S. (2010). The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: A retrospective of the last decade. *Journal of Pathology*, 220(2), 263–280.
- Weiss, A., Chavez-MacGregor, M., Lichtensztajn, D. Y., Yi, M., Tadros, A., Hortobagyi, G. N., Giordano, S. H., Hunt, K. K., & Mittendorf, E. A. (2018). Validation study of the American joint committee on cancer eighth edition prognostic stage compared with the anatomic stage in breast cancer. *JAMA Oncology*, 4(2), 203–209.
- Wheeler, K. T., Wang, L. M., Wallen, C. A., Childers, S. R., Cline, J. M., Keng, P. C., & Mach, R. H. (2000). Sigma-2 receptors as a biomarker of proliferation in solid tumours. *British Journal of Cancer*, 82(6), 1223–1232.

- WHO Classification of Tumours Editorial Board., International Agency for Research on Cancer., & World Health Organization. (2019). *WHO classification of tumours. Breast Tumours*.
- Wiebe, J. P., Zhang, G., Welch, I., & Cadieux-Pitre, H. A. T. (2013). Progesterone metabolites regulate induction, growth, and suppression of estrogen- and progesterone receptor-negative human breast cell tumors. *Breast Cancer Research*, 15(3), 1–15.
- Wiechelmann, K. J., Braun, R. D., & Fitzpatrick, J. D. (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Analytical Biochemistry*, 175(1), 231–237.
- Williams, J. R., Leaver, H. A., Ironside, J. W., Miller, E. P., Whittle, I. R., & Gregor, A. (1998). Apoptosis in human primary brain tumours: actions of arachidonic acid. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 58(3), 193–200.
- Williams, R. T., Manji, S. S. M., Parker, N. J., Hancock, M. S., Van Stekelenburg, L., Eid, J. P., Senior, P. V., Kazenwadel, J. S., Shandala, T., Saint, R., Smith, P. J., & Dziadek, M. A. (2001). Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins. *Biochemical Journal*, 357(3), 673–685.
- Wingrove, D. E., & Gunter, T. E. (1986a). Kinetics of mitochondrial calcium transport I. characteristics of the sodium-independent calcium efflux mechanism of liver mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, 261(32), 15159–15165.
- Wingrove, D. E., & Gunter, T. E. (1986b). Kinetics of mitochondrial calcium transport II. A kinetic description of the sodium-dependent calcium efflux mechanism of liver mitochondria and inhibition by ruthenium red and by tetraphenylphosphonium. *The Journal of Biological Chemistry*, 261(32), 15166–15171.
- Wissenbach, U., Philipp, S. E., Gross, S. A., Cavalié, A., & Flockerzi, V. (2007). Primary structure, chromosomal localization and expression in immune cells of the murine Orai and STIM genes. *Cell Calcium*, 42(4–5), 439–446.
- Wolf, L. A., & Laster, S. M. (1999). Characterization of arachidonic acid-induced apoptosis. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 30(3), 353–368.

- Wolff, A. C., Elizabeth Hale Hammond, M., Allison, K. H., Harvey, B. E., Mangu, P. B., Bartlett, J. M. S., Bilous, M., Ellis, I. O., Fitzgibbons, P., Hanna, W., Jenkins, R. B., Press, M. F., Spears, P. A., Vance, G. H., Viale, G., McShane, L. M., & Dowsett, M. (2018). Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: american society of clinical oncology/ college of American pathologists clinical practice guideline focused update. *Journal of Clinical Oncology*, 36(20), 2105–2122.
- Woodward, O. M., Li, Y., Yu, S., Greenwell, P., Wodarczyk, C., Boletta, A., Guggino, W. B., & Qian, F. (2010). Identification of a polycystin-1 cleavage product, P100, that regulates store operated Ca^{2+} entry through interactions with STIM1. *PLoS ONE*, 5(8).
- Wootton, L. L., Argent, C. C. H., Wheatley, M., & Michelangeli, F. (2004). The expression, activity and localisation of the secretory pathway Ca^{2+} -ATPase (SPCA1) in different mammalian tissues. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1664(2), 189–197.
- Worley, P. F., Zeng, W., Huang, G. N., Yuan, J. P., Kim, J. Y., Lee, M. G., & Muallem, S. (2007). TRPC channels as STIM1-regulated store-operated channels. *Cell Calcium*, 42(2), 205–211.
- Wu, L., Bauer, C. S., Zhen, X. guang, Xie, C., & Yang, J. (2002). Dual regulation of voltage-gated calcium channels by PtdIns(4, 5)P₂. *Nature*, 419(6910), 947–952.
- Xia, J., Pan, R., Gao, X., Meucci, O., & Hu, H. (2014). Native store-operated calcium channels are functionally expressed in mouse spinal cord dorsal horn neurons and regulate resting calcium homeostasis. *Journal of Physiology*, 592(16), 3443–3461.
- Xiang, M., Mohamalawari, D., & Rao, R. (2005). A novel isoform of the secretory pathway Ca^{2+} , Mn^{2+} -ATPase, hSPCA2, has unusual properties and is expressed in the brain. *Journal of Biological Chemistry*, 280(12), 11608–11614.
- Xiao, B., Coste, B., Mathur, J., & Patapoutian, A. (2011). Temperature-dependent STIM1 activation induces Ca^{2+} influx and modulates gene expression. *Nature Chemical Biology*, 7(6), 351–358.
- Xie, J., Pan, H., Yao, J., Zhou, Y., & Han, W. (2016). SOCE and cancer: recent progress and new perspectives. *International Journal of Cancer*, 138(9), 2067–2077.

- Xu, J., Zeng, C., Chu, W., Pan, F., Rothfuss, J. M., Zhang, F., Tu, Z., Zhou, D., Zeng, D., Vangveravong, S., Johnston, F., Spitzer, D., Chang, K. C., Hotchkiss, R. S., Hawkins, W. G., Wheeler, K. T., & MacH, R. H. (2011). Identification of the PGRMC1 protein complex as the putative sigma-2 receptor binding site. *Nature Communications*, 2(1), 380.
- Xu, S.-Z., & Beech, D. J. (2001). TRPC1 is a membrane-spanning subunit of store-operated Ca^{2+} channels in native vascular smooth muscle cells. *Circulation Research*, 88(1), 84–87.
- Xu, X. Z. S., Li, H. S., Guggino, W. B., & Montell, C. (1997). Coassembly of TRP and TRPL produces a distinct store-operated conductance. *Cell*, 89(7), 1155–1164.
- Yam, C., Mani, S. A., & Moulder, S. L. (2017). Targeting the molecular subtypes of triple negative breast cancer: understanding the diversity to progress the field. *The Oncologist*, 22(9), 1086–1093.
- Yamashita, S., Yamashita, J., Sakamoto, K., Inada, K., Nakashima, Y., Murata, K., Saishoji, T., Nomura, K., & Ogawa, M. (1993). Increased expression of membrane-associated phospholipase A2 shows malignant potential of human breast cancer cells. *Cancer*, 71(10), 3058–3064.
- Yan, J., Ahnilaji, A., Schmid, E., Elvira, B., Shimshek, D. R., Putten, H., Wagner, C. A., Shumilina, E., & Lang, F. (2015). Leucine-rich repeat kinase 2-sensitive $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger activity in dendritic cells. *The FASEB Journal*, 29(5), 1701–1710.
- Yang, S., Zhang, J. J., & Huang, X. Y. (2009). Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis. *Cancer Cell*, 15(2), 124–134.
- Yang, X., Jin, H., Cai, X., Li, S., & Shen, Y. (2012). Structural and mechanistic insights into the activation of Stromal interaction molecule 1 (STIM1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(15), 5657–5662.
- Yang, Y., Jiang, Z., Ma, N., Wang, B., Liu, J., Zhang, L., & Gu, L. (2018). MicroRNA-223 targeting STIM1 inhibits the biological behavior of breast cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 45(2), 856–866.

- Yang, Y., Jiang, Z., Wang, B., Chang, L., Liu, J., Zhang, L., & Gu, L. (2017). Expression of STIM1 is associated with tumor aggressiveness and poor prognosis in breast cancer. *Pathology Research and Practice*, 213(9), 1043–1047.
- Yeromin, A. V., Zhang, S. L., Jiang, W., Yu, Y., Safrina, O., & Cahalan, M. D. (2006). Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature*, 443(7108), 226–229.
- Young, K. W., Bootman, M. D., Channing, D. R., Lipp, P., Maycox, P. R., Meakin, J., Challiss, R. A. J., & Nahorski, S. R. (2000). Lysophosphatidic acid-induced Ca^{2+} mobilization requires intracellular sphingosine 1-phosphate production: potential involvement of endogenous Edg-4 receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 275(49), 38532–38539.
- Yu, B. X., Yuan, J. N., Zhang, F. R., Liu, Y. Y., Zhang, T. T., Li, K., Lv, X. F., Zhou, J. G., Huang, L. Y., Shang, J. Y., & Liang, S. J. (2017). Inhibition of Orai1-mediated Ca^{2+} entry limits endothelial cell inflammation by suppressing calcineurin-NFATc4 signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495(2), 1864–1870.
- Yu, C., Tang, W., Wang, Y., Shen, Q., Wang, B., Cai, C., Meng, X., & Zou, F. (2016). Downregulation of ACE2/Ang-(1-7)/Mas axis promotes breast cancer metastasis by enhancing store-operated calcium entry. *Cancer Letters*, 376(2), 268–277.
- Yu, F., Sun, L., & Machaca, K. (2010). Constitutive recycling of the store-operated Ca^{2+} channel Orai1 and its internalization during meiosis. *Journal of Cell Biology*, 191(3), 523–535.
- Yu, H. G., McLaughlin, S., Newman, M., Brundage, K., Ammer, A., Martin, K., & Coad, J. (2017). Altering calcium influx for selective destruction of breast tumor. *BMC Cancer*, 17(1), 1–12.
- Yu, S. P., & Choi, D. W. (1997). Na^+ - Ca^{2+} exchange currents in cortical neurons: concomitant forward and reverse operation and effect of glutamate. *European Journal of Neuroscience*, 9(6), 1273–1281.
- Yuan, J. P., Zeng, W., Dorwart, M. R., Choi, Y. J., Worley, P. F., & Muallem, S. (2009). SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels. *Nature Cell Biology*, 11(3), 337–343.

- Yuan, J. P., Zeng, W., Huang, G. N., Worley, P. F., & Muallem, S. (2007). STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nature Cell Biology*, 9(6), 636–645.
- Yue, L., Peng, J. Bin, Hediger, M. A., & Clapham, D. E. (2001). CaT1 manifests the pore properties of the calcium-release-activated calcium channel. *Nature*, 410(6829), 705–709.
- Yule, D. I. (2001). Subtype-specific regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: Controlling calcium signals in time and space. *Journal of General Physiology*, 117(5), 431–434.
- Zalk, R., Clarke, O. B., Georges, A. Des, Grassucci, R. A., Reiken, S., Mancina, F., Hendrickson, W. A., Frank, J., & Marks, A. R. (2015). Structure of a mammalian ryanodine receptor. *Nature*, 517(7532), 44–49.
- Zeng, C., Vangveravong, S., Xu, J., Chang, K. C., Hotchkiss, R. S., Wheeler, K. T., Shen, D., Zhuang, Z. P., Kung, H. F., & Mach, R. H. (2007). Subcellular localization of sigma-2 receptors in breast cancer cells using two-photon and confocal microscopy. *Cancer Research*, 67(14), 6708–6716.
- Zeng, W., Yuan, J. P., Kim, M. S., Choi, Y. J., Huang, G. N., Worley, P. F., & Muallem, S. (2008). STIM1 gates TRPC channels, but not Orai1, by electrostatic interaction. *Molecular Cell*, 32(3), 439–448.
- Zhang, S. L., Yeromin, A. V., Zhang, X. H. F., Yu, Y., Safrina, O., Penna, A., Roos, J., Stauderman, K. A., & Cahalan, M. D. (2006). Genome-wide RNAi screen of Ca²⁺ influx identifies genes that regulate Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(24), 9357–9362.
- Zhang, S. L., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J. A., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Stauderman, K. A., & Cahalan, M. D. (2005). STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane. *Nature*, 437(7060), 902–905.
- Zhang, S., Miao, Y., Zheng, X., Gong, Y., Zhang, J., Zou, F., & Cai, C. (2017). STIM1 and STIM2 differently regulate endogenous Ca²⁺ entry and promote TGF- β -induced EMT in breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 488(1), 74–80.

- Zhang, X., Gonzalez-Cobos, J. C., Schindl, R., Muik, M., Ruhle, B., Motiani, R. K., Bisailon, J. M., Zhang, W., Fahrner, M., Barroso, M., Matrougui, K., Romanin, C., & Trebak, M. (2013). Mechanisms of STIM1 activation of store-independent leukotriene C4-regulated Ca^{2+} channels. *Molecular and Cellular Biology*, 33(18), 3715–3723.
- Zhang, X., Zhang, W., González-Cobos, J. C., Jardin, I., Romanin, C., Matrougui, K., & Trebak, M. (2014). Complex role of STIM1 in the activation of store-independent Orai1/3 channels. *Journal of General Physiology*, 143(3), 3450–3359.
- Zhang, Y., Fujii, J., Phillips, M. S., Chen, H. S., Karpati, G., Yee, W. C., Schrank, B., Cornblath, D. R., Boylan, K. B., & MacLennan, D. H. (1995). Characterization of cDNA and genomic DNA encoding SERCA1, the Ca^{2+} -ATPase of human fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum, and its elimination as a candidate gene for brody disease. *Genomics*, 30(3), 415–424.
- Zheng, L., Stathopoulos, P. B., Li, G. Y., & Ikura, M. (2008). Biophysical characterization of the EF-hand and SAM domain containing Ca^{2+} sensory region of STIM1 and STIM2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 369(1), 240–246.
- Zheng, L., Stathopoulos, P. B., Schindl, R., Li, G. Y., Romanin, C., & Ikura, M. (2011). Auto-inhibitory role of the EF-SAM domain of STIM proteins in store-operated calcium entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(4), 1337–1342.
- Zhou, X., Friedmann, K. S., Lyrmann, H., Zhou, Y., Schoppmeyer, R., Knörck, A., Mang, S., Hoxha, C., Angenendt, A., Backes, C. S., Mangerich, C., Zhao, R., Cappello, S., Schwär, G., Hässig, C., Neef, M., Buße, B., Zufall, F., Kruse, K., ... Hoth, M. (2018). A calcium optimum for cytotoxic T lymphocyte and natural killer cell cytotoxicity. *Journal of Physiology*, 596(14), 2681–2698.
- Zhou, Y., Srinivasan, P., Razavi, S., Seymour, S., Meraner, P., Gudlur, A., Stathopoulos, P. B., Ikura, M., Rao, A., & Hogan, P. G. (2013). Initial activation of STIM1, the regulator of store-operated calcium entry. *Nature Structural and Molecular Biology*, 20(8), 973–981.
- Zhu, M. X., Ma, J., Parrington, J., Galione, A., & Mark Evans, A. (2010). TPCs: Endolysosomal channels for Ca^{2+} mobilization from acidic organelles triggered by NAADP. *FEBS Letters*, 584(10), 1966–1974.

- Zhuang, L., Peng, J. Bin, Tou, L., Takanaga, H., Adam, R. M., Hediger, M. A., & Freeman, M. R. (2002). Calcium-selective ion channel, CaT1, is apically localized in gastrointestinal tract epithelia and is aberrantly expressed in human malignancies. *Laboratory Investigation*, 82(12), 1755–1764.
- Zvaritch, E., Modyanov, N., Carafoli, E., James, P., Vorherr, T., & Falchetto, R. (1990). Mapping of functional domains in the plasma membrane Ca^{2+} pump using trypsin proteolysis. *Biochemistry*, 29(35), 8070–8076.
- Zweifach, A., & Lewis, R. S. (1993). Mitogen-regulated Ca^{2+} current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca^{2+} stores. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90.
- Zylinska, L., Guerini, D., Gromadzinska, E., & Lachowicz, L. (1998). Protein kinases A and C phosphorylate purified Ca^{2+} -ATPase from rat cortex, cerebellum and hippocampus. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1448(1), 99–108.

