



TESIS DOCTORAL

**Estudio del remodelado de la
homeostasis del calcio intracelular en
las células de cáncer de mama**

José Sánchez Collado

**Programa de Doctorado de Biomarcadores de Salud y Estados
Patológicos**

2021



TESIS DOCTORAL

Estudio del remodelado de la homeostasis del calcio intracelular en las células de cáncer de mama

José Sánchez Collado

Programa de Doctorado de Biomarcadores de Salud y Estados Patológicos

Conformidad de los directores:

La conformidad del director/es de la tesis consta en el original en papel de esta Tesis
Doctoral

Fdo: Juan Antonio Rosado Dionisio

Fdo: José Javier López Barba

2021

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

Proyecto de investigación BFU2013-45564-C2-1-P/2-P del Ministerio de Economía y Competitividad.

Proyecto de investigación BFU2016-74932-C2-1-P/2-P del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.

Proyecto de investigación PID2019-104084GB-C21 del Ministerio de Ciencia e innovación.

Ayudas a grupos de investigación Junta de Extremadura-FEDER GR15029, IB16046 y GR18061

José Sánchez Collado ha disfrutado de una beca-contrato BES-2017-080290 para la formación predoctoral de personal investigador del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.



Unión Europea

Fondo Social Europeo

El FSE invierte en tu futuro

Agradecimientos:

Supongo que en la formación predoctoral de todo alumno hay un momento que te predispone a revisar cómo y con quien has pasado los últimos años, que te hace recordar momentos de toda índole y las personas que los compartieron contigo. Supongo también, que cuando te propones escribir los agradecimientos, una parte de tus pensamientos van dedicados a aquellas personas con las que te hubiera gustado pasar más tiempo y no fue así, ausencia que justificamos con la inmensa dedicación que impone el camino hacia nuestros objetivos.

Si el camino fuera lo primero a tratar, no podría empezar de otra forma que agradeciendo a aquellas personas que se ofrecieron de guía. A Juan Antonio Rosado por su confianza, paciencia y muy especialmente por la oportunidad que me ofreció hace ocho años ya que, desde ese momento, he podido aprender de grandes profesionales y desarrollarme como persona e investigador. Igualmente, a José Javier López por su dedicación, paciencia y cercanía, tres aspectos que han posibilitado un sinnúmero de enseñanzas. Es por todo ello, que me gustaría reiterar mis agradecimientos hacia los dos, y confesar que servís como grandes modelos para los alumnos que damos nuestros primeros pasos en la ciencia. También quisiera reconocer el trabajo de Ginés María Salido, quién sin ser mi tutor o director, siempre ha mostrado una enorme predisposición para tratar tanto los temas científicos como académicos, dando desde su enorme experiencia los consejos más oportunos.

Son muchos los compañeros que en algún momento de este proceso han compartido conmigo el camino y que, sin duda, sin su aportación no hubiera sido tan ameno. Quiero dar las gracias a Pedro Redondo, Isaac Jardín, Raquel Díez y Carlos Cantonero, compañeros que forman un equipo del que continúo aprendiendo y del que estoy orgulloso de formar parte. Aun formando parte del mismo equipo, me gustaría agradecer a Leticia Albarrán y Alejandro Berna su infinita paciencia e interés, porque sin tener responsabilidad, han empleado cientos de horas de escritorio y laboratorio para garantizar mi formación. Empeño por el cual también los considero grandes modelos para los alumnos que han transitado y transitan el departamento de Fisiología. Por supuesto, no puedo dejar de agradecer a Mercedes Gómez y Sandra Alvarado su trabajo, su apoyo constante y su visión alegre e

irreverente de la vida. Sin ellas hubiera tropezado en muchas más piedras por el camino. Tampoco quisiera olvidarme de todas aquellos investigadores y compañeros que, aun no teniendo una relación estrecha con el desarrollo de esta tesis, han contribuido a mi progreso como investigador y como persona. Aunque me sea imposible mencionar a todos, quisiera dar las gracias a Patricia Rojo y a las personas que componen los grupos de Pedro Camello y Tarik Smani, compañeros por los cuales tengo una gran admiración y estima.

Como reconocerán las personas que han realizado el camino que yo me encuentro a punto de completar, la ciencia es una labor apasionante que requiere una inmensa dedicación y no está ausente de momentos de frustración. Frecuentemente, esta extenuante entrega termina limitando el tiempo que disfrutamos con nuestra familia y amigos, algo que siempre me ha parecido injusto, pues son ellos los que han impulsado mi voluntad en los peores momentos. Es por ello, que además de agradecerles su labor veo necesario dedicarles este trabajo.

A mis amigos, aquellos con los que comparto momentos únicos, esos que se quedan en la memoria para sacarte una sonrisa cuando más lo necesitas. Espero poder devolveros todo el apoyo que me habéis dado durante estos años. A Anabel, gracias por tu alegría desbordante, comprensión y complicidad. Todos los días le doy las gracias a esa centrifugadora mal equilibrada. A mis padres, Joaquín y María Josefa, trabajadores incansables, con vuestro cariño y empatía siempre habéis sabido darme los mejores consejos. Es un privilegio poder disfrutar de vuestra fuerza vital y de todo lo que me habéis enseñado. A mis hermanos, María y Joaquín, sois el fiel reflejo de todas las bondades de nuestros padres. Gracias por despejarme el camino y llenarlo de carcajadas. Siempre tendréis el amor de vuestro hermano.

A todos, muchas gracias.

Tabla de contenido:

Abreviaturas:.....	11
1 Resumen:	15
1 Summary:	18
2 Antecedentes bibliográficos:	22
2.1 Homeostasis del Ca ²⁺ :	22
2.1.1 Mecanismos que reducen la concentración de Ca ²⁺ citosólica:.....	23
2.1.2 Mecanismos que aumentan la concentración citosólica de Ca ²⁺ :	28
2.2 Entrada de Ca ²⁺ activada por el vaciamiento de los depósitos intracelulares o entrada capacitativa de Ca ²⁺ (ECC o SOCE):	35
2.2.1 Mediadores de la ECC: proteínas STIM1 y Orai1:	36
2.2.2 Mecanismos de regulación de la ECC:	43
2.2.3 Variantes e isoformas de las proteínas STIM y Orai:	48
2.2.4 TRPC1 y las corrientes capacitativas SOC:	55
2.3 Fisiología plaquetaria y el Ca ²⁺ como mediador de la agregación plaquetaria:	59
2.3.1 Desarrollo plaquetario:	59
2.3.2 Función plaquetaria:	61
2.3.3 Papel del Ca ²⁺ en la activación plaquetaria:.....	64
2.4. Cáncer de mama:	67
2.4.1 Epidemiología y factores de riesgo del cáncer de mama:	67
2.4.2 Clasificación del cáncer de mama:.....	68
2.4.3 Calcio y cáncer de mama:	70
3. Objetivos:	78
3. Objectives:	79
4. Material y métodos:.....	82
4.1 Reactivos:.....	82
4.2 Anticuerpos:.....	85
4.3 siARNs y plásmidos:	87
4.4 Líneas de cultivo:.....	88
4.4.1 MCF-10A:.....	88
4.4.2 MCF7:.....	88
4.4.3 T47D:	88
4.4.4 BT20:	89

4.4.5 MDA-MB-468:	89
4.4.6 MDA-MB-231:	89
4.4.7 Hs578T:	90
4.4.8 M2 y M2A7 (A7):	90
4.5 Preparación de plaquetas:	91
4.6 Transfección celular:	92
4.7 Técnicas de aislamiento de proteínas:.....	94
4.7.1 Lisis celular:	94
4.7.2 Cuantificación de proteínas:	97
4.7.3 Inmunoprecipitación:.....	98
4.7.4 Biotinilación de proteínas de la superficie celular:.....	98
4.8 Western blotting:	99
4.8.1 Preparación de las muestras para realizar Western blotting:	100
4.8.2 Electroforesis:	101
4.8.3 Electrotransferencia:.....	102
4.8.4 Bloqueo:	103
4.8.5 Incubación con anticuerpos:	103
4.8.6 Revelado:	104
4.9 Determinación de la asociación entre proteínas con tinción de plata:.....	105
4.10 Determinación de la $[Ca^{2+}]$ por métodos fluorimétricos:	105
4.10.1 Determinación de la $[Ca^{2+}]$ citosólica mediante la sonda fura-2:.....	105
4.10.2 Entrada inducida por el fragmento OASF:	108
4.10.3 Determinación de la fluorescencia del Fura-FFP18:	109
4.10.4 Determinación de la fluorescencia del G-GECO1.2-Orai1:	110
4.10.5 Determinación de la fluorescencia del R-CEPIA1er:	111
4.11 Determinación de la proliferación celular:	111
4.12 Determinación de la migración celular:.....	112
4.13 Determinación de la viabilidad celular:	113
4.13.1 Detección de yoduro de propidio y calceína:	113
4.14 Determinación de la muerte celular:	115
4.14.1 Medición de la actividad de la caspasa-3:	115
4.15 Determinación de la agregación plaquetaria:	116
4.16 Análisis estadístico:.....	117
5 Resultados:.....	120

.....	121
6 Discusión:	177
7 Conclusiones:	193
7 Conclusions:	194
8 Bibliografía:	197

Abreviaturas:

- **2-APB**: 2-aminoetil-difenilo borato.
- **AC8**: Adenilato ciclasa 8.
- **ACD**: Solución de ácido cítrico dextrosa.
- **ADP**: Adenosin dinucleótido fosfato.
- **AKAP79**: A kinase anchoring protein 79.
- **AMP_c**: Adenosin monofosfato cíclico.
- **ATP**: Adenosin trinucleótido fosfato.
- **BRAC gene**: *Breast Cancer gene*. Gen del cáncer de mama.
- **BrdU**: 5-bromo-2-deoxiuridina.
- **BSA**: Albúmina de suero fetal.
- **CaM**: Calmodulina.
- **Ca_v**: Canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje
- **CC**: Dominios coil coil.
- **CRACR2A**: *Ca²⁺ Release Activated Channel Regulator 2A*. Regulador de los canales activados por la liberación de Ca²⁺ 2A.
- **CTID**: *C-terminal inhibitory domain*. Dominio inhibitorio del extremo carboxilo.
- **DAG**: Diacilglicerol.
- **DMEM**: Medio Eagle modificado de Dulbecco.
- **ECC**: Entrada capacitativa de Ca²⁺.
- **EFHB**: EF-hand domain family member B.
- **EMT**: Transición epitelio-mesenquimal.
- **ER**: receptor de estrógenos.
- **ER+**: positivo para el receptor estrogénico
- **ERK**: Cinasa regulada por señales extracelulares.
- **ETON**: *Extended TM Orai1 NH2-terminal*. Extensión de la región transmembrana amino terminal de Orai1.
- **FAK**: Cinasa de adhesión focal.
- **FCDI**: *Fast Ca²⁺ dependent inactivation*. Inactivación rápida dependiente de Ca²⁺.
- **FLNA**: Filamina A.
- **FURA-2/AM**: fura-2 acetoximetiléster.
- **FVW**: Factor de von Willebrand.
- **HBS**: Tampón Hepes salino.
- **HER2**: Receptor del factor de crecimiento epidermal humano 2.
- **HIF1α**: Factor inducible por hipoxia 1α.
- **I_{CRAC}**: *Calcium Released Activated Current*. Corriente activada por la liberación de Ca²⁺.
- **IP₃**: Inositol 1,4,5 trifosfato.
- **IP₃R**: Receptores de IP₃.
- **I_{SOC}**: *Store Operated Ca²⁺ Current*. Corriente de Ca²⁺ operada por los depósitos.
- **K_d**: Constante de disociación.
- **K_v**: Canales de K⁺ dependientes de voltaje.
- **MCU**: Uniportador de Ca²⁺ mitocondrial.
- **MEM**: Medio mínimo esencial.
- **NAADP**: Nicotinato de adenina dinucleotido fosfato.
- **NADH**: Nicotinamida adenina dinucleotido.
- **NCKX**: Intercambiadores Na⁺-Ca²⁺ dependiente de K⁺.
- **NCLX**: Intercambiador mitocondrial Na⁺/Ca²⁺/Li⁺.
- **NCX**: Intercambiadores Na⁺/Ca²⁺ de la membrana plasmática.
- **NFAT**: Factor nuclear de las células T activadas.
- **NF-κB**: Factor nuclear kappa B.
- **NOS**: Especies reactivas de nitrógeno.
- **OASF**: *Orai activating Small Fragment*, Fragmento pequeño activador de Orai.
- **P2X**: Receptores ionotróficos activados por ATP.
- **PAR**: Receptores activados por proteasas.
- **PBS**: Tampón fosfato salino.
- **PI3K**: Fosfatidilinositol 3 cinasa.
- **PINK1**: Cinasa putativa inducida por PTEN.
- **PIP₂**: Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato.
- **PKA**: Cinasa dependiente de AMP_c.
- **PKC**: Cinasa dependiente de Ca²⁺.
- **PLA₂**: Fosfolipasa A₂.

- **PLC:** Fosfolipasa C.
- **PMCA:** Bomba ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática.
- **PR:** Receptor de la progesterona.
- **PRP:** Plasma rico en plaquetas.
- **R-CEPIA1er:** *Calcium-measuring organelle-Entrapped Protein IndicAtor1 ER.*
- **RE:** Retículo endoplásmico.
- **ROCE:** Entrada de Ca^{2+} operados por receptor.
- **ROS:** Especies reactivas de oxígeno.
- **RYR:** Receptores de rianodina.
- **SAM:** Dominio alfa estéril.
- **SARAF:** *Store-operated Ca^{2+} entry associated regulatory factor.* Factor regulatorio asociado a la entrada de Ca^{2+} operada por los depósitos.
- **SCDI:** *Slow Ca^{2+} Dependent inactivation.* Inactivación lenta dependiente de Ca^{2+} .
- **SERCA:** Bomba ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarco/endoplásmico.
- **shARN:** ARN de horquilla pequeño.
- **SIK3:** *Salt inducible kinase 3.* Kinasa activada por sal 3.
- **siARN:** ARN interferente pequeño.
- **SMOCE:** Entrada de Ca^{2+} operados por segundo mensajero.
- **SOAR:** *STIM-Orai Activating Region,* Región de STIM activadora de Orai.
- **SOCE:** Entrada de Ca^{2+} operados por los depósitos.
- **SPCA:** Bomba ATPasa de Ca^{2+} de la vía secretora.
- **STIM:** *Stromal Interacting Molecule.*
- **STIMATE:** *STIM Activating Enhancer.* Promotor de la activación de STIM.
- **TG:** Tapsigargina.
- **TGF β :** Factor de crecimiento transformante β .
- **TMBIM:** Transmembrane BAX inhibitor motif-containing.
- **TMCO:** Transmembrane and Coiled-Coil Domains.
- **TPC:** *Two pore channels.* Canales de dos poros.
- **TRP:** *Transient Receptor Potential channel.* Canal de potencial receptor transitorio.
- **TRPC:** TRP canónico.
- **TRPC6dn:** Dominante negativo del TRPC6.
- **TRPML:** TRP mucopolipínico.
- **TXA₂:** Tromboxano A₂.
- **UPR:** *Unfolded Protein Response,* Respuesta contra las proteínas no plegadas.
- **VDAC:** Canales aniónicos dependientes de voltaje.
- **VOCE:** Entrada de Ca^{2+} operados por voltaje.

Resumen

1 Resumen:

El ion calcio (Ca^{2+}) es un segundo mensajero intracelular que se encuentra distribuido de forma ubicua, siendo empleado en la señalización de una amplia variedad de procesos celulares. Para habilitar esta función, la célula ejerce un estricto control de la concentración de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]$) citosólica a través de la actividad de intercambiadores y bombas ATPasas. Durante el reposo, estos agentes transportan Ca^{2+} hacia los depósitos intracelulares y el medio extracelular, función que restringe la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica en el orden nanomolar y mantiene un gradiente de concentración entre estos compartimentos. Tras la unión de un agonista a su receptor, una amplia variedad de mecanismos de señalización dependientes de Ca^{2+} son implementados con el objetivo de mediar los diferentes procesos celulares. Estas señales serán generadas por la coordinación de dos eventos íntimamente relacionados: la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares, mayoritariamente constituidos por el retículo endoplásmico (RE), y la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular. La entrada capacitativa de Ca^{2+} (ECC), descrita en 1986 por Jim Putney, integra ambos eventos al promover una corriente de entrada de Ca^{2+} activada por el vaciamiento de los depósitos intracelulares. Dentro de la maquinaria proteica de este mecanismo, la familia de proteínas STIM controla la $[\text{Ca}^{2+}]$ reticular y activa la apertura de los canales capacitativos tras el vaciamiento de Ca^{2+} del retículo. Estos canales se forman por la asociación heterohexamérica de los tres miembros de la familia de proteínas Orai. Paralelamente, algunos autores describen a los miembros de la familia de proteínas TRPC como mediadores de una corriente capacitativa alternativa, la cual estaría subordinada a la activación previa de los canales Orai y complementaría este mecanismo de señalización en algunos modelos celulares.

La ECC juega un papel crucial en la fisiología celular ya que controla procesos como la secreción y la proliferación celular, la agregación plaquetaria, la respuesta inmunológica o la contractibilidad del tejido muscular entre otros. Debido a su carácter transversal, es fácil imaginar cómo las alteraciones de los mecanismos de activación, mantenimiento o inactivación de la ECC pueden conducir a la aparición de procesos patológicos. Consecuentemente, mutaciones en las proteínas STIM y Orai, o la modificación de la

expresión de estas se han relacionado con el desarrollo de miopatías, trastornos de inmunodeficiencia, enfermedades cardíacas, alteración de la función plaquetaria y cambios fenotípicos que promueven la aparición y desarrollo del cáncer. En plaquetas, la ECC está implicada en el proceso de coagulación, siendo especialmente relevante durante la activación de la misma. Mutaciones en STIM1, que determinan el aumento de la actividad basal de esta proteína y una entrada de Ca^{2+} excesiva, son responsables de la aparición de los síndromes de Stormorken y York. En plaquetas, estas mutaciones determinan su preactivación, la incapacidad para acumular Ca^{2+} en los gránulos densos, la trombocitopenia y la alteración del proceso de hemostasia. Estas evidencias apoyan el papel de la ECC en la fisiología plaquetaria y destacan su importancia en el desarrollo de las enfermedades trombóticas. Paralelamente, multitud de estudios han descrito el vínculo entre la ECC y los eventos característicos del cáncer, siendo la activación o reprogramación de este mecanismo de gran importancia para el control de los procesos de proliferación, migración, metástasis o angiogénesis de las células cancerosas. En cáncer de mama, la ECC, y especialmente los canales Orai, han sido propuestos como dianas para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, siendo de especial interés aquellos agentes capaces de modular la actividad de este canal. Recientemente, nuestro grupo ha descrito a la proteína TRPC6 como un agente capaz de modular los procesos de proliferación y migración en las células de cáncer de mama triple negativo y en células positivas para el receptor estrogénico, rol que es implementado a través de la regulación de la actividad de los canales Orai en estas células.

Teniendo en consideración tales antecedentes, el presente documento resume los estudios llevados a cabo durante el desarrollo del proyecto de tesis, siendo los mismos llevados a cabo durante el periodo 2017-2021 en el departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria. Trabajo que ha sido tutorizado y dirigido por D. Juan A. Rosado Dionisio y D. Jose J. Lopez Barba, con el fin de ampliar nuestro conocimiento sobre el mecanismo de ECC y su implicación en la fisiopatología del cáncer de mama. Brevemente, nuestros esfuerzos se han dirigido a identificar el papel regulador de la filamina A y la adenilato ciclasa 8 en el mecanismo de ECC en plaquetas y células de cáncer de mama triple negativo. Adicionalmente, nos propusimos expandir nuestro conocimiento sobre el papel de las proteínas STIM2 y TRPC6 en la homeostasis del Ca^{2+} de las células de cáncer de mama

caracterizadas como positivas para el receptor de estrógenos. Por todo ello, la presente tesis doctoral ha sido titulada “Estudio de la homeostasis del calcio intracelular en las células de cáncer de mama”. Tesis que sometemos a la valoración del Tribunal Evaluador con el propósito de optar a la distinción de Doctor por la Universidad de Extremadura.

1 Summary:

Calcium (Ca^{2+}) is a ubiquitous second messenger that controls a myriad of cellular functions. To enable this role, cytosolic Ca^{2+} concentration is maintained in the nanomolar range thanks to the activity of Ca^{2+} ATPases and exchangers. At resting, these proteins transport cytosolic Ca^{2+} ions into the intracellular organelles or extrude them to the extracellular medium, maintaining an electrochemical gradient between these compartments. Upon cell stimulation, a wide diversity of Ca^{2+} signals take place in order to control the programmed cellular events. These signals are generated by the coordination of two mechanisms: Firstly, Ca^{2+} release from the endoplasmic reticulum, which represents the main intracellular store; and secondly, the entry of Ca^{2+} ions from the extracellular space. Store Operated Ca^{2+} Entry (SOCE), first described by Jim Putney in 1986, merge these events by establishing a mechanism for Ca^{2+} entry that is controlled by the filling state of the intracellular Ca^{2+} stores. The STIM family of proteins control SOCE by sensing the reticular Ca^{2+} concentration and opening capacitative channels after Ca^{2+} store depletion. These channels have been described as heterohexameric structures formed by the assembly of Orai proteins. Additionally, several authors have reported the ability of some TRPC family members to conduct an alternative store operated current. Such efforts reported the earlier involvement of Orai channels as a key factor for TRPC channel activation, describing the TRPC current as an auxiliary SOCE mechanism in some cellular models.

SOCE plays a major role in cell physiology by controlling crucial processes such as cell secretion and proliferation, platelet aggregation, immune response, or muscle cell contractibility among others. Given this relevance, it is easy to predict that those factors that impair SOCE activation, maintenance, or inactivation might lead to a pathophysiological phenotype. Some STIM and Orai gene mutations, or the modification of their protein expression have been reported to lead a variety of human disorders, including myopathy, immunodeficiency, cardiac diseases, altered platelet function and phenotype changes that promote cancer development and progression. In platelets, SOCE is a crucial signalling event that controls the initial stages of haemostasis. STIM1 missense mutations, which cause the constitutive activation of this protein and an excessive Ca^{2+} entry are responsible for Stormorken and York syndromes. Both conditions are characterized by premature platelet

activation, deficient platelet calcium storage in delta granules, thrombocytopenia and bleeding disorders; facts that emphasize the relevance of SOCE in platelet physiology and its role in the development of thrombotic disorders. Additionally, numerous studies have proposed the link between SOCE and some cancer hallmarks, establishing SOCE activation and remodelling as key events for the development of cancer cell proliferation, migration, metastasis or angiogenesis. Concerning breast cancer, SOCE and mainly Orai channels have been proposed as additional targets for the development of new therapeutic approaches, being of great interest those agents capable of modifying Orai channel activity. Recently, our group have described how TRPC6 is able to modulate the migratory and proliferative capacity of triple negative and estrogen receptor positive breast cancer cells, role that is accomplish by regulating Orai channel activity in these cells.

Taking this background into consideration, the present document summarizes the experimental designs launched in order to complete our thesis project. This researching work has been conducted in the Department of Physiology in the Faculty of Veterinary Medicine, during the period 2017-2021, under the supervision of D. Juan A. Rosado Dionisio and D. Jose J. Lopez Barba. As a main goal, this thesis is willing to expand our understanding of SOCE and its implications in the physiopathology of breast cancer cells. Briefly, our efforts have tried to identify the regulatory role of filamin A and adenylyl cyclase 8 in the capacitative Ca^{2+} entry observed in platelets and triple negative breast cancer cells. Additionally, we delve into the role of TRPC6 and STIM2 in the Ca^{2+} homeostasis of estrogen receptor positive breast cancer cells. Therefore, we have entitled the present thesis "Study of the intracellular Ca^{2+} homeostasis in breast cancer cells", which is submitted for consideration by the Evaluation Tribunal with the aim to obtain the degree of Doctor by the University of Extremadura.

Antecedentes bibliográficos

2 Antecedentes bibliográficos:

2.1 Homeostasis del Ca^{2+} :

Los mecanismos de señalización celular basados en el Ca^{2+} son una herramienta que se caracteriza por su universalidad y gran versatilidad, permitiendo a la célula el control de una gran variedad de procesos, incluyendo desde el desarrollo embrionario hasta la muerte celular. La incorporación de este ion a los distintos mecanismos de señalización es posible gracias a un complejo sistema celular que diseña la amplitud, frecuencia y características espaciotemporales de las señales de Ca^{2+} . Al contrario que otros sistemas de señalización celular, el Ca^{2+} no se genera a partir de una reacción enzimática ni es degradado a un metabolito inactivo, sino que es la propia célula la que transporta el Ca^{2+} generando cambios espaciotemporales en la concentración de Ca^{2+} citoplasmática, y es el propio gradiente de concentración el que induce la entrada de iones al citoplasma al producirse la apertura de canales permeables para Ca^{2+} [1]. Esta propiedad impone una estricta regulación de la concentración de Ca^{2+} en el medio intracelular, observándose valores cercanos a 100 nM en el citoplasma de las células en reposo, concentración unas 20,000 veces menor a la que encontramos en el medio extracelular.

Al ser estimuladas por agonistas, o por algún estímulo físicos, uno de los principales mecanismos de transducción de estos eventos consiste en generar incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica, elevaciones que se alcanzan gracias a la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular o su liberación desde los depósitos intracelulares, principalmente constituidos por el retículo endoplásmico (RE). Las características del RE pueden variar mucho en función del modelo celular estudiado; en consecuencia, la concentración intrareticular de Ca^{2+} puede oscilar desde valores de 21 μM hasta 2 mM. Por último, los mecanismos encargados de bombear Ca^{2+} al RE y al exterior celular devuelven la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica a su valor de reposo, proceso que perfila las señales de Ca^{2+} y determina el desarrollo de olas, picos y señales oscilatorias.

2.1.1 Mecanismos que reducen la concentración de Ca^{2+} citosólica:

La homeostasis del Ca^{2+} implica la participación de un complejo sistema molecular encargado de regular la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica. ATPasas e intercambiadores de Ca^{2+} ejercen un fuerte control sobre la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica en reposo y participan en la recuperación del estado basal tras los procesos de señalización, evitando, con su actividad, sobrecargas de Ca^{2+} y la activación de mecanismos apoptóticos.

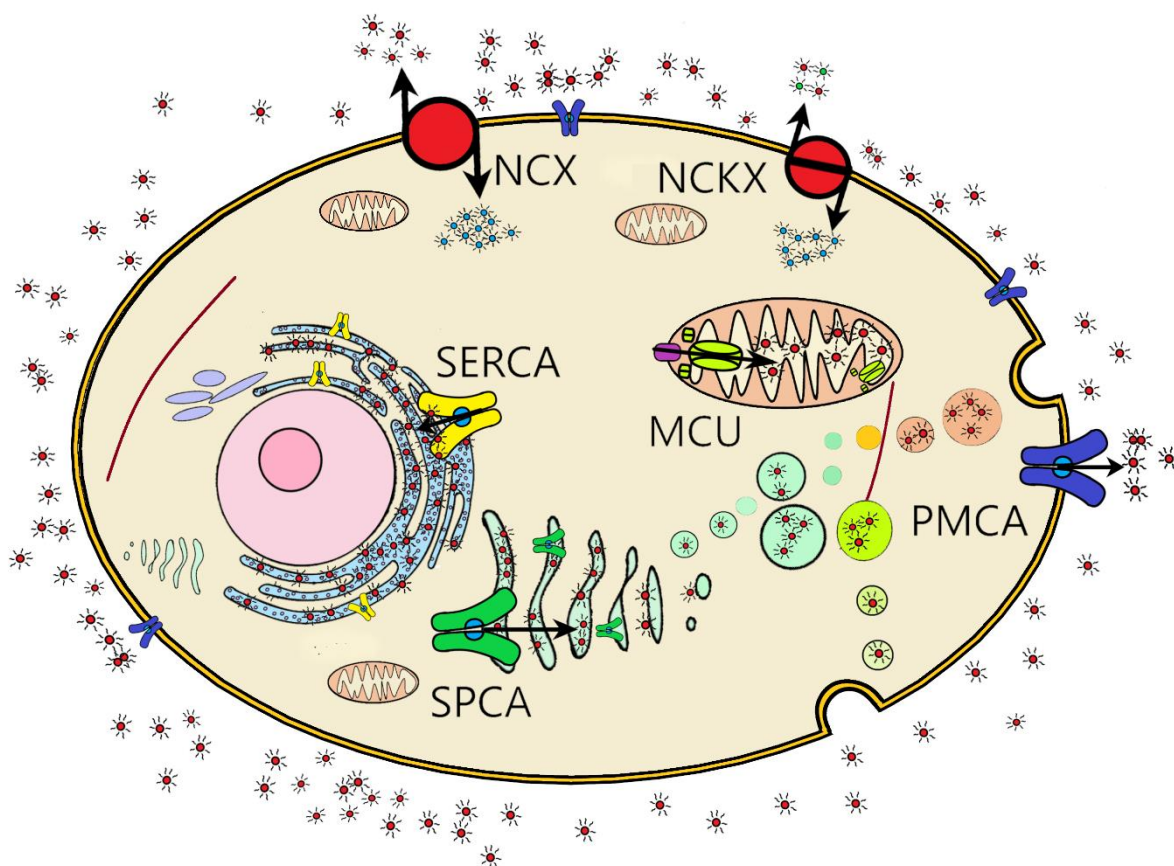


Figura 1. Mecanismos que reducen la concentración de Ca^{2+} citosólica.

ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA): Aunque posteriormente se ha descrito su presencia de forma ubicua, fue identificada inicialmente por Schatzmann como una ATPasa capaz de bombear Ca^{2+} fuera de los eritrocitos [2]. La PMCA está conformada por diez dominios transmembrana, encontrándose los extremos N y C terminal en la cara citosólica. La mayoría de los dominios reguladores de la actividad de la PMCA se encuentran en su extremo C terminal, donde destacan las zonas de interacción con fosfolípidos, proteína cinasa C (PKC), proteína cinasa A (PKA) y calmodulina (CaM). CaM se ha descrito como el activador principal de la PMCA, desbloqueando en el proceso de activación el

dominio autoinhibitorio del segmento C terminal [3], [4]. En mamíferos existen 4 isoformas de PMCA (PMCA1-PMCA4), las cuales presentan cierta similitud estructural y una expresión variable: PMCA1 y PMCA4 son ubicuas, desempeñando una función protectora. Por el contrario, PMCA2 y PMCA3 se encuentran restringidas a células excitables, albergando el sistema nervioso central una gran expresión de estas. Otro factor diferenciador entre las isoformas es su sensibilidad a CaM y sus propiedades cinéticas. PMCA2 y PMCA3 son denominadas isoformas rápidas debido a su alta actividad basal y su mayor afinidad para CaM (K_d 2-4 y 8 nM, respectivamente). Por el contrario, PMCA1 y PMCA4 tienen una cinética más lenta, incluso bajo una fuerte estimulación [5], [6].

ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarco/endoplásmico (SERCA): proteína con una masa molecular de 110 kDa y una estructura similar a la PMCA, capaz de transportar Ca^{2+} al interior del retículo sarco/endoplásmico. En mamíferos se ha descrito la presencia de 3 isoformas (SERCA1-SERCA3), aunque debido a modificaciones postraduccionales se dan forma a 10 variantes diferentes [7]. La expresión de estos subtipos varía según el tejido analizado, pudiendo observarse cambios durante los procesos de desarrollo. Ejemplo de este proceso es la isoforma SERCA1, la cual está presente tanto en el músculo esquelético de contracción rápida como en el de contracción lenta. En etapas prenatales la variante SERCA1b es expresada predominantemente, siendo totalmente sustituida por el subtipo SERCA1a durante la edad adulta [8]. También se han descrito dos variantes de SERCA2: SERCA2a se encuentra en el tejido muscular esquelético de contracción lenta y en el tejido muscular cardíaco, mediando en este último los procesos de contracción/relajación; SERCA2b, por el contrario, se expresa de forma ubicua y representa la variante más común [9], [10]. Existen 6 posibles variantes de SERCA3 en humanos (SERCA3a-SERCA3f); sin embargo, nuestro conocimiento sobre su estructura y función es escaso debido a la complejidad de los procesos de splicing alternativo que dan lugar a las diferentes isoformas. Aunque existe una gran similitud estructural entre las diferentes variantes de SERCA, la afinidad por el Ca^{2+} y las propiedades cinéticas de las mismas no son homogéneas y suelen ajustarse a los requerimientos de los tejidos en los que se hospedan. Como ejemplo, SERCA2a tiene una menor afinidad por el Ca^{2+} y una mayor velocidad que SERCA2b, satisfaciendo los requerimientos del músculo cardíaco en contraposición a la función protectora universal desarrollada por SERCA2b [11].

ATPasa de Ca^{2+} de la vía secretora (SPCA): Miembro de la subfamilia P2A, muestra cierta similitud con SERCA; sin embargo, además de presentar una alta especificidad para Ca^{2+} , destaca por su gran afinidad por iones Mn^{2+} . Estructuralmente, las bombas SPCA están compuestas por 10 dominios transmembrana y localizan los extremos amino y carboxilo terminales en la región citosólica, albergando en estas regiones varios dominios cruciales para el transporte de iones, asemejándose a la estructura de SERCA [12]. Ejemplo de esta regulación es la programación de la orientación y la selectividad de transporte de SPCA, características que son controladas por dominios localizados en las regiones amino terminal y transmembrana. La función de las bombas SPCA previene la sobrecarga de iones Ca^{2+} y Mn^{2+} , evitando la citotoxicidad asociada a este evento; al mismo tiempo, mantiene el aporte de iones Mn^{2+} al lumen del aparato de Golgi, respaldando la función de las enzimas glucotransferasas y sulfotransferasas [13], [14]. En humanos, se han identificado 2 isoformas de SPCA (SPCA1 y SPCA2), las cuales son codificadas por los genes *ATP2C1* y *ATP2C2* respectivamente [12]. Ambas isoformas exhiben diferentes patrones de expresión y distribución en los tejidos, SPCA1 se expresa de forma ubicua en los tejidos de mamíferos [15], mientras que la expresión de SPCA2 se encuentra acotada a los sistemas genitourinario, gastrointestinal y respiratorio, así como a las glándulas mamarias y salivales [16], [17]. Recientemente, se ha descrito la formación de 4 variantes de la isoforma SPCA1 generadas por splicing alternativo. Estas variantes presentarían diferentes extremos carboxilos, variando en longitud y secuencia. No obstante, las diferencias funcionales entre estas variantes son aún desconocidas [18].

Uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (MCU): La entrada de Ca^{2+} a la matriz mitocondrial es un evento de vital importancia en la síntesis de moléculas de alta energía. Tras la activación de IP_3R , se produce una inundación de la matriz mitocondrial de Ca^{2+} citosólico. Para alcanzar esta región, los iones Ca^{2+} deben atravesar la membrana mitocondrial exterior utilizando los canales aniónicos dependientes de voltaje (VDAC). Una vez en el espacio intermembranoso, el Ca^{2+} accede a la matriz utilizando el MCU, siendo impulsado por un potencial de membrana mitocondrial altamente negativo. Estos canales están formados por una proteína de 40 kDa que forma dos regiones transmembranas conectadas por un bucle, localizando los extremos amino y carboxilo en la matriz mitocondrial [19], [20]. El MCU se caracteriza

por desarrollar una corriente con carácter rectificador interno y con una alta selectividad para Ca^{2+} [21]. Además de la proteína MCU, estos canales están conformados por un macrocomplejo donde destacan otras proteínas como MICU y EMRE. MICU es una proteína que se localiza anexa a MCU y presenta un dominio EF-hand en su secuencia. Este dominio le permite detectar la $[\text{Ca}^{2+}]$ en las inmediaciones del poro y desencadenar la apertura del canal cuando se produzcan elevaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]$ en su entorno [22]–[24]. EMRE es una pequeña proteína de 10 kDa con un dominio transmembrana que se localiza en la membrana mitocondrial interna. La actividad de EMRE es esencial para la corriente de Ca^{2+} mediada por los canales MCU, ya que lidera la asociación entre las proteínas MICU y MCU [25]. La importancia de la corriente de calcio mediada por MCU radica en el efecto del Ca^{2+} sobre la maquinaria mitocondrial. Enzimas como la piruvato deshidrogenasa, la Acetoglutarato deshidrogenasa o la isocitrato deshidrogenasa son activadas por el Ca^{2+} de forma directa o a través de fosfatasas dependientes de Ca^{2+} . Al ser activadas, estas deshidrogenasas aumentarán la producción de NADH y el suministro de electrones a la cadena de transporte de electrones, respaldando en última instancia la producción de ATP [26], [27].

Intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática (NCX): Transportadores capaces de asociar el flujo opuesto de un ion Ca^{2+} y tres iones Na^+ a través de la membrana plasmática. Las proteínas NCX están conformadas por 10 segmentos transmembrana y un segmento citosólico localizado entre la quinta y sexta hélice transmembrana [28]. Dentro de esta región citosólica, denominada f-loop, se encuentran los dominios regulatorios de unión a Ca^{2+} y de unión a Na^+ , habiéndose descrito dos para el primero (CBD1 y CBD2), pero siendo aún desconocido el número y localización de los residuos regulatorios de unión a Na^+ [29]–[31]. La actividad de los NCX tiene carácter electrogénico debido al transporte desigual de cargas a ambos lados de la membrana, generando un flujo neto de una carga positiva por ciclo. De forma predominante, los NCX operan expulsando Ca^{2+} e introduciendo Na^+ en el citosol; pero en determinadas condiciones, las elevaciones puntuales de la concentración de Na^+ citosólicas en el entorno del intercambiador determinan la reprogramación de los NCX en pocos milisegundos y la ejecución del transporte inverso, introduciendo Ca^{2+} y expulsando Na^+ [32]. Debido a que la capacidad de transporte de los NCX es relativamente alta, los elementos que regulan su actividad afectan de forma inmediata a los procesos de

señalización dependientes de Ca^{2+} y Na^+ , habiéndose descrito su influencia sobre los procesos de excitación-contracción, transporte de neurotransmisores o producción de energía por la mitocondria entre otros [33]–[36]. Existen tres variantes de transportador NCX en mamíferos (NCX1, NCX2 y NCX3), las cuales son codificadas por tres genes designados de forma homóloga. La expresión de estas variantes está asociada a determinados tejidos; sin embargo, los procesos de splicing alternativo de las variantes NCX1 Y NCX3 permiten a las células configurar las propiedades de estos intercambiadores en función a los requerimientos celulares específicos: NCX1 es expresado de forma ubicua, NCX2 está presente en el cerebro y medula espinal y NCX3 es expresado en el cerebro y en el tejido muscular esquelético de forma predominante [28], [37], [38].

Intercambiadores Na^+ - Ca^{2+} dependiente de K^+ (NCKX): El genoma humano alberga 5 genes que codifican un número igual de transportadores NCKX. Estructuralmente muy similares a los NCX, los NCKX también presentan 10 dominios transmembrana y un loop intracelular localizado entre el quinto y sexto dominio transmembrana. Al realizar un ciclo, los NCKX intercambian cuatro iones Na^+ por un ion Ca^{2+} y un ion K^+ , siendo predominante durante el reposo la introducción de Na^+ y la expulsión de Ca^{2+} y K^+ [39]. Al igual que los NCX, los NCKX también invierten el sentido del transporte al producirse la despolarización celular. Sin embargo, esta inversión solo se produce con cambios extremos en el potencial de membrana o en el gradiente iónico, continuando con la extrusión de Ca^{2+} bajo una amplia variedad de condiciones [40]. La actividad de los canales NCKX está involucrada en los procesos de aprendizaje y memoria motriz, visión, olfacción, formación de los dientes o la pigmentación del pelo y piel entre otros [41]–[46].

La relación entre PMCA/SERCA/SPCA y los intercambiadores de Ca^{2+} es esencialmente complementaria. Todos estos agentes en cierta medida son relevantes a la hora de dar forma a las señales de Ca^{2+} ; sin embargo, son principalmente los intercambiadores NCKX y NCX, con su mayor capacidad y menor especificidad, los responsables de realizar esta función. Por su parte, PMCA y SERCA se caracterizan por una gran especificidad pero una baja capacidad, características que son idóneas para mantener el gradiente de reposo durante largos periodos [47].

2.1.2 Mecanismos que aumentan la concentración citosólica de Ca^{2+} :

Como ya hemos visto, estos mecanismos pueden dividirse a su vez en aquellos que promueven la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular y aquellos que produce su liberación desde los depósitos internos.

Liberación de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} :

En células no excitables, los mecanismos de señalización dependientes de Ca^{2+} suelen ser precedidos de la activación de un receptor acoplado a proteína G o un receptor tirosina cinasa, los cuales promueven la actividad de la fosfolipasa C (PLC). La PLC degrada el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato en inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG), dos segundos mensajeros intracelulares. El DAG prolonga la cascada de señalización activando mayoritariamente la PKC, aunque también realiza ciertas funciones de forma independiente a esta. De forma paralela, el IP_3 se une a receptores específicos en la membrana del retículo endoplásmico libera los depósitos reticulares de calcio interaccionando con su receptor reticular, que ejerce a su vez como canal de fuga [48]. El IP_3 juega un papel fundamental en el desarrollo de las olas y oscilaciones de Ca^{2+} inducidas por agonistas, habiéndose descrito una interdependencia entre las fluctuaciones de ambos elementos.

Receptores de IP_3 (IP_3R): descritos por primera vez por Furuichi en 1989, constituyen canales de Ca^{2+} localizados en la membrana del RE [49]. Además del IP_3 , factores como la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica e intraluminal, el pH, el ATP, iones Mg^{2+} , el estado oxidativo, o la fosforilación de ciertos residuos también controlan la actividad de estos canales. De forma paralela, se han descrito multitud de proteínas asociadas a los IP_3R capaces de regular su localización y actividad [50]–[52]. Dentro de la familia de proteínas IP_3R se han descrito tres isoformas ($\text{IP}_3\text{R1}$, $\text{IP}_3\text{R2}$ e $\text{IP}_3\text{R3}$), las cuales son codificadas por los genes *ITPR1*, *ITPR2* y *ITPR3* respectivamente. Aunque estas isoformas presentan una homología en su secuencia cercana al 75%, la heterogeneidad del resto de regiones permite establecer diferencias en la regulación por parte de otros agentes, así como en la sensibilidad para el IP_3 (siendo el $\text{IP}_3\text{R2}$ el más sensible, seguido por el $\text{IP}_3\text{R1}$ y $\text{IP}_3\text{R3}$ de forma consecutiva) [51], [53]–[56]. Los canales IP_3R son constituidos por la combinación de cuatro subunidades, con un tamaño aproximado de 300 kDa por cada subunidad, y pudiendo establecerse multitud de

combinaciones diferentes gracias a la asociación de las tres isoformas y sus variantes modificadas [57]. La combinación de las diferentes isoformas forma complejos con propiedades únicas, modificando su sensibilidad para IP_3 , ATP y Ca^{2+} [58]. Analizando la secuencia de cada subunidad, es posible distinguir los siguientes dominios: el dominio N terminal, el cual permite la asociación con otros elementos y determina la afinidad para IP_3 ; el dominio central de unión a IP_3 , constituido por 6 hélices transmembrana y responsable de conformar el canal; y el dominio C terminal, encargado de salvaguardar el poro [59]. La expresión del IP_3R es ubicua, ya que virtualmente todos los tipos celulares cuentan con al menos una isoforma, llegando en algunos tipos a expresar las tres. Mientras que IP_3R1 es la forma predominante en una gran variedad de tejidos, la expresión del IP_3R2 e IP_3R3 solo predomina en tejidos muy concretos, como es el caso del tejido muscular cardiaco y el nódulo sinoatrial para IP_3R2 , y las células epiteliales formadoras de los colangioloos para el IP_3R3 [60]–[62].

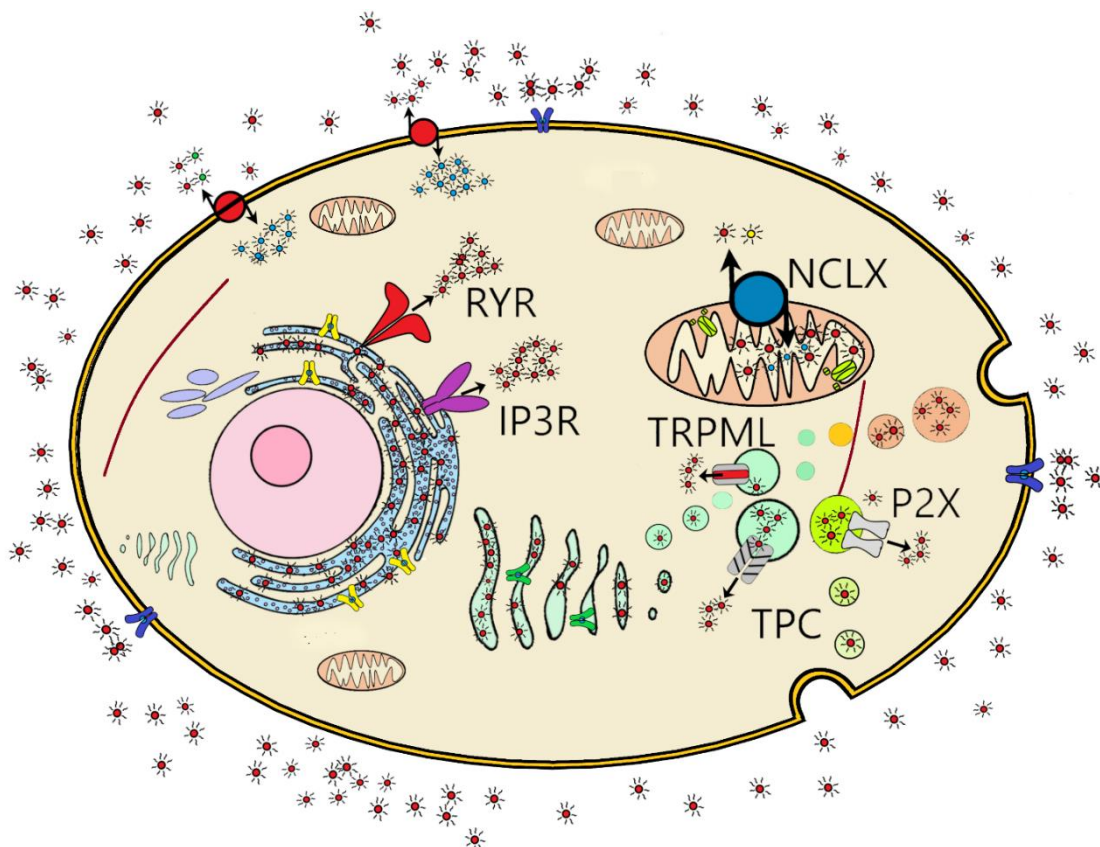


Figura 2. Agentes responsables de la liberación de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} .

Receptores de Rianodina (RyR): miembros de la misma familia que los IP_3R , ambos canales comparten multitud de similitudes en su estructura, localización y función. El canal RyR está

compuesto por un homotetramero con un peso molecular de 565 kDa por cada subunidad [63]. Estos canales han sufrido un proceso de especialización por el que forman parte de la maquinaria celular responsable del proceso de excitación-contracción del músculo estriado. En reposo, cuando la $[Ca^{2+}]$ citosólica se encuentra en torno a 100–200 nM, los RyR se encuentran cerrados y establecen varias uniones con iones Ca^{2+} , interacciones que aumenta la probabilidad de apertura del mismo [64]. Los RyR son activados por rianodina (a concentraciones inferiores a 10mM), cafeína, ADP ribosa cíclica y por Ca^{2+} (a concentraciones menores a 1 mM). Existen tres subtipos de RyR en mamíferos, RyR1 y RyR2 son necesarios para el proceso de excitación-contracción del músculo esquelético y cardíaco respectivamente [65], [66]. Durante el desarrollo, estas isoformas desempeñan ciertas funciones en tejidos no musculares, donde su actividad es regulada por la acción de diversas hormonas [67]–[70]. RyR3 se identificó inicialmente en el cerebro y posteriormente se ha descrito su presencia en una amplia variedad de tejidos [71]–[73]. Multitud de enzimas regulan la apertura y actividad de los RyR y las alteraciones en su actividad contribuye a desordenes como la distrofia muscular, fallo cardíaco, arritmias y la disfunción cognitiva [74]–[78].

Los depósitos ácidos, nombre que engloba al aparato de Golgi y organelas como endosomas y lisosomas, constituyen un depósito intracelular de Ca^{2+} de notable importancia, pudiendo albergar en su interior concentraciones de entre 30 y 300 μ M [79]. Al igual que el RE, los depósitos ácidos expresan multitud de canales permeables a Ca^{2+} , los cuales median una gran variedad de procesos de señalización dependientes de la movilización de estos depósitos de Ca^{2+} .

Canales TRP: los canales TRP se encuentran englobados dentro de la superfamilia de canales iónicos independientes de voltaje. Presentan una estructura común formada por 4 subunidades con seis segmentos transmembrana cada una [80]. El canal TRP mejor caracterizado en los depósitos ácidos son los TRPML (TRP mucolipínico), los cuales presentan 3 isoformas en vertebrados. No existe consenso sobre la permeabilidad, o sobre el mecanismo de activación de estos canales, habiéndose propuesto El NAADP o el PIP_2 como posibles activadores. TRPML2 es la isoforma mejor caracterizada de este grupo y se encuentra en una gran variedad de tejidos, siendo inicialmente localizada en la membrana

plasmática y posteriormente identificada en los depósitos ácidos. La activación de este canal se produce por la acción conjunta de la ADP-ribosa y Ca^{2+} , o por especies reactivas de oxígeno o nitrógeno (ROS/NOS) [81]. La apertura de este poro, genera una corriente poco selectiva para el calcio que interviene en la señalización de procesos inflamatorios o de secreción, pudiendo en casos extremos inducir la muerte celular [81].

Two pore channels (TPC): miembros también de la superfamilia de canales iónicos dependientes de voltaje, Los TPC presentan una estructura constituida únicamente por dos subunidades, albergando cada una 12 segmentos transmembrana organizados en tándem [82], [83]. Al igual que los TRP, los TPC se han descrito en el sistema endolisosomal, existiendo algunas diferencias entre las dos isoformas descritas: mientras que la localización de la isoforma TPC1 está ampliamente distribuida, la isoforma TPC2 es predominante en los lisosomas [84], [85]. Varios estudios han demostrado la selectividad de estos canales para el Ca^{2+} [86], aunque existe cierta controversia debido a que también se ha sugerido su posible selectividad para el Na^+ o para H^+ [87], [88]. Debido a su selectividad para Ca^{2+} y su presencia en los depósitos ácidos, los TPC se consideran los responsables de la movilización de Ca^{2+} mediada por NAADP, aunque la presencia de una proteína de unión a NAADP de forma intermedia sea más que probable [84], [85], [89]. La activación, selectividad y otras características de los TPC suscitan multitud de dudas y generan mucha incertidumbre entre la comunidad científica, siendo aún necesario esclarecer si elementos como el PIP_2 o cambios en el voltaje puedan activar también estos canales [87], [90].

Receptores ionotrópicos activados por ATP (P2X): permeables para Na^+ y Ca^{2+} , los canales P2X son formados por la unión de tres monómeros, los cuales constan de dos segmentos transmembrana cada uno. Se han descrito siete miembros de la familia de proteínas P2X, localizados inicialmente en la membrana plasmática contribuyendo al desarrollo de las señales purinérgicas [91]. Posteriormente, se ha descrito la presencia de un miembro de esta familia, P2X4, en los lisosomas de una amplia variedad de tipos celulares [92], [93]. La activación de las variantes intracelulares de P2X genera multitud de incógnitas al presentar los dominios de unión a ATP en el lumen de la organela. Esta disposición podría justificarse con el transporte de ATP al interior de las vacuolas, posibilitando que las variaciones en la concentración citosólica de ATP pudieran modular la actividad del canal.

La mitocondria es un orgánulo celular de vital importancia debido a su rol en la síntesis de ATP y a su implicación en los procesos de señalización dependientes de Ca^{2+} . El papel de esta estructura en la homeostasis del Ca^{2+} es conocido desde antes a que se identificara el RE como principal almacén interno. La capacidad de la mitocondria para almacenar calcio se fundamenta en la síntesis de precipitados en la matriz mitocondrial, originados tras la asociación de fosfatos y el Ca^{2+} mitocondrial ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). La $[\text{Ca}^{2+}]$ dentro de la mitocondria puede variar desde valores cercanos a $0.1\mu\text{M}$ hasta el rango milimolar, esta variabilidad es necesaria para garantizar la actividad bioenergética de la célula, adaptando la síntesis de ATP a los estímulos generados por diversos agonistas [26], [27]. De forma paralela, la mitocondria también interviene en la señalización de algunos procesos celulares como la exocitosis, controlando la $[\text{Ca}^{2+}]$ en las inmediaciones de las vesículas [94].

Intercambiador mitocondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{Li}^+$ (NCLX): el intercambiador de Ca^{2+} de la mitocondria es una proteína de 60 kDa presente virtualmente en todos los tejidos. Por cada ciclo completado, el NCLX elimina un ion Ca^{2+} de la matriz mitocondrial e introduce tres Na^+ a la misma, siendo capaz de desarrollar 1000 ciclos por segundo. Al contrario que otros miembros de la superfamilia NCX, que son regulados por la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica, la actividad de NCLX no es influenciada por la $[\text{Ca}^{2+}]$ de la matriz mitocondrial. Varios estudios han confirmado la capacidad de la cinasa inducida por PTEN (PINK1) para activar a la PKA y, a través de esta, regular la actividad de los NCLX [95]–[97]. De forma paralela a los NCLX, los intercambiadores Na^+/H^+ de la mitocondria controlan el contenido de Na^+ en la misma, siendo su actividad crítica para mantener el gradiente de Na^+ a través de la membrana mitocondrial y por consiguiente la actividad de los NCLX. Los NCLX participan en multitud de mecanismos de señalización y son de vital importancia para la comunicación entre la mitocondria y la membrana celular. La movilización de Ca^{2+} producida por este transportador media la secreción de insulina en las células β pancreáticas, la secreción de neurotransmisores por los astrocitos o la plasticidad y desarrollo neuronal entre otros [98]–[101].

Fuera de los mecanismos de señalización tradicional, el Ca^{2+} reticular experimenta fugas pasivas de forma constante. Este proceso se observa de forma clara al utilizar inhibidores de

la bomba SERCA, como la taspigargina, que producen el vaciamiento pasivo del retículo endoplásmico, induciendo estrés reticular y la muerte celular. Algunos miembros de la familia "*Transmembrane BAX inhibitor motif-containing*" (TMBIM) han sido descritos como responsables de este proceso. La familia TMBIM está compuesta por seis miembros y se trata de proteínas implicadas en el control de la muerte celular [102]. Su estructura sugiere la formación de canales de fuga de Ca^{2+} reticular sensibles a pH [103], [104]. Otros agentes, como el complejo formado por el translocón, la proteína antiapoptótica BCL-2, las presenilinas y una versión de SERCA troncada (SERCA1T) han sido propuestos como responsables de este escape de Ca^{2+} , aunque hasta la fecha no está claro su implicación [105]–[109]. Por último, el RE cuenta con un sistema destinado a evitar las sobrecargas de Ca^{2+} y salvaguardar los procesos de señalización dependientes del mismo. Al aumentar de forma descontrolada la concentración de Ca^{2+} reticular, cuatro unidades de la proteína "*Transmembrane And Coiled-Coil Domains 1*" (TMCO1) homomerizan, formando un poro que alivia esta sobrecarga y evita el desarrollo de alteraciones en la homeostasis y el resultante estrés reticular [110].

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

Como se ha descrito anteriormente, la estimulación de la célula por agonistas produce la liberación de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} , el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]$ citoplasmática y la señalización de los procesos celulares. En determinadas ocasiones y debido a su carácter finito, la movilización de Ca^{2+} desde los depósitos no es suficiente para satisfacer elevaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]$ más intensas o sostenidas, requiriendo de la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular. En la membrana plasmática existen diferentes canales permeables a Ca^{2+} que presentan una amplia variedad de propiedades biofísicas. De acuerdo a su mecanismo de activación, podemos diferenciar entre: canales activados por cambios en el voltaje de la membrana, denominados canales operados por voltaje (VOCs); canales activados por la unión de un agonista a su receptor, siendo posible distinguir dentro de este grupo entre los canales que desempeñan una función dual, tanto receptor como poro (ROCs), y los canales activados por segundos mensajero (SMOCs); y por último, canales activados por el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} (SOCs)

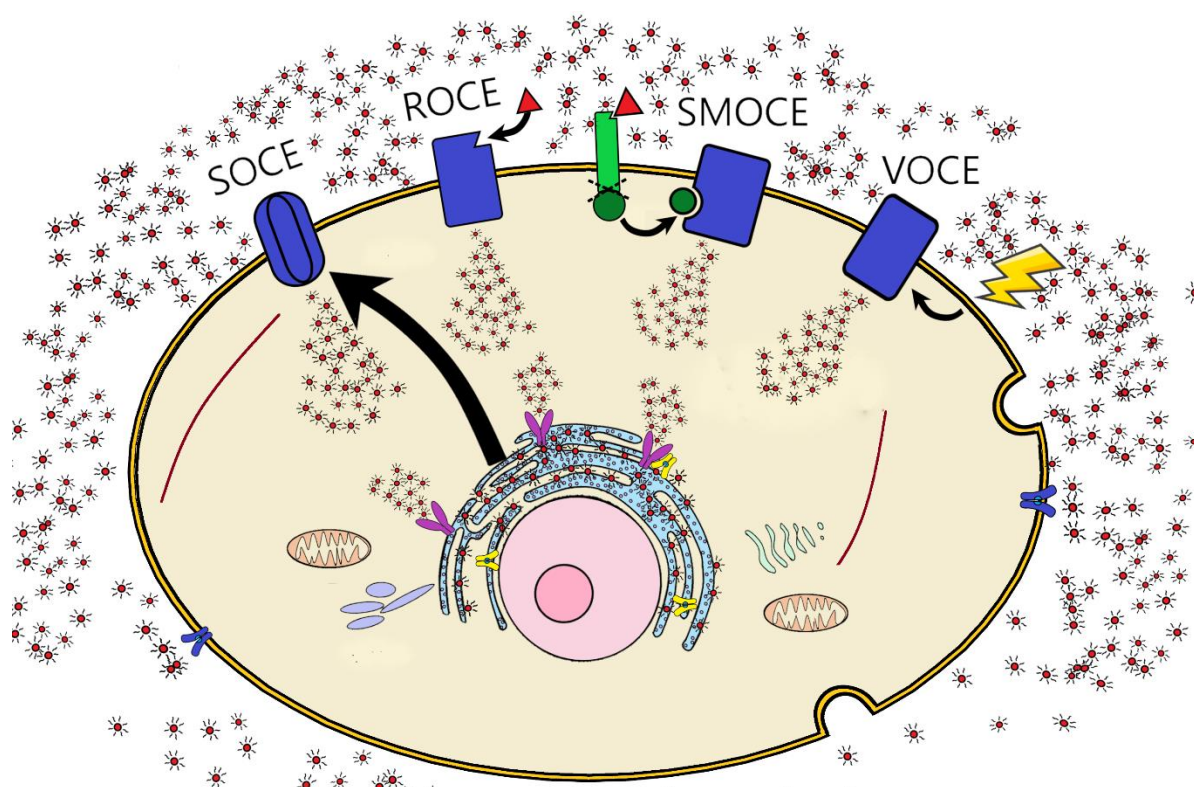


Figura 3. Mecanismos de entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular.

Entrada de Ca^{2+} operada por voltaje (VOCE):

El potencial de membrana de una célula refleja la desigual distribución de los iones Na^+ , Cl^- y K^+ a través de la membrana plasmática. Este gradiente iónico es generado por diversas bombas y poros que determinan una permeabilidad concreta para cada ion. El potencial de membrana juega un papel vital en procesos como la estimulación celular, el transporte de iones y nutrientes, o la transducción de señales [111]. Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje transducen los cambios en el potencial de membrana permitiendo la entrada de Ca^{2+} durante breves periodos de tiempo y elevando la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica. La familia de canales de Ca^{2+} operados por voltaje está formada por 10 miembros, los cuales se diferencian por la subunidad α_1 , que será la formadora del canal. Esta subunidad, que varía entre los 190 y 250 kDa, contiene también los dominios encargados de detectar los cambios en el voltaje y dominios de unión a diversas drogas y moduladores. La subunidad α_1 se encuentra acompañada por una amplia variedad de subunidades accesorias, las cuales controlan la localización del canal, la estabilización del mismo en la membrana o, en algunos casos, la

regulación de su actividad [112]. Los diez miembros pueden agruparse en tres subfamilias: La subfamilia de canales Ca_v1 media procesos como el inicio de la contracción y la secreción, regula la expresión de genes y participa en la integración de la recepción de señales y transmisión sináptica en neuronas y células sensoriales especializadas. La subfamilia de Ca_v2 interviene en la transmisión del impulso en sinapsis rápidas. Y por último, la subfamilia Ca_v3 participa en la ejecución de señales rítmicas en el miocardio o en las neuronas del tálamo [113].

Entrada de Ca^{2+} activada operada por receptor (ROCE) o segundo mensajero (SMOCE):

Como hemos visto anteriormente, la entrada de Ca^{2+} mediada por receptor puede dividirse según la funcionalidad del receptor en el proceso. Receptores ionotrópicos, localizados comúnmente en células secretoras, terminaciones nerviosas, músculo liso vascular o en el lecho vascular, median la entrada de Ca^{2+} al interior celular de forma directa al ser activados por agonistas. Algunos de estos agentes activadores son el ATP o ADP (agonistas de los receptores purinérgicos P2X [114]), el glutamato (agonista de los receptores iGluRs), la acetilcolina (agonista de los receptores nicotínicos ionotrópicos nAChRs [115]) y otros neurotransmisores. En otros casos, la activación de receptores metabotrópicos habilita un segundo mensajero que será el responsable de la activación del canal (SMOCE). Existe una gran variedad de segundos mensajeros capaces de activar la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular, pudiendo destacar los nucleótidos cíclicos, derivados de lípidos como el DAG, el ácido araquidónico y sus metabolitos, el mismo Ca^{2+} , o la actividad de la PKC [116], [117].

2.2 Entrada de Ca^{2+} activada por el vaciamiento de los depósitos intracelulares o entrada capacitativa de Ca^{2+} (ECC o SOCE):

El vaciamiento de los depósitos intracelulares tras la activación de los IP_3R desencadena la corriente de Ca^{2+} desde el medio extracelular conocida como Entrada Capacitativa de Calcio (ECC), o por su nombre en inglés *Store-Operated Calcium Entry* (SOCE). La ECC desempeña una función dual, permitiendo el relleno de los depósitos intracelulares y participando en los mecanismos de señalización intracelular [118], [119]. Originalmente, las características biofísicas de la ECC se describieron en mastocitos, donde se instauró el término I_{CRAC} (del inglés *Calcium Released Activated Current*) para definir una corriente altamente selectiva a

Ca^{2+} , con carácter rectificador interno y con un potencial de reversión cercano a los 60 mV [120]. Posteriormente se ha continuado estudiando las características de la corriente I_{CRAC} , fruto de estos estudios conocemos el efecto inhibitorio sobre la corriente I_{CRAC} de bajas concentraciones de lantánidos [121].

Desde que Putney describiera por primera vez la ECC en 1986, se ha desarrollado un intenso debate científico acerca de los agentes responsables de este mecanismo de señalización. La familia de canales TRPC se propuso inicialmente como la responsable de esta corriente, hipótesis fundamentada en la activación de los canales TRPC tras la actividad de la PLC [122]. La descripción de las propiedades biofísicas y farmacológicas de las corrientes mediadas por los TRPC, que resultaron ser diferentes a las de la corriente I_{CRAC} , descartó a esta familia de proteínas como responsables de la entrada de Ca^{2+} descrita en mastocitos. Muchos autores siguen apoyando el rol de la familia de canales TRPC en la ECC de algunos modelos celulares, desarrollando una corriente capacitativa alternativa, la cual se ha designado como I_{SOC} menos selectiva para calcio y con una gran relevancia funcional [123]–[125]. En 2005 y 2006 respectivamente, las proteínas STIM1 y Orai1 se describieron como los agentes responsables de la ECC [126]–[128]. STIM1 y su homólogo STIM2 son capaces de detectar variaciones en las $[\text{Ca}^{2+}]$ reticular y disparar la ECC cuando estas disminuyen. Para activar la entrada de Ca^{2+} al interior celular, STIM contacta y activa los canales de membrana formados por las proteínas Orai, responsables de la corriente I_{CRAC} .

2.2.1 Mediadores de la ECC: proteínas STIM1 y Orai1:

STIM1 es una proteína de tipo I con un único dominio transmembrana y una masa molecular de 75kDa (685 aminoácidos), la cual se localiza mayoritariamente en la membrana del RE, aunque también se ha descrito su presencia en la membrana plasmática. En su extremo N terminal, situado en el lumen del retículo, STIM1 presenta un dominio EF-hand que le permite detectar la $[\text{Ca}^{2+}]$ reticular [129]. Adyacentes, un dominio EF-hand alternativo y un dominio alfa estéril (SAM) estabilizan esta región. En su conjunto, estas tres regiones son conocidas como región EF-SAM. El extremo citosólico de STIM1 está formado por tres dominios *coiled coil* (CC), siendo el primer CC a su vez subdividido en tres regiones (CC1 α 1, CC1 α 2, CC1 α 3). Consecutivamente, una región rica en serina/prolina y un extremo polibásico completan la secuencia de STIM1.

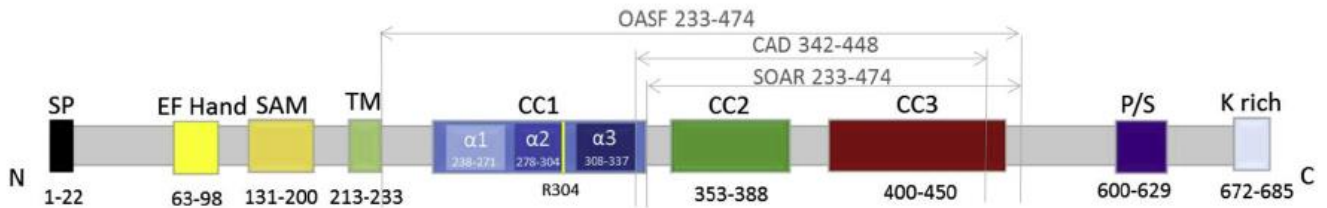


Figura 4. representación esquemática de los dominios de STIM1 y las secuencias de unión a Orai1 [130].

En estado de reposo, cuando la $[Ca^{2+}]$ reticular supera los $400 \mu M$, el sitio de unión a Ca^{2+} localizado en el EF-hand canónico se encuentra asociada a este ion, inhibiendo con ello la activación de STIM1. Además de este sitio, recientemente se han descrito entre 4 y 5 sitios de unión a calcio adicionales en la región EF-SAM, presentando una K_d en conjunto cercana a $200 \mu M$. Estas superficies alternativas estarían relacionadas energéticamente al EF-hand canónico y jugarían un papel tanto en la estabilización del mismo como en la activación de STIM1 [129]. En la forma quiescente, los monómeros de STIM1 se asocian formando dímeros con carácter autoinhibitorio, unión que es alcanzada a través de la interacción de los dominios *coiled coil* situados en la región citosólica. [131]. Esta asociación se ha descrito como una unión antiparalela en forma de “V” entre los dominios CC2 y CC3 de las dos unidades, siendo crucial para la estabilización de esta estructura las interacciones entre los residuos complementarios de ambos monómeros (R429, W430, I433 y L436 con T354, L351, W350 y L347 respectivamente). Paralelamente, la estructura es empaquetada gracias a interacciones entre los dominios CC1 α 1 y CC3, y CC1 α 3 y la región localizada entre CC2 y CC3, siendo este plegado de vital importancia para evitar la activación de las proteínas STIM y la entrada de Ca^{2+} constitutiva [132], [133].

Tras la activación celular y la apertura de los canales de Ca^{2+} reticulares, la concentración luminal de este ion se reduce y los sitios de unión a Ca^{2+} de la región EF-SAM quedan libres. Este evento activa a STIM1 produciendo un cambio conformacional en la estructura secundaria de la región luminal y la dimerización de estas regiones [134], [135]. Sin embargo, recientemente se ha descrito que solo la dimerización del EF-SAM es necesaria para la activación de STIM1, restando relevancia al cambio de la estructura de este dominio [129]. Adicionalmente, el dominio SAM se ha propuesto como una estructura capaz de

mediar la unión de las regiones luminales de STIM1, siendo posible establecer un nivel superior de organización tras la interacción entre los dominios SAM de varios dímeros [135]. Tras la liberación de los sitios de unión a Ca^{2+} , la asociación de las regiones luminales de STIM1 desencadena la reorganización de esta proteína, proceso que incluye la aproximación de los dominios transmembrana y el despliegue de la región citosólica. Dentro de la región transmembrana, son necesarias tres glicinas (G223, G225 y G226) para garantizar la flexibilidad de la estructura y la transmisión de la señal activadora hacia el dominio citosólico [136], [137]. En la región citosólica, el proceso de activación determina la ruptura de las interacciones inhibitorias, la elongación de STIM1, así como la exposición hacia la membrana plasmática de los dominios CC2, CC3 y el extremo polibásico [136], [138]. Esta nueva organización se estabiliza gracias a la asociación de los dominios CC1 α 1 del dímero [131], desconociéndose aun si los dominios CC1 α 2 y CC1 α 3 estabilizan de forma similar la forma activa de la molécula. Sin embargo, existen indicios claros de su participación en el proceso de reorganización de STIM1. La mutación de STIM1 R304W, localizada entre los dominios CC1 α 2 y CC1 α 3, promueve el fenotipo patológico asociado al síndrome de Stormorken al reforzar la interacción entre los CC1 α 1 del dímero, bloqueando así la formación de las interacciones inhibitorias. Como resultado, la mutación R304W activa de forma constitutiva el dímero de STIM1 promoviendo un aumento de la entrada de Ca^{2+} dependiente del mismo [139]. Cuatro grupos de investigación describieron de forma simultánea la región de STIM1 responsable de contactar y activar los canales Orai. Todos los fragmentos propuestos (denominados OASF, CAD, SOAR y CCB9) incluyen los dominios CC2 y CC3, además de 19 aminoácidos adicionales [140]–[143]. La región polibásica, localizada cercana al extremo carboxilo, se ha descrito como el elemento de STIM1 encargado de contactar con los fosfolípidos de la membrana. Junto con la región SOAR, ambas regiones serían responsables del movimiento de STIM1 hacia las zonas de aproximación entre membrana y retículo y la formación de “puncta” [144]–[146]. Por tanto, el cambio conformacional de STIM1 tras su activación le habilita para oligomerizar, contactar con los agentes localizados en la membrana plasmática, reconfigurar su localización formando “puncta” y activar la entrada de Ca^{2+} a través de los canales capacitativos.

Orai1 es una proteína de 33 kDa (301 aminoácidos) identificada como el canal responsable de la corriente I_{CRAC} . Debido a su funcionalidad, Orai1 se localiza predominantemente en la membrana plasmática, presentando tanto el extremo amino como el carboxilo en la región

citoplasmática. Dentro de la secuencia de Orai1 se distinguen cuatro hélices transmembrana conectadas por dos loops extracelulares y uno intracelular [128]. La estructura cuaternaria del canal Orai1 está formada por la unión de seis monómeros, los cuales forman el poro con la asociación de los primeros dominios transmembrana de cada subunidad, describiendo el resto de dominios transmembrana círculos concéntricos alrededor del poro [147].

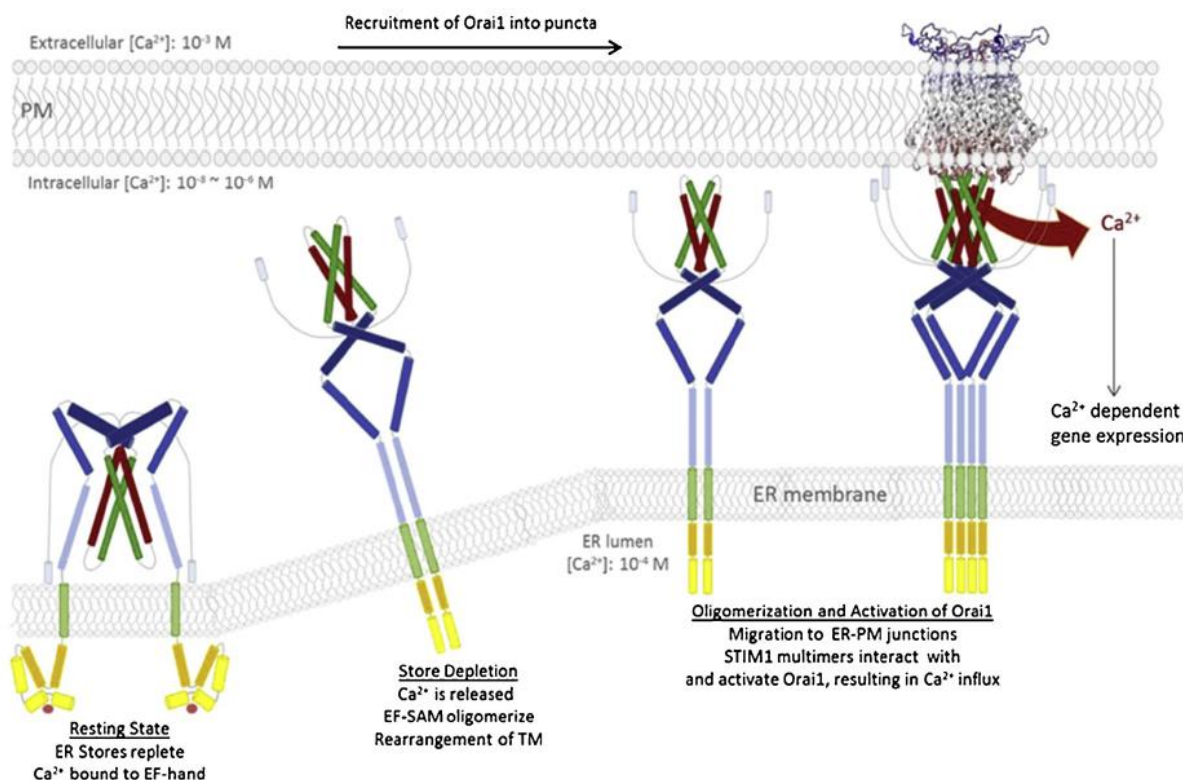


Figura 5. Modelo simplificado del mecanismo de activación de la ECC [130].

Cerca de la región extracelular del poro, el residuo glutamato E106 forma el filtro de selectividad del canal. Función que es desarrollada gracias a la carga negativa de estos residuos y a la proximidad de los mismos, los cuales forman el segmento más estrecho del poro [147]. Inmediatamente por debajo del filtro de selectividad se localizan tres anillos compuestos por residuos hidrofóbicos (V102, F99, L95), constituyendo la acción conjunta de los dos primeros una barrera hidrofóbica que impide la entrada de Ca^{2+} mientras el canal se encuentra inactivo. Por último, el poro se completa con tres residuos básicos (R91/K87/R83) que serán de vital importancia en la conducción del Ca^{2+} tras la activación de Orai1 [147]. Otra región de interés para la conductividad de Orai1 está localizada en el primer loop extracelular y cercana al filtro de selectividad. En esta región, Frischauf *et al.* han descrito la existencia de un microdominio formado por dos residuos de aspartato (D110 y D112), los

cuales sería capaces de acumular Ca^{2+} en la inmediaciones del poro e incrementar la conductividad del canal cuando la concentración extracelular de Ca^{2+} sea baja [148]. En el segmento citosólico del poro, el extremo N-terminal de Orai1 alberga una gran cantidad de dominios involucrados en la regulación del canal (posteriormente detallados al desarrollar las isoformas de Orai1 y los mecanismos inhibitorios de los canales CRAC). Dentro de esta región, los 18 aminoácidos previos a la primera hélice transmembrana constituyen el dominio ETON (del inglés *Extended TM Orai1 NH2-terminal*); esta región ha sido identificada como una de las superficies de interacción con STIM1 durante la activación del canal. En el extremo opuesto de Orai1, los dominios CC localizados en el extremo C terminal interactúan con el dominio SOAR de STIM1 durante la activación del canal. Sin embargo, cuando el canal se encuentra inactivado los extremos carboxilos de Orai1 se asocian en parejas gracias a la interacción antiparalela de su secuencia [147].

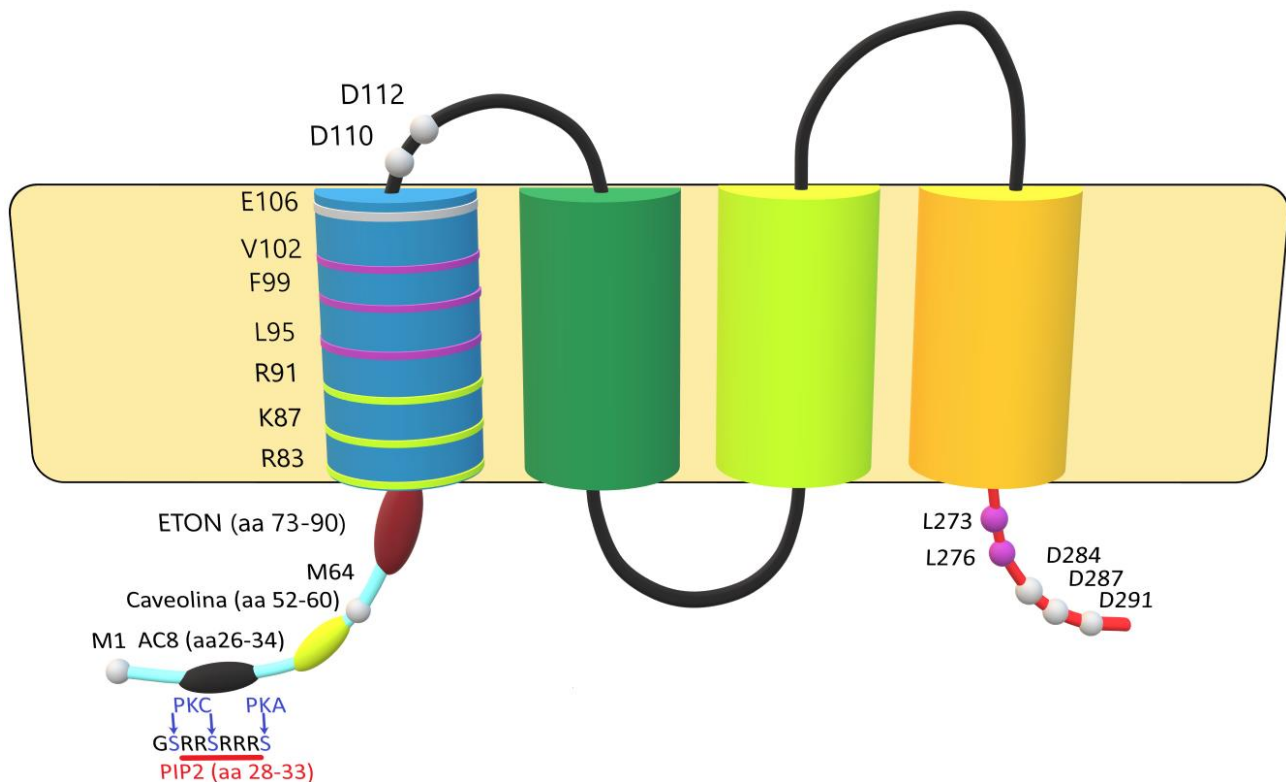


Figura 6. Representación de la estructura de Orai1 y algunos de sus regiones más significativas.

El proceso de activación del canal Orai1 ha sido un tema ampliamente discutido en los últimos años por la comunidad científica; sin embargo, existe cierto consenso sobre la capacidad de STIM1 para interactuar de forma directa con el canal Orai1 induciendo un cambio conformacional y desencadenando la entrada de Ca^{2+} a través del mismo. Las

hipótesis iniciales respaldaban un modelo de interacción bifásica donde STIM1 se asociaba al extremo carboxilo de Orai1 y posteriormente inducía la apertura del canal al interactuar con el extremo amino [149]–[151]. Estudios más recientes optan por la idea de que la interacción entre STIM1 y Orai1 a través de los dominios C-terminal es suficiente para activar el canal [152], o por modelos donde la unión de STIM1 a ambos extremos de Orai1 ejerza una acción sinérgica [153], [154]. La unión entre los extremos carboxilos de ambas proteínas se fundamenta en la interacción anti paralela de los dominios CC de ambas secuencias, involucrando por parte de Orai1 dos leucinas (L273 y L276) y varios residuos aspartato con carga negativa (D284, D287 y D291), al igual que varios residuos básicos localizados en el CC2 de STIM1 (K382, K384, K385 y K386) [155]. Aunque la asociación de los extremos C terminal de Orai1 y STIM1 juega un papel predominante en la activación del canal, no existen un consenso claro sobre la función que desempeña el extremo N-terminal en este proceso. Recientemente se ha puesto en duda la capacidad de este segmento para interactuar con STIM1, debido a que análisis estructurales de Orai1 describen el extremo N-terminal aislado por otros segmentos transmembrana [147]. Otro aspecto controvertido en la activación de Orai1 son los cambios morfológicos que experimenta el poro. El análisis de canales abiertos de forma constitutiva (debido a la mutación H134A) propuso inicialmente una relación entre el primer y el segundo segmento transmembrana de Orai1. Interacción que, al ser activado el canal, induce la rotación del primer segmento transmembrana y el desplazamiento del residuo F99 del centro del poro, habilitando con ello el paso de iones Ca^{2+} a través del mismo [156]. Estudios cristalográficos más recientes, que utilizaron otras mutaciones para inducir la apertura del canal (H206A y P288L), describieron una dilatación del poro al ser activado Orai1. Este ensanchamiento, que es más evidente en la región básica, permitiría la entrada de aniones al microdominio citosólico del poro, neutralizando los residuos básicos de esta región y asistiendo el paso de los iones Ca^{2+} a través del canal [157], [158].

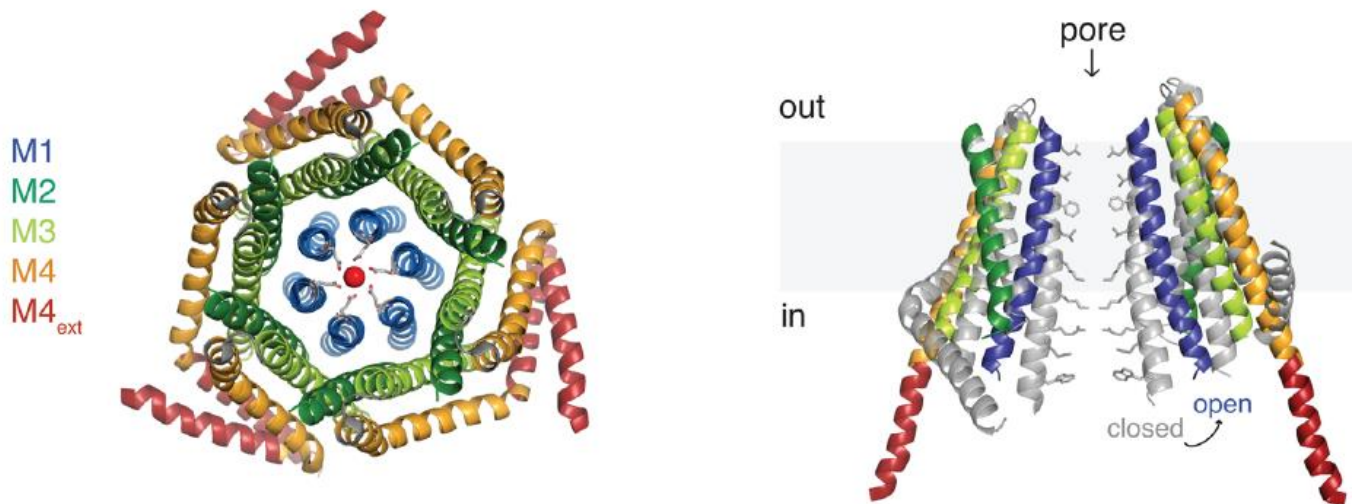


Figura 7. Vista cenital de la estructura cuaternaria del canal Orai1 (izquierda) [147]. Modelo de apertura del canal Orai1 tras la mutación H206A (derecha) [159].

La relación estequiométrica entre Orai1 y STIM1 ha resultado ser un factor crucial en los procesos de activación y regulación de la entrada capacitativa. Aunque la formación del canal Orai1 por seis unidades está ampliamente aceptada, no existe tal consenso sobre la organización de las moléculas de STIM1 ni la relación estequiométrica mantenida entre ambas proteínas. Como se ha detallado anteriormente, algunos autores han propuesto la formación de dímeros de STIM1 durante el reposo celular gracias a la interacción de los dominios SOAR [160]. Tras el vaciamiento de los depósitos, un cambio conformacional rompe las interacciones basales, permitiendo al dominio SOAR desplegarse hacia la membrana y habilitar la asociación de los dominios CC1 [131], [161]. Al mismo tiempo, se ha propuesto que los dímeros activados de STIM1 podrían asociarse a otros dímeros a través de su extremo luminal y dominio transmembrana, formando estructuras de mayor complejidad [162]. Yen y Lewis han descrito un modelo donde todos los monómeros constitutivos del canal Orai1 deben asociarse y ser activado por un STIM1 para desarrollar una corriente I_{CRAC} canónica [163]. Este hecho no aclara la relación numérica entre las moléculas de ambos agentes, pudiendo darse una interacción entre dímeros donde cada unidad del dímero de STIM1 se asocie a una unidad de Orai1 del mismo canal, o una relación monomérica, donde las subunidades del dímero de STIM1 se asocian a hexámeros distintos. No es descartable que ambos tipos de relación puedan tener lugar al mismo tiempo, aunque la hipótesis de una relación monomérica tiene un mayor respaldo debido a

que es capaz de explicar la agrupación de los canales Orai1 en ciertas regiones de la membrana al ser activados por STIM1.

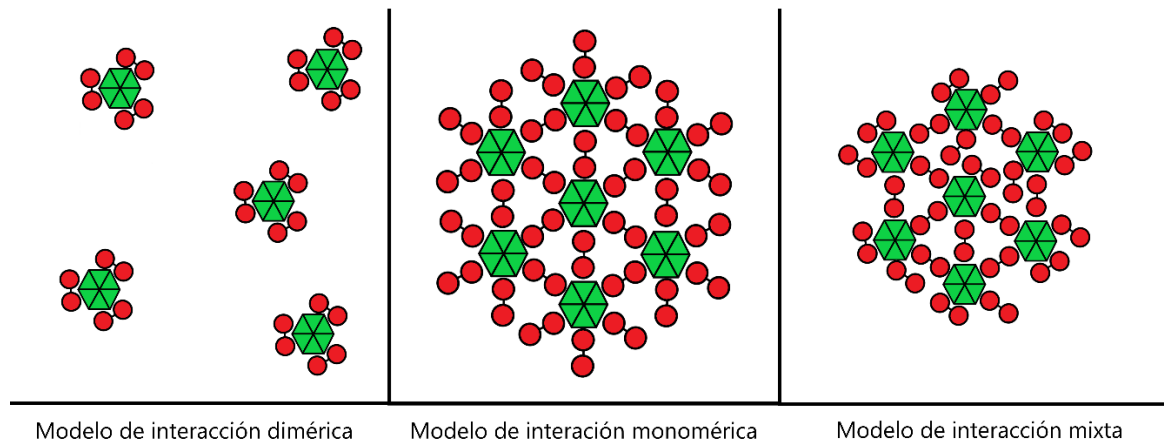


Figura 8. Modelos de relación estequiométrica entre STIM y Orai. Adaptado de [159]. En rojo se representan los dímeros de STIM1 y en verde los canales Orai1 como estructuras hexaméricas.

2.2.2 Mecanismos de regulación de la ECC:

Las sobrecargas de Ca^{2+} son un evento citotóxico comúnmente asociado a procesos como la apoptosis, necrosis y autofagia celular [164]. En consecuencia, los mecanismos de entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular son desplegados bajo estrictos sistemas de inhibición. Las corrientes CRAC mediadas por Orai1 no suponen una excepción, habiéndose descrito dos mecanismos inhibitorios dependientes de Ca^{2+} . Una de las principales características de la corriente I_{CRAC} es su inactivación a los pocos milisegundos tras su activación, mecanismo que ha sido denominado inactivación rápida dependiente de Ca^{2+} o FCDI (del inglés *Fast Ca^{2+} -Dependent Inactivation*). Debido a su carácter inmediato y a su independencia respecto la amplitud de la corriente, se ha sugerido que este mecanismo es activado por el Ca^{2+} que penetra a través del poro, probablemente uniéndose al canal en algún dominio inhibitorio localizado en el lado citosólico [165], [166]. El loop intracelular de Orai1 o el dominio de unión a CaM, localizado en el extremo amino, han sido propuestos como responsables de este mecanismo inhibitorio [167], [168]. Sin embargo, la participación del dominio de unión a CaM se descubrió altamente improbable al publicarse la estructura del canal Orai1, encontrándose esta región en el lumen del poro siendo inaccesible para la calmodulina. Aunque no se consideró inicialmente, STIM1 parece ser necesario para el desarrollo de este mecanismo inhibitorio. Papel que será mediado a través de una interacción alostérica entre

los residuos básicos de STIM1 (D476/D478/D479) y el residuo W76 de Orai1. La interacción entre estos residuos daría lugar al movimiento de las cadenas laterales de W76 hacia el centro del poro y la formación de una barrera hidrofóbica [169].

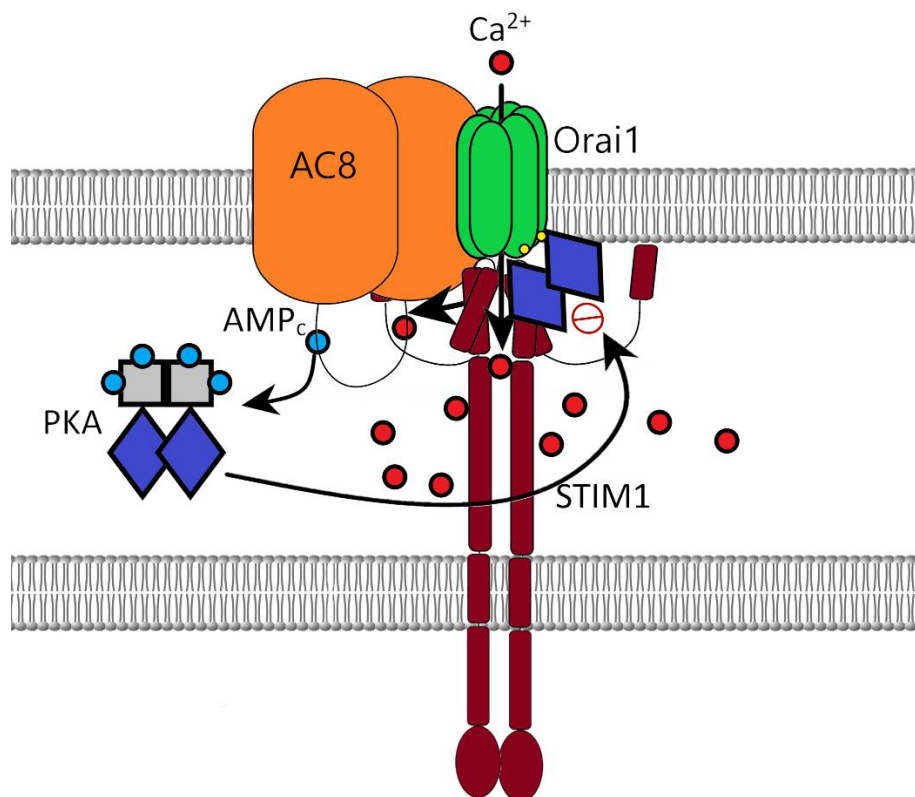


Figura 9. Modelo esquemática del mecanismo inhibitorio de AC8 sobre Orai1.

Otro agente que ha sido recientemente involucrado en este mecanismo inhibitorio es la adenilato ciclasa 8 (AC8). Estudios previos determinaron la asociación constitutiva entre Orai1 y AC8 a través de la interacción de sus extremos aminos, asociación que se propuso como necesaria para la activación de la ciclasa por el Ca^{2+} que penetra a través de Orai1 [170]. Posteriormente, Zhang *et al.* han descrito la capacidad de AC8 para establecer un sistema de retroalimentación negativa que inactiva Orai1. De esta forma, tras ser estimulada por el Ca^{2+} , la AC8 media la activación de la PKA a través del incremento en la $[AMP_c]$ citosólico, siendo PKA responsable de inducir la inactivación del canal Orai1 a través de la fosforilación del residuo S34 de cada subunidad de Orai1. En definitiva estos sistema de regulación determinan las características de la ECC y regulan la activación de los procesos celulares dependientes de la señal de Ca^{2+} [171].

Unos segundos tras la activación del canal Orai1, la elevación en la $[Ca^{2+}]$ citosólica activa un segundo mecanismo de regulación denominado inactivación lenta dependiente de Ca^{2+} o SCDI (del inglés *Slow Ca^{2+} -Dependent Inactivation*) [172]. Dos agentes, SARAF y CaM, han sido descritos como los mediadores de este mecanismo, existiendo evidencias para afirmar que ambos inducen un efecto inhibitorio ligeramente diferente.

- CaM: es una proteína ubicua involucrada en la transducción de las señales de Ca^{2+} y la posterior activación de procesos celulares. Para desarrollar estas funciones, CaM es capaz de determinar la $[Ca^{2+}]$ citosólica y experimentar un cambio conformacional con el aumento de esta. Este proceso determina la exposición de regiones con carácter hidrofóbico que le permiten interactuar con multitud de agentes y modular su actividad [173], [174]. Dentro de los elementos regulados por CaM se encuentran multitud de proteínas, enzimas o canales iónicos, desempeñando en estos últimos un papel fundamental al mediar los mecanismos inhibitorios dependientes de Ca^{2+} [175], [176]. Dentro del mecanismo de ECC, se ha propuesto un modelo de inactivación por CaM que sería mediado a través de una interacción directa con STIM1. Interacción que involucraría dos regiones hidrofóbicas (L374/V375 y L390/F391) por parte de STIM1, siendo los mecanismos de SCDI totalmente bloqueados al ser mutados estos residuos por aminoácidos menos hidrofóbicos [177].
- SARAF es una proteína de 339 aminoácidos localizada tanto en el RE como en la membrana plasmática. Dentro de su estructura destacan una región luminal, un dominio transmembrana y un segmento citosólico, presentando en este último varios dominios ricos en serina/prolina y arginina. Brevemente, el dominio luminal de SARAF está involucrado en la regulación de la actividad de SARAF, siendo el extremo citosólico el que participa en los procesos de inactivación de la entrada capacitativa [178], [179]. En estado basal, SARAF interactúa con la región de STIM1 448-530, segmento denominado CTID (del inglés *C-terminal inhibitory domain*), estableciendo a través de esta interacción un bloqueo inhibitorio que impide la activación de los canales Orai en estado basal [178], [180]. Tras el vaciamiento de los depósitos, SARAF y STIM1 se disocian permitiendo el cambio conformacional del

segundo y la apertura de los canales Orai1. Tras un breve periodo, SARAF induce la inactivación del sistema al reasociarse con STIM1. Es llamativo como la actividad reguladora de SARAF sigue un patrón dependiente de la $[Ca^{2+}]$ citosólica y el relleno de los depósitos reticulares; sin embargo, esta proteína no cuenta con ningún dominio capaz de interactuar con Ca^{2+} . Recientemente, Albarran *et al.* han descrito como la proteína EFHB es capaz de sincronizar la relación entre STIM1 y SARAF en función de la $[Ca^{2+}]$ citosólica. EFHB es una proteína localizada en el citosol que alberga dos dominios de unión a Ca^{2+} . Tras el vaciamiento de los depósitos, EFHB se asocia a STIM1 desplazando en esta acción a SARAF y promoviendo la activación completa de la ECC. Al producirse la entrada de Ca^{2+} a través de los canales Orai, EFHB se disocia de STIM1, habilitando el retorno del bloqueo impuesto por SARAF y los mecanismos de SCDI [181].

Las proteínas Golli y ORMDL3 también se han identificado como parte de la maquinaria celular implicada en el mecanismo de SCDI. Las proteínas Golli son isoformas de la proteína básica de mielina generadas a partir de procesos de splicing alternativo, las cuales son conocidas por desarrollar un papel fundamental en los procesos de mielinización del tejido nervioso [182]. Walsh *et al.* han descrito la capacidad de Golli para inactivar los canales CRAC de forma dependiente a la $[Ca^{2+}]$ citosólica, papel inhibitorio que es desarrollado al asociarse al extremo carboxilo de STIM1 [183]. ORMDL3 es una proteína localizada en la membrana reticular que presenta ambos extremos, amino y carboxilo, en la región citosólica. La actividad de ORMDL3 ha demostrado ser relevante en multitud de funciones en eosinófilos y su disfunción se asocia a alteraciones en los procesos inflamatorios [184]. ORMDL3 colocaliza con STIM1 tanto en reposo como tras el vaciamiento del retículo, siendo capaz de ejercer, a través de su extremo N terminal, una influencia inhibitoria sobre la corriente I_{CRAC} de forma dependiente a la $[Ca^{2+}]$ citosólica [185].

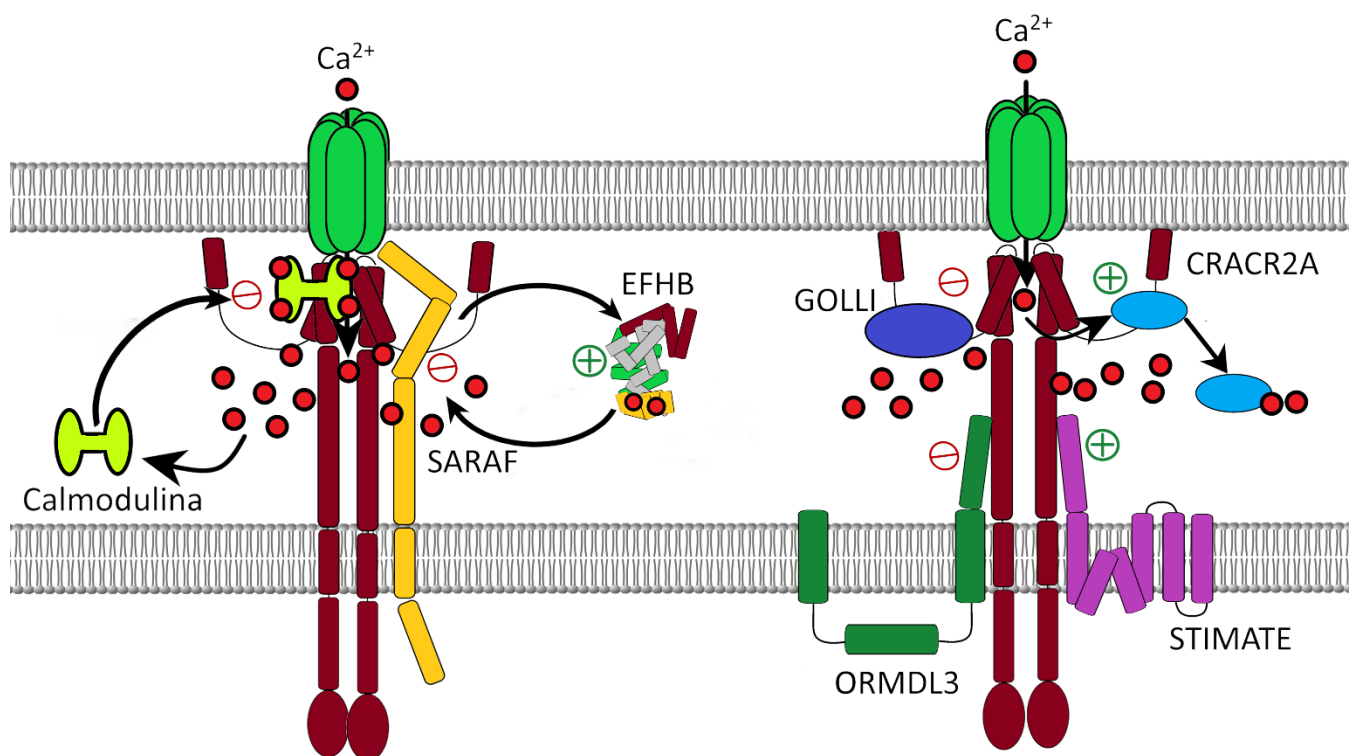


Figura 10. Modelo esquemático de los principales agentes implicados en la regulación de la ECC.

Por el contrario, otras proteínas participan en el mecanismo de entrada capacitativa desempeñando funciones auxiliares. CRACR2A es una proteína citoplasmática de 45 kDa que presenta 2 dominios EF-hand en su extremo amino. CRACR2A es capaz de interactuar tanto con STIM1, uniéndose a los dominios CC y la secuencia rica en serina/prolina, como con Orai1, asociación que involucra la secuencia situada entre los aminoácidos 64 y 93 de Orai1 [186]. Gracias a los dominios EF-hand, CRACR2A es capaz de detectar la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica y promover la asociación entre STIM1 y Orai1 al detectar concentraciones bajas de este ion. Por el contrario, al alcanzarse $[\text{Ca}^{2+}]$ elevadas, CRACR2A se disocia del complejo STIM1-Orai1 e inhibe la entrada de Ca^{2+} al citosol [186]. TEMEM110 o STIMATE es una proteína localizada en la membrana del retículo, presentando una estructura caracterizada por sus múltiples dominios transmembrana y una secuencia polibásica cercana al extremo carboxilo [187]. STIMATE juega un papel crucial en la activación de STIM1 y en la formación de "puncta" tras el vaciamiento de los depósitos. Función que es mediada por la interacción del extremo carboxilo de STIMATE con el CC1 de STIM1, evento que promueve la disociación del enlace inhibitorio entre los dominios CC1 y SOAR de STIM1 y el cambio conformacional de la proteína [187].

2.2.3 Variantes e isoformas de las proteínas STIM y Orai:

Como hemos explicado, los primeros modelos sobre la activación de la ECC anteponían el rol de Orai1 y STIM1 sobre los demás miembros de ambas familias. Planteamiento que comenzó a ser cuestionado al comprobarse que la corriente mediada con la sobreexpresión de ambas proteínas era incapaz de imitar todas las propiedades de la corriente I_{CRAC} nativa [188]. Actualmente, tanto los estudios mecanísticos de la ECC como aquellos que analizan su implicación en la fisiología y fisiopatología celular contemplan que este proceso de señalización es orquestado por la colaboración de todos los miembros de ambas familias. En los modelos actuales, la adaptación de las características de la ECC a los requerimientos celulares se alcanza a través del control de la expresión de las diferentes variantes de STIM y Orai. Este proceso de ajuste se potencia en ciertas ocasiones con la producción de variantes alternativas de las proteínas canónicas, habiéndose descrito hasta la fecha variantes de las proteínas STIM1, STIM2 y Orai1.

Gracias a procesos de splicing alternativo se ha descrito la producción de tres isoformas adicionales de STIM1. Estas variantes responden con sus nuevas características a los requerimientos específicos de los tejidos donde se generan. STIM1L es la variante más larga (115 kDa), resultado de la incorporación de 318 pares de bases entre los exones 11 y 12. STIM1L se expresa en el músculo esquelético y cardíaco, sistema nervioso central, pulmones, hígado y bazo [189]. A diferencia de la variante canónica, STIM1L se encuentra permanentemente localizado próximo a la membrana plasmática, aspecto que explica la rápida activación de la entrada capacitativa en los tejidos que generan esta isoforma. Una característica peculiar en lo que concierne a esta variante es que aunque las “puncta” formadas por STIM1L son sensiblemente más pequeñas que las desarrolladas por STIM1, la ECC mediada por la variante larga es un 20% mayor [190]. Divergencia que es explicada debido a la mayor eficiencia de STIM1L para activar los canales TRPC1, canales que se caracterizan por una mayor conductividad respecto los formados por Orai1 [191]. En el año 2020 Knapp y colaboradores describieron un isoforma de STIM1 denominada STIM1A. Esta nueva variante alberga un exón adicional situado entre los exones 10 y 11, añadiendo, tras la región SOAR, 31 aminoácidos en la secuencia de STIM1 [192]. Estos autores registraron una expresión prominente del ARNm de STIM1A en testículos, astrocitos, riñones y corazón.

En los testículos, la inclusión del dominio A determina la localización de esta isoforma en regiones de recuperación de la membrana plasmática conocidas como complejos tubulobulbales. Funcionalmente, STIM1A ejerce un efecto negativo sobre la ECC y la corriente I_{CRAC} , a pesar de ser capaz de agruparse e interactuar con los canales Orai. Esta influencia negativa estaría motivada por la incapacidad de esta isoforma para estabilizar la interacción entre el dominio SOAR y el dominio ETON del extremo amino de Orai1, evento que se considera crucial para la activación del canal Orai1. Kanpp *et al.* explican esta diferencia en la funcionalidad debido a una región localizada en el exón A, el cual recibe el nombre de los aminoácidos que los constituyen: PSD (500-F-S-D-504). Conclusión que fue respaldada tras recuperar la funcionalidad de esta isoforma gracias a la mutación de los residuos de serina o ácido aspártico, del segmento PSD, por residuos de alanina [192]. Este mismo año se ha identificado una nueva isoforma de STIM1, formada tras la introducción de un exón 13 alternativo que da lugar a la producción de una proteína más corta de STIM1. Dentro de su secuencia, los últimos 170 aminoácidos canónicos son eliminados y sustituidos por un dominio alternativo, denominado B, el cual está conformado por 26 aminoácidos y otorga nombre a la nueva isoforma: STIM1B [193]. STIM1B se expresa abundantemente en el sistema nervioso central, localizándose en las estructuras reticulares presinápticas donde interviene en el relleno de las vesículas sinápticas. La funcionalidad de STIM1B muestra ciertas diferencias con respecto a STIM1, presentando una menor velocidad en la translocación a las zonas de contacto entre membrana y retículo, la formación de punta de menor tamaño, y una activación más lenta de los canales Orai [193].

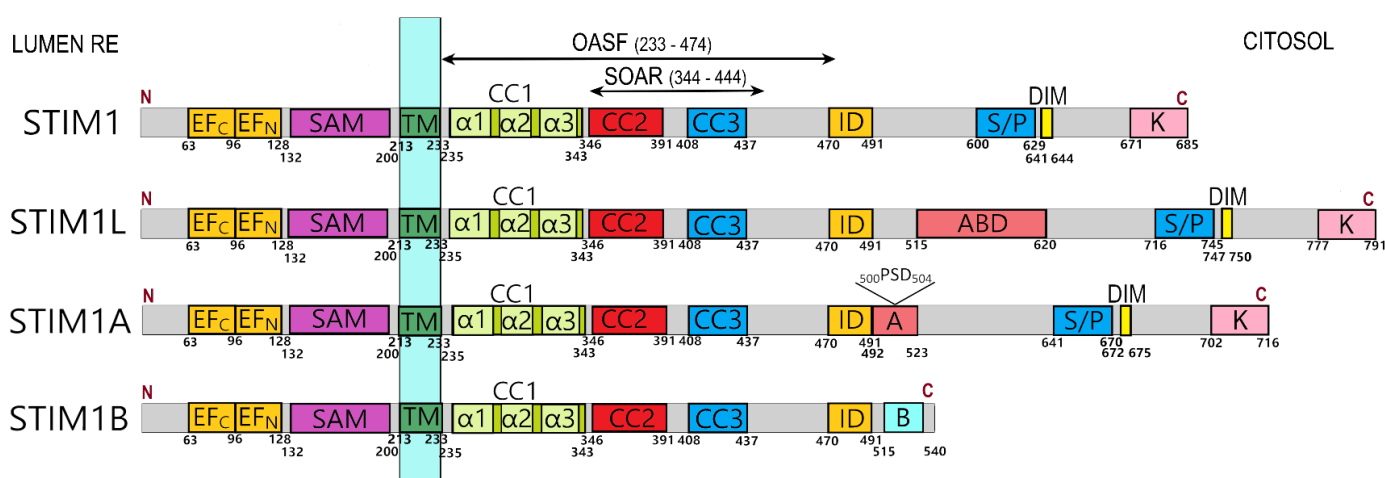


Figura 11. Representación esquemática de la estructura lineal de las isoformas de STIM1.

El gen humano *STIM2* está formado por 14 exones, los cuales gracias a procesos de splicing alternativo dan lugar a tres variantes de esta proteína [194], [195]. Stim2.2 (*STIM2* α) fue la primera variante caracterizada, y aunque presenta una gran similitud con *STIM1*, sus diferencias estructurales favorecen una clara distinción funcional. El dominio EF-SAM de *STIM2.2* muestra menor afinidad para el Ca^{2+} que el EF-SAM de *STIM1*; como consecuencia, *STIM2.2* es capaz de detectar vaciamientos del retículo más discretos que los detectados por *STIM1* [196]. Esta diferencia determina que, en estado de reposo, *STIM2.2* se localice en las zonas de aproximación entre membrana y retículo, induciendo pequeñas entradas de Ca^{2+} desde el medio extracelular. Esta acción basal mantiene la $[\text{Ca}^{2+}]$ reticular y citosólica en valores óptimos y evita la activación de *STIM1*, evento que solo se producirá cuando la $[\text{Ca}^{2+}]$ reticular descienda hasta valores cercanos a los 200 μM , desencadenando una entrada capacitativa mucho mayor pero transitoria [197]. Otra diferencia la encontramos en el dominio SOAR de *STIM2.2*, el cual alberga variaciones de algunos residuos en comparación con la secuencia de *STIM1*. Estas modificaciones determinan una unión más débil a los canales *Orai1* y una menor capacidad para activarlos [198], [199]. Además de su función protectora, *STIM2.2* es un agente adaptador en los procesos de señalización. Al ser capaz de heteromerizar con *STIM1*, *STIM2* aumenta su sensibilidad confiriéndole nuevos roles en los procesos de comunicación, proceso que se hace más evidente bajo estímulos celulares moderados, que únicamente determinan la activación de *STIM2* [200].

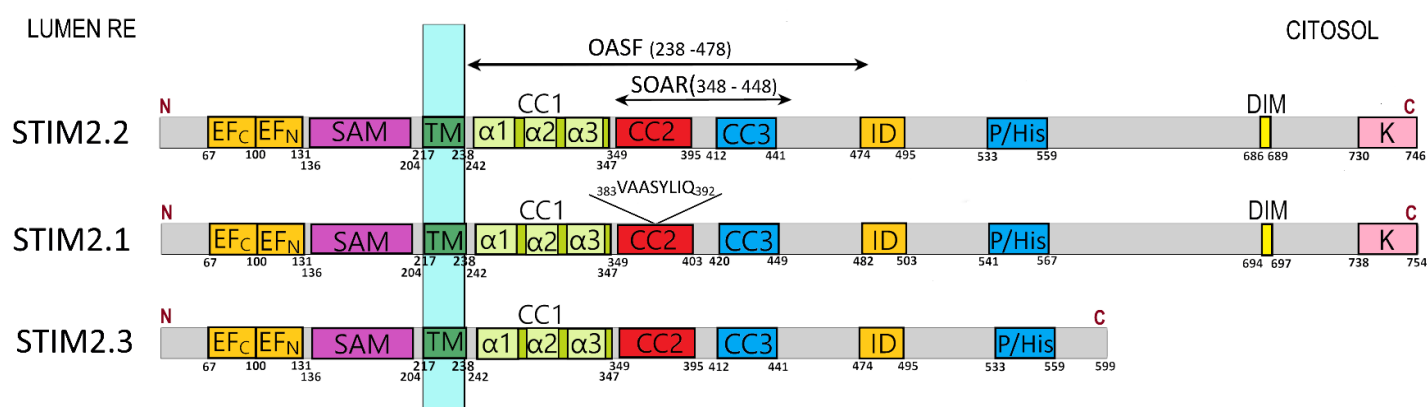


Figura 12. Representación esquemática de la estructura lineal de las isoformas de *STIM2*.

Como se ha introducido previamente, los procesos de splicing alternativo del gen *STIM2* dan lugar a otras dos isoformas: *STIM2.1* (*STIM2* β) y *STIM2.3*. *STIM2.1* se caracteriza por la inclusión de un exón 9 adicional, el cual inserta una pequeña secuencia de aminoácidos

dentro del dominio CC2 del segmento SOAR (₃₈₃VAASYLIQ₃₉₂). Esta secuencia inhabilita a STIM2.1 para interactuar y activar los canales Orai, estableciéndose como un dominante negativo capaz de asociarse a STIM1 y STIM2.2 e inhibir la activación de los canales Orai por los mismos [195]. Por último, una tercera isoforma de STIM2, denominada STIM2.3, sería el resultado de la inclusión de un exón 13 alternativo. Este proceso genera una proteína con un extremo carboxilo 148 aminoácidos más corto cuya función no ha sido identificada aun [195].

En mamíferos coexisten dos variantes de Orai1, las cuales son generadas tras el inicio alternativo en el proceso de traducción del ARN mensajero. Orai1 β es la isoforma expresada en todos los vertebrados, presentando un extremo N terminal corto; por el contrario, Orai1 α , la variante clásica de 301 aminoácidos, es una isoforma genuina de mamíferos que alberga una secuencia adicional de 63 aminoácidos en el extremo amino terminal [201]. Orai1 β se origina por un inicio alternativo de la traducción en la metionina 64, o incluso la metionina 71, por lo que carece los primeros aminoácidos de la secuencia de Orai1 α [201]. Dentro de la secuencia adicional de Orai1 α se han identificado multitud de dominios capaces de conferir a esta isoforma funciones ausentes en Orai1 β . Willoughby *et al.* identificaron a la secuencia comprendida entre los aminoácidos 26-34 de Orai1 α como el segmento capaz de interactuar con AC8 [170]. Esta diferencia implica que solo la isoforma larga es capaz de activar AC8 y aumentar las concentraciones de AMP_c, sugiriendo que Orai1 α podría controlar la expresión de genes dependientes de factores de transcripción sensibles a AMP_c, como por ejemplo los genes controlados por CREB [202]. De forma paralela, solo Orai1 α es objeto de la inhibición mediada por PKA y PKC, las cuales participan en los procesos de inhibición de la corriente I_{CRAC} a través de la fosforilación de los residuos S34 o S27 y S30, respectivamente [171], [203], [204]. Coincidiendo con este segmento, se ha identificado un posible dominio de unión a PIP₂ (aminoácidos 28-33), aunque su funcionalidad no ha sido descrita aún. Cerca de la metionina que da comienzo a la secuencia de Orai1 β se localiza un sitio de unión a caveolina (aminoácidos 52-60), región que ha sido implicada en los procesos de internalización de Orai1 α durante la meiosis [205]. Funcionalmente se observan diferencias claras entre ambas isoformas, siendo Orai1 β capaz de mediar una entrada capacitativa ligeramente mayor [206]. Divergencia que podría ser justificada debido a los sistemas inhibitorios que se apoyan en el extremo amino de Orai1 α y

por tanto están ausentes en Orai1 β . Adicionalmente, ambas isoformas presentan también diferencias en la movilidad a través de la membrana, siendo la velocidad de desplazamiento de Orai1 α menor que la de Orai1 β . Se ha sugerido que esta diferencia podría ser causada por la mayor capacidad de Orai1 α para asociarse a los componentes de la membrana [201]. Zhang *et al.* fueron los primeros en proponer un rol diferencial en los procesos de señalización celular para Orai1 α y Orai1 β . Este grupo demostró la capacidad de ambas isoformas para activar el factor de transcripción dependiente de Ca²⁺ NFAT1, el cual requiere de elevaciones robustas en la [Ca²⁺] en el microdominio del poro. Sin embargo, NFAT4 es comúnmente activado por concentraciones bajas de agonistas, siendo dependiente del incremento en la [Ca²⁺] tanto en el nanodominio del poro como en el núcleo. Este mecanismo de señalización difiere del de NFAT1 y necesita de un perfil diferente en la señal de Ca²⁺, habiendo sido descrito como Orai1 β media de forma preferente la activación de este factor de transcripción [171]. Recientemente, Kar *et al.* han profundizado aún más en el mecanismo de activación de NFAT1, concluyendo que este es solo activado por Orai1 α . Estos autores proponen un modelo donde tras el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca²⁺, Orai1 α interacciona con AKAP79 a través de un segmento localizado entre los aminoácidos 39 y 59. AKAP79 sería responsable de aproximar al microdominio de Orai1 α a NFAT1 y a la fosfatasa calcineurina, la cual es activada y defosforila NFAT1 tras la entrada de calcio por el poro [207]. Este enlace entre NFAT1 y calcineurina parece prorrogarse hasta que se localizan en el núcleo [208], protegiendo al NFAT1 defosforilado de las cinasas citosólicas y nucleares, e impidiendo la defosforilación de las moléculas de NFAT1 localizadas fuera de la influencia de los macrocomplejos anexos a los canales Orai1.

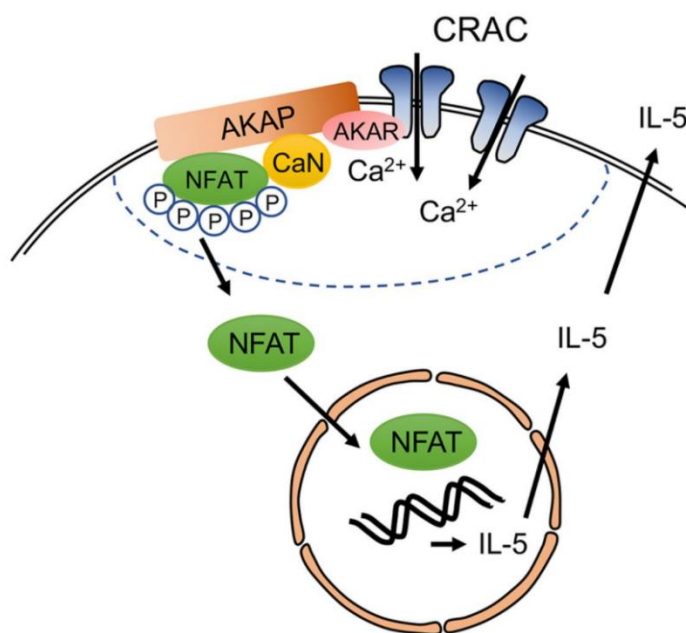


Figura 13. Modelo de activación de NFAT1 por Orai1 α . Modelo donde se describe la aproximación de NFAT1 al canal de membrana a través de la interacción de la proteína AKAP79 con la región localizada en el extremo amino de Orai1 α : AKAR [207].

La familia de proteínas Orai está compuesta por tres miembros (Orai1, Orai2 y Orai3), los cuales fueron identificados de forma simultánea [128]. Desde su caracterización, Orai1 ha acaparado la mayoría de los esfuerzos destinados a desvelar la función de estas proteínas, desplazando a sus homólogos del centro de atención y ocultando el más que probable papel de las tres isoformas en los canales CRAC nativos. El Orai1 de mamíferos es el homólogo más cercano al dOrai descrito en invertebrados; acompañando el salto a vertebrados, encontramos la aparición de Orai2, mientras que Orai3 se generó en mamíferos a partir de la duplicación del gen Orai1 [209]. La secuencia de los tres miembros de la familia Orai es bastante similar, siendo los segmentos transmembrana las zonas que muestran una mayor conservación. De forma singular, Orai3 presenta una extensión citosólica del segmento transmembrana 2 en comparación con Orai1, resultando en un loop intracelular de menor tamaño [210]. Son los extremos amino, y más evidentemente, los carboxilos los que muestran un alto nivel de heterogeneidad, contribuyendo a las propiedades farmacológicas de cada isoforma de Orai. Recientemente se ha descrito el efecto potenciador de la molécula IA65 sobre Orai1, la cual parece no tener ningún efecto sobre otras isoformas de Orai [211]. El compuesto 2-aminoetilfenilo borato (2-APB) bloquea a altas concentraciones la corriente mediada por Orai1 y Orai2, mientras que produce un efecto potenciador de

Orai3 de forma independiente a los depósitos reticulares [212]–[215]. Funcionalmente, las tres isoformas de Orai son capaces de mediar corrientes I_{CRAC} , sin embargo, Orai1 muestra una mayor conductividad que Orai2 y Orai3, siendo las corrientes mediadas por los últimos de un valor aproximado del 50% y 20% de la corriente de Orai1 respectivamente [216], [217]. Estas diferencias en el valor de la corriente pueden explicarse debido a la sensibilidad de las tres isoformas para los procesos de inhibición dependientes de Ca^{2+} . Con respecto a la FCDI Orai3 es la subunidad que muestra una mayor inhibición, seguido de Orai2 y Orai1 consecutivamente; sin embargo, solo Orai1 es sensible a los procesos de SCDI y el único canal en el que se ha detectado el proceso de reactivación tras la FCDI [216], [217]. En los últimos 5 años multitud de esfuerzos han descrito la interacción de las diferentes isoformas de Orai, dando lugar a la formación de canales CRAC nativos en forma de heterohexameros [218]–[220]. Esta asociación se desarrolla en estado basal y se presenta insensible al vaciamiento de los depósitos reticulares. La combinación de los tres homólogos de Orai favorece la regulación negativa del canal CRAC por parte de las unidades Orai2 y Orai3 que lo conforman, mostrando el primero una mayor eficacia al inhibir la corriente [218]. El modelo más novedoso sobre la estructura de los canales CRAC propone que esta actividad inhibitoria está involucrada en la regulación negativa del canal y el diseño de las señales nativas de Ca^{2+} .

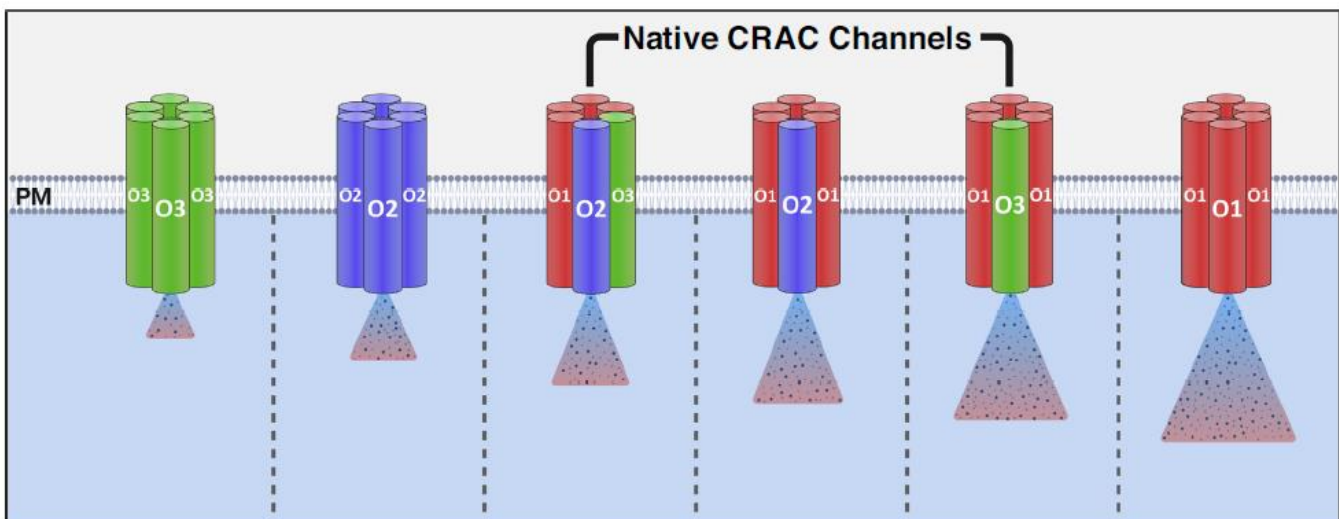


Figura 14. Modelo esquemático de la anatomía de los canales CRAC nativos y su conductividad [402].

En este modelo, Orai1 es responsable de las elevaciones sostenidas de la $[Ca^{2+}]$, mientras que Orai2 y Orai3 contribuirían a la formación de señales en forma de picos y oscilaciones.

Esta especialización podría estar apoyada por el hecho de que STIM1 interacciona con Orai2 y Orai3 de forma constitutiva, promoviendo una mayor sensibilidad de estos homólogos a los procesos de FCDI. Además, el complejo preformado por STIM1-Orai2/3 sería activado y desactivado rápidamente ajustándose a los requerimientos de las señales pulsátiles. Paralelamente, estudios desarrollados en líneas celulares muy concretas proponen el rol predominante de Orai2 y Orai3 en la entrada capacitativa, al ser estos homólogos expresados en mayor medida que Orai1. Las primeras evidencias del papel de Orai3 en SOCE fueron descritas en células de cáncer de mama ER+. En estas células, el receptor de estrógenos α media los procesos tumorales induciendo la sobreexpresión de Orai3 y su intervención en los mecanismos de señalización [221]. De forma similar, en el tejido neuronal Orai2 y STIM2 parecen ser los mediadores de los procesos de señalización asociados a los depósitos de Ca^{2+} , mostrándose estas células carentes de otros miembros de la familia Orai y siendo insensibles al arresto de la expresión del tándem STIM1-Orai1 [222], [223].

2.2.4 TRPC1 y las corrientes capacitativas SOC:

Poco tiempo después de ser identificados en 1995 [224], [225], los canales TRPCs fueron propuestos como canales capacitativos. Estas proteínas pertenecen a una extensa familia de canales de membrana denominada TRP, que abarca a su vez seis subfamilias. La subfamilia TRPC debe su nombre a ser los primeros homólogos de los canales TRPs de *Drosophila* identificados en humanos (canónicos), habiéndose descrito 7 variantes dentro de esta familia (TRPC1-TRPC7). En conjunto los TRPs presentan una estructura muy conservada, donde el canal se compone a través de la asociación de cuatro unidades, compuestas cada una por seis hélices transmembrana. Esta configuración localiza tanto el extremo carboxilo como amino de cada subunidad en la región citosólica, siendo el poro del canal formado por la agrupación del quinto y sexto dominio transmembrana. Dentro del segmento N terminal, los miembros de la subfamilia TRPC presentan cuatro dominios de ankirina y un dominio CC, necesarios para la asociación con otros TRPCs y la formación del canal [226], [227]. Algunos miembros de la subfamilia TRPC, como TRPC1, albergan también en el extremo amino un dominio de unión a caveolina 1, el cual permite regular la interacción con otras proteínas y lípidos de membrana [228]. En el extremo C terminal, los TRPC presentan una secuencia altamente conservada (EWKFAR) involucrada en los procesos de activación del canal.

Además, un dominio rico en prolina [229] habilita la interacción con la proteína FKBP52, una inmunofilina que participa en los procesos de plegado y tráfico de proteínas. Consecutivamente, un dominio de unión a CaM e IP₃R modulará la activación de los TRPCs en función de la [Ca²⁺] citosólica [230], [231]. Por último, uno o dos segmentos CC (dependiendo de la variante estudiada) completan el extremo C terminal, región a la que se unirán STIM1 y CaM con el objetivo de desarrollar los procesos de activación e inhibición del canal, [176], [232]. Los canales TRPC muestran una selectividad para el Ca²⁺ variable. Para poder categorizar los diferentes grados de selectividad es común realizar una comparación entre los cocientes de permeabilidad Ca²⁺/Na⁺ de cada variante. Los canales TRPC5 y TRPC6 son los más selectivos para Ca²⁺, mostrando ratios de permeabilidad Ca²⁺/Na⁺ cercanos a 9 y 5, respectivamente. Por el contrario, TRPC1 y TRPC4 son las variantes que presentan un menor ratio siendo igualmente selectivos para Ca²⁺ y Na⁺ [100].

Previo a la inclusión de las proteínas STIM y Orai en los modelos de entrada capacitativa, dos trabajos propusieron el papel de TRPC1 como canal dependiente de los depósitos intracelulares de Ca²⁺ [233], [234]. Tras este hito inicial, la función de TRPC1 en la ECC fue confirmada en un amplio número de tipos celulares diferentes [235], [236]. Sin embargo, dos argumentos generaban una gran incertidumbre sobre el papel de los canales TRPC en este mecanismo de señalización: la corriente mediada por los canales TRPC en general, y TRPC1 en particular, no reflejaba las características de la corriente I_{CRAC}, la cual había sido caracterizada previamente en mastocitos; además, la sobreexpresión de variantes de esta subfamilia, como TRPC3, sugería la participación de estos canales en mecanismos de señalización de Ca²⁺ dependientes de la PLC e insensibles a los depósitos reticulares. Actualmente, tras un número extenso de artículos que describen la función de las proteínas STIM, Orai y TRPC, se considera que no existe una homogeneidad en los procesos de entrada capacitativa entre los diferentes tipos celulares, y por tanto, además de la corriente canónica I_{CRAC} se aceptan como capacitativas otras corrientes con características biofísicas diferentes, las cuales se agrupan bajo la terminología I_{SOC} [237].

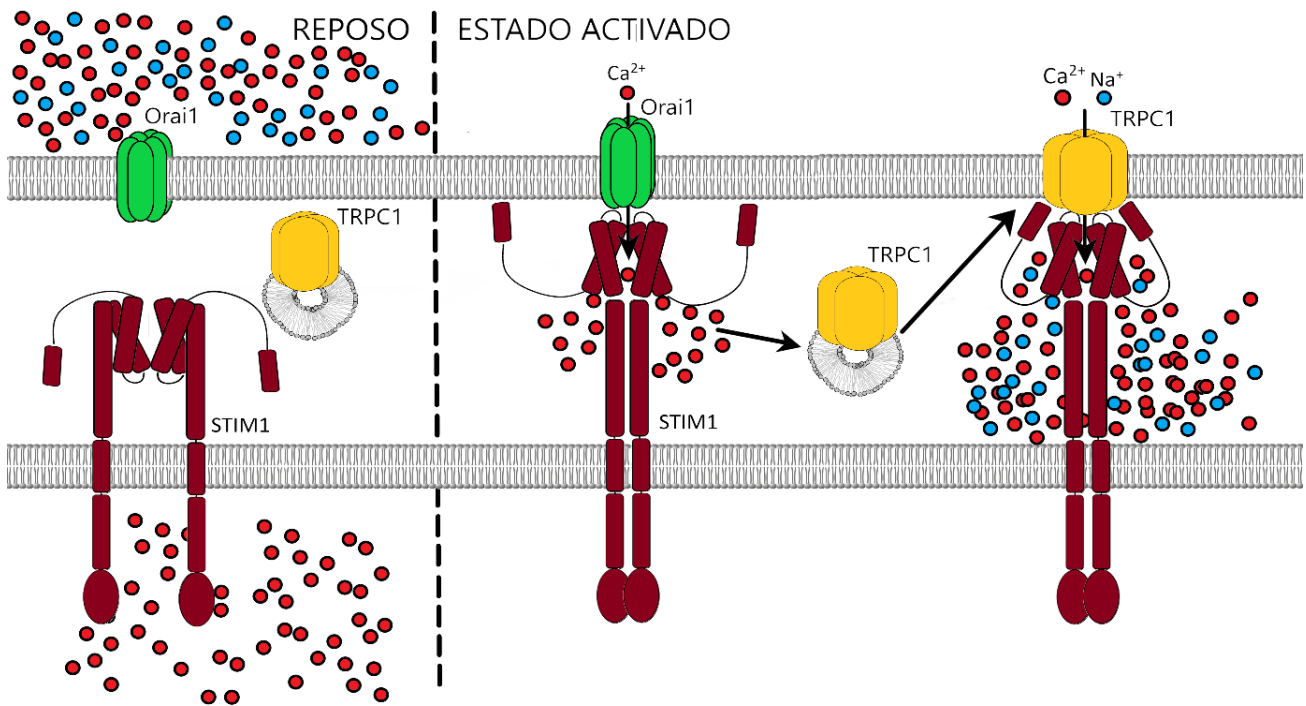


Figura 15. Modelo esquemático de la translocación y activación de TRPC1 tras la apertura de Orai1.

Una vez abierto el abanico de posibilidades dentro del mecanismo de ECC, multitud de autores han propuesto al complejo STIM1-Orai1-TRPC1 como responsable de la corriente I_{SOC} [238]–[241]. El modelo propuesto por Ong *et al.* establece la colocalización de TRPC1 y Orai1 en la membrana plasmática durante el reposo, siendo ambos canales activados por STIM1 tras el vaciamiento de los depósitos [240]. En apartados anteriores hemos descrito como el segmento SOAR de STIM1 desencadena la apertura de los canales Orai al contactar con el segmento carboxilo de las subunidades del canal. La interacción entre STIM1 y TRPC1 también es mediada por este fragmento de STIM1, que por sí solo no es suficiente para provocar la apertura del canal. Este proceso requiere también de la interacción entre el dominio rico en lisina del extremo C terminal de STIM1, cargados positivamente, y los aspartatos del extremo C terminal de TRPC1, cargados de forma negativa. Chen *et al.* propusieron años después un modelo alternativo, por el cual la entrada de Ca^{2+} por Orai1 induce la translocación de TRPC1 a las proximidades del complejo STIM1-Orai1, habilitando su interacción con STIM1 y la posterior apertura del poro [123].

Aparte de sus diferencias en las características biofísicas, las corrientes I_{CRAC} e I_{SOC} también muestran cierta heterogeneidad con respecto los procesos celulares asociados. Si la

corriente mediada por los canales CRAC es necesaria para la activación y translocación del NFAT al núcleo, la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B) se ha asociado a las señales producidas por los canales formados por TRPC1. Otros eventos celulares, como la agregación plaquetaria, secreción de insulina, diferenciación de adipocitos o secreción de adiponectina, también se han descrito como dependientes de la entrada de Ca^{2+} inducida por el complejo STIM1-Orai1-TRPC [242]–[245].

Además de formar parte del mismo sistema de señalización, se ha propuesto que la relación funcional entre los canales Orai y TRPC puede incluir sistemas de regulación mutua. Dos son las hipótesis que establecen la capacidad de los canales TRPC1 para modular la entrada de Ca^{2+} a través de los canales Orai:

1. Al permitir la entrada de Ca^{2+} en el mismo microambiente celular, TRPC1 podría promover los procesos de inactivación de los canales CRAC dependientes de Ca^{2+} .
2. Al mediar una corriente mucho mayor, los canales TRPC1 incrementarían la cantidad de Ca^{2+} disponible para SERCA, optimizando el relleno de los depósitos y promoviendo la inactivación de Orai [165], [166].

Paralelamente, también se ha propuesto que la corriente mediada por los canales TRPC, que presenta una conductividad mayor, produciría la despolarización de la membrana y atenuaría el gradiente de entrada para el Ca^{2+} a través de los canales Orai [246], [247].

2.3 Fisiología plaquetaria y el Ca^{2+} como mediador de la agregación plaquetaria:

Las plaquetas son los elementos formes de la sangre responsables de la formación de coágulos y por tanto una parte esencial en la defensa contra el sangrado. En el torrente sanguíneo humano circulan alrededor de 1 trillón de plaquetas, constituyendo uno de los elementos formes de la sangre junto a leucocitos y eritrocitos. Fueron inicialmente descritas por Max Shultze en 1865, aunque su papel en la coagulación fue identificado en 1881 por Giulio Bizzozero, patólogo italiano que demostró *in vivo* la capacidad de las plaquetas para adherirse a las paredes de los vasos sanguíneos lesionados, iniciando el proceso de trombosis. Años después, Eberth y Schimmelbusch observaron los cambios morfológicos que sufren las plaquetas en los vasos dañados y como la estasis del flujo va seguida por la acumulación de estos elementos en la pared del vaso, trabajos que son la base de nuestro conocimiento actual sobre la hemostasia.

Las plaquetas poseen un diámetro aproximado de 0,5 μm , con forma de disco biconvexo y anucleadas [248]. Aunque carezcan de ADN genómico, contienen ARN mensajero derivado de las células progenitoras, información que permite la síntesis de proteínas. La concentración normal de las plaquetas en la sangre es de 1,5 a 3,5 $\times 10^8$ plaquetas/mL, siendo su vida media de 8 a 11 días [249]. Al término de este periodo, las plaquetas entran en un proceso de senescencia y los macrófagos presentes en el sistema retículo histocitario del bazo, hígado y médula ósea las eliminan [250].

2.3.1 Desarrollo plaquetario:

Las plaquetas se originan a partir de la fragmentación citoplasmática de los megacariocitos de la médula ósea en un proceso conocido como trombopoyesis. La formación de plaquetas puede dividirse en dos fases arbitrarias. La primera etapa, desarrollada durante varios días, engloba la maduración y desarrollo de los megacariocitos y requiere de la intervención de factores de crecimiento específicos. En la segunda fase tendrá lugar la formación plaquetaria gracias a la reorganización del citoplasma, siendo necesaria la transición por dos estadios inmaduros para concluir el proceso: proplaquetas y preplaquetas [251].

El desarrollo megacarioblástico y la formación de plaquetas son procesos complejos que están regulados a multitud de niveles por diferentes citocinas, aunque la trombopoyetina es

considerada el regulador principal de este proceso [252], [253]. Tras la estimulación de las células madre hematopoyéticas por la trombopoyetina, evento que en adultos tiene lugar en la médula ósea, estas células pluripotenciales se diferenciarán en megacariocitos gracias a la actividad de diversos factores de transcripción. Tras este proceso, la maduración megacariocítica se caracteriza por una fase proliferativa inicial y por el posterior aumento del tamaño celular y ploidía, estado que es alcanzado gracias a un proceso de endomitosis [254]. Esta acumulación de material genético ha sido propuesta como un evento necesario para garantizar la producción y empaquetamiento del ARN mensajero, proteínas y estructuras celulares que constituirán las plaquetas, evitando el estrés originado por la mitosis y citocinesis [254]. Dentro de las estructuras generadas gracias al proceso de endomitosis destaca un extenso sistema de membranas internas que conectan de forma directa con la membrana plasmática de los megacariocitos y apoyará la formación de plaquetas en etapas posteriores [255]. Al alcanzar la madurez, los megacariocitos viajan hasta el nicho vascular de los capilares sinusoides donde ramificaciones de la membrana plasmática invaginan hacia el interior de los vasos, lugar donde estas invaginaciones terminarán desprendiéndose gracias a las fuerzas de cizalla producidas por el flujo [256]. Las estructuras resultantes, denominadas proplaquetas, presentan una forma caracterizada por dos extremos lobulares interconectados por un puente membranoso [257]. Debido a que se trata de un cambio morfológico, la reorganización del citoesqueleto de los megacariocitos es fundamental en la formación de las proplaquetas, proceso que es mediado por la actividad de la tubulina- β 1 y la miosina II [258]–[260]. La reorganización del citoesqueleto es también necesaria para el transporte de gránulos y vesículas hacia los procesos que formarán las proplaquetas, habiéndose propuesto la existencia de diferentes poblaciones de plaquetas dependiendo del contenido de estos elementos [257]. Ya en el torrente sanguíneo, las proplaquetas continuarán con el proceso de maduración generando preplaquetas, transición que es bidireccional y que está definida por la continua repartición del contenido celular [261], [262]. Finalmente, las preplaquetas se dividen gracias a las fuerzas de cizalla en los capilares pulmonares, donde estas fuerzas son de mayor magnitud, concluyendo la formación plaquetaria [263].

2.3.2 Función plaquetaria:

En condiciones fisiológicas las plaquetas fluyen continuamente sin interactuar con las paredes de los vasos sanguíneos. Sin embargo, al producirse un daño en el epitelio vascular, las plaquetas desencadenan una respuesta altamente regulada que abarca los procesos de adhesión a las estructuras endoteliales y subendoteliales, activación y agregación [264]. Estos pasos están íntimamente integrados y se desarrollan de forma simultánea en las diferentes unidades plaquetarias que se suman al proceso de hemostasis.

Adhesión: Fase que da comienzo cuando componentes de la matriz extracelular del endotelio vascular dañado, como el colágeno, fibronectina, laminina o Factor de Von Willebrand (FVW), contactan con las plaquetas circulantes. Este proceso se ha descrito de diferentes formas según las fuerzas de cizalla resultantes de la lesión, siendo más relevante la interacción inicial con el FVW cuanto mayor sean estas fuerzas [265], [266]. La interacción del receptor plaquetario GPIb-IX-V con el FVW tiene una ratio de disociación muy rápida, factor que provoca que las plaquetas “rueden” por la superficie reactiva en el sentido del flujo. Este movimiento favorece la ejecución de señales intracelulares que darán comienzo a la siguiente fase de la hemostasis y, adicionalmente, permite a las plaquetas estabilizar la adhesión a través de la intervención de las integrinas. Estas integrinas son glicoproteínas heterodiméricas formadas por la asociación de una subunidad α y una subunidad β , las cuales constituirán los receptores plaquetarios para fibrinógeno ($\alpha_{IIb}\beta_3$), vitronectina ($\alpha_V\beta_3$), colágeno ($\alpha_2\beta_1$), fibronectina ($\alpha_5\beta_1$) y laminina ($\alpha_6\beta_1$) [267], [268]. Al estabilizar la unión, las plaquetas experimentan un cambio conformacional caracterizado por la extensión de pseudópodos, reduciendo la resistencia al flujo y aumentando las posibilidades de reclutar otras células y detener la hemorragia [269].

Activación: Tras la adhesión, las plaquetas se activan rápidamente y comienzan el proceso de agregación. El colágeno es uno de los principales activadores plaquetarios, y es especialmente relevante al comienzo de la hemostasis, cuando las primeras plaquetas contactan con la superficie reactiva. Al unirse con la glicoproteína $\alpha_2\beta_1$, el colágeno desencadena la liberación de agonistas como el ADP y el tromboxano A_2 (TXA_2), agentes que mediarán la activación de las plaquetas circulantes en las proximidades del epitelio dañado. Los agonistas plaquetarios se unen a los receptores de membrana y estimulan la

transducción de señales, siendo mayoritaria la activación de receptores acoplados a proteína G y la participación tanto de PLC como PLA₂ en la cascada de señalización [270]. Dentro de los mecanismos derivados de la activación plaquetaria, la secreción de vesículas intracelulares es un evento que alimenta de forma positiva el proceso de activación. Los gránulos α y gránulos densos son las principales vesículas exocitadas, y en estas estructuras se almacenan multitud de productos capaces de estimular a las plaquetas circulantes y promover la reparación del epitelio vascular. Dentro de estas vesículas podemos destacar la presencia de cationes divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}), ADP, serotonina, TXA₂, epinefrina, fibrinógeno, FVW, factores IV, V, XI y XIII, factores de crecimiento derivados de plaquetas, factores de coagulación V y VIII, además de receptores de adhesión entre otros productos. El ion Ca^{2+} juega un papel vital en el proceso de hemostasis, ya que, a excepción de la epinefrina, todos los agonistas plaquetarios inducen la movilización del Ca^{2+} almacenado en el sistema tubular denso y la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular [270], [271].

- La activación plaquetaria por el ADP es mediada por la unión a dos tipos de receptores de membrana: P2Y₁ y P2Y₂. La activación de P2Y₁ desencadena el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica y la activación de la PKC. Paralelamente, la señal dependiente del receptor P2Y₂ disminuye la $[\text{AMPC}]$ en plaquetas, inhibiendo la actividad de la PKA [270], [272].
- La trombina, el agonista plaquetario más efectivo, es sintetizada gracias al procesamiento de la protrombina por el factor V. Este evento tiene lugar tras la activación plaquetaria y la reorganización de los fosfolípidos de membrana en la cara extracelular de la misma [273]. La cascada de señalización dependiente de la trombina es mediada por dos receptores con capacidad proteasa (PAR-1 y PAR-4) y, al igual que se ha descrito tras la estimulación con ADP, la trombina induce un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica y la disminución de la $[\text{AMPC}]$ [272], [274], [275].
- El TXA₂ es un potente agonista plaquetario producido a partir del ácido araquidónico por la acción de la ciclooxigenasa-1. La actividad de este metabolito promueve el “*feedback*” positivo de activación de forma similar al ADP, siendo su efectividad como agonista limitada por su corta semivida [270]. Al contactar con la membrana de las plaquetas, el TXA₂ desencadena el proceso de activación a través de un receptor específico. Dos variantes de este receptor, generadas a gracias a un proceso de splicing alternativo han sido descritas en plaquetas humanas (TP α y TP β) [276],

[277]. Además, el TXA₂ presenta capacidad vasoconstrictora, lo que favorece la formación del trombo tras la reducción del flujo sanguíneo.

- Otros productos de secreción plaquetaria, como la epinefrina, conducen la activación plaquetaria sin mediar un cambio conformacional. Tras la estimulación plaquetaria por este agonista, se promueve la formación del TXA₂ así como su secreción junto a otros elementos [278]. Paralelamente, se ha propuesto la capacidad de la epinefrina para potenciar la acción de otros agonistas plaquetarios tras unirse a su receptor adrenérgico α_{2A} [279].
- La serotonina es un potente vasoconstrictor que, tras ser secretado amplifica la respuesta plaquetaria inducida por el ADP. Este efecto es desarrollado tras su unión a los receptores acoplados a proteína G 5HT_{2A}. Además, también se ha propuesto que la serotonina favorecería la hemostasis al retener proteínas procoagulantes, como el fibrinógeno, en la superficie plaquetaria [280].

Agregación: Proceso que consiste en la asociación de plaquetas activadas con el fin de formar un tapón hemostático. Dentro de los agentes involucrados en este proceso destaca la función de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. En reposo, este receptor se encuentra en la superficie plaquetaria de forma inactiva, estando bloqueada la unión a su ligando [281]. Tras la activación plaquetaria, esta integrina sufre un cambio conformacional que permite su interacción con el fibrinógeno, el FVW y otras moléculas que contienen la secuencia arginina-glicina-aspartato [265]. La unión del FVW a este receptor promueve la asociación del mismo con el fibrinógeno, proceso que es necesario para estabilizar la interacción plaqueta-plaqueta y desencadenar las señales responsables de mediar la agregación irreversible entre las mismas [266], [272]. Por tanto, el proceso de agregación, que es caracterizado por la unión entre plaquetas y el cambio morfológico de las mismas, es considerado una respuesta bifásica. Una primera etapa, definida como un estado de asociación reversible, es seguida de una fase donde las plaquetas secretan el contenido de sus gránulos y los mecanismos de interacción cobran un carácter irreversible [278].

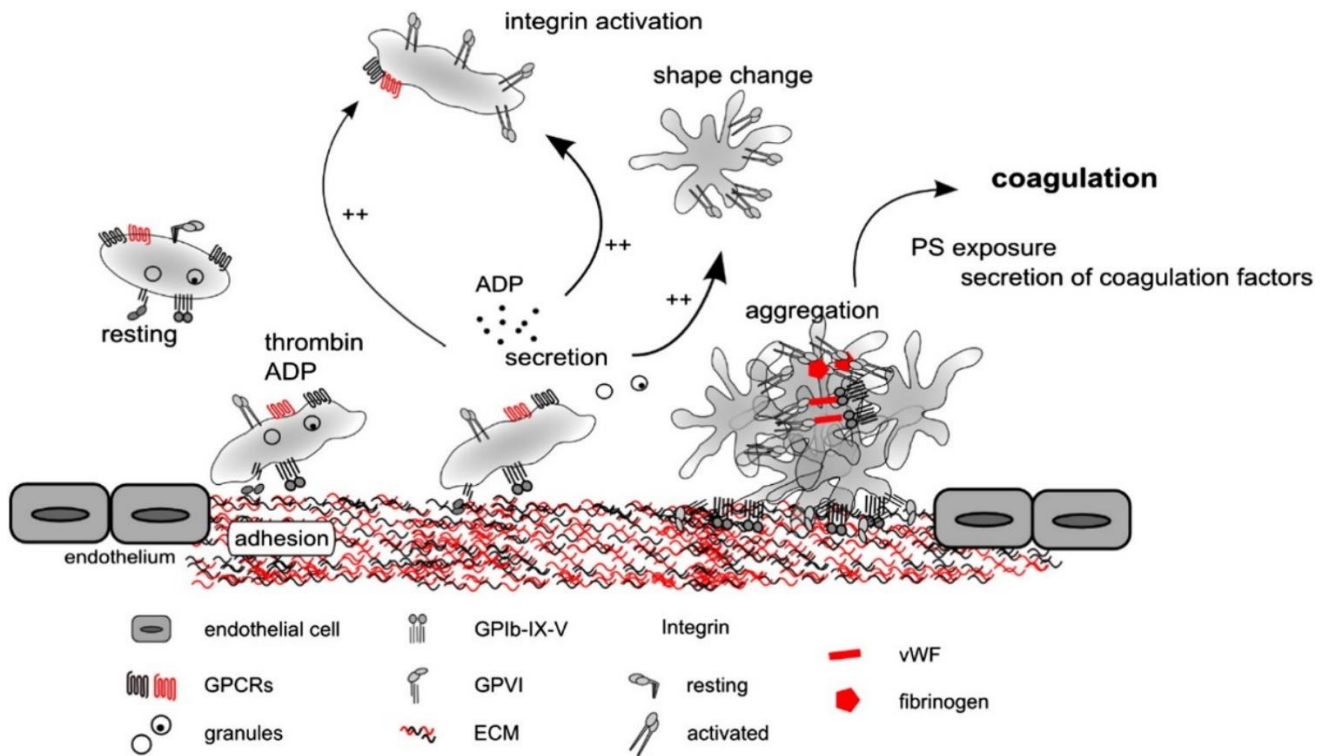


Figura 16. Modelo esquemático del proceso de activación plaquetaria y la formación del trombo [282].

2.3.3 Papel del Ca^{2+} en la activación plaquetaria:

Dentro de la fisiología plaquetaria, los mecanismos de señalización basados en el ion Ca^{2+} tienen una importancia crucial, destacando su intervención en los mecanismos de activación, secreción y agregación [116]. Las señales de Ca^{2+} involucradas en los procesos de activación plaquetaria son inducidas por la acción de los agonistas anteriormente descritos; estos agonistas determinarán el aumento de la $[Ca^{2+}]$ citoplasmática a través de la liberación de los depósitos intracelulares o facilitando la entrada desde el medio extracelular. En plaquetas, el sistema tubular denso es el mayor depósito intracelular de calcio, siendo la isoforma SERCA2b la responsable del llenado del mismo [283], [284]. Paralelamente, los depósitos ácidos constituyen un acumulo auxiliar de Ca^{2+} , el cual es rellenado por la isoforma SERCA3 [285], [286]. Estos depósitos presentarán una funcionalidad complementaria y serán movilizados de forma diferencial dependiendo del agonista implicado. Tras la estimulación con ADP, únicamente el Ca^{2+} localizado en el sistema tubular denso será movilizado. Por el contrario, agonistas con mayor potencia, como la trombina, serán capaces de movilizar también los depósitos ácidos a través de la activación de los receptores PAR1 y PAR4 [287]. Simultáneamente, la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular también se ha descrito como necesaria para alcanzar una activación plaquetaria

completa. Dentro de los mecanismos de entrada de Ca^{2+} descritos en plaquetas es posible destacar la entrada a través del receptor P2_{X1} , la entrada de Ca^{2+} mediada por los segundos mensajeros, la entrada de Ca^{2+} dependiente de la PKC y la tirosina cinasa Src y la ECC [116], [288], [289], considerándose la última como el mecanismo principal.

Las primeras evidencias de la funcionalidad de la ECC en la fisiología plaquetaria fueron publicadas por Sage *et al.* en 1989. En este trabajo, la entrada de Ca^{2+} inducida por trombina fue analizada de forma indirecta a través del apagamiento de la sonda fura-2 por la entrada de Mn^{2+} [290]. Aunque la ECC había sido registrada en megacariocitos y no era descabellado suponer su presencia en plaquetas, la imposibilidad de realizar estudios electrofisiológicos en las mismas impuso una metodología alternativa para estudiar este mecanismo de señalización. [291]. En megacariocitos, la expresión de Orai1 y STIM1 es mediada por la actividad del NF-KB, que se encuentra sobreactivado en estas células debido a la influencia de la cinasa dependiente de suero y glucocorticoides [292]. Adicionalmente, los estudios basados en plaquetas de ratón carentes de STIM1 u Orai1 demuestran la funcionalidad de estas proteínas en la activación plaquetaria. En el primer caso, la ausencia de STIM1 ocasionó la inhibición tanto de la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares como de la ECC, repercutiendo de forma negativa en la capacidad para formar trombos. De forma similar, los procesos de ECC, la entrada de Ca^{2+} operada por receptor y la activación plaquetaria inducida por agonista se inhibieron en ausencia de Orai1, siendo este efecto más evidente cuando la activación plaquetaria fue iniciada por la activación del receptor de colágeno [293]–[296]. Dentro de la maquinaria celular asociada a la ECC, Redondo *et al.* describieron la participación de Orai1 en un complejo de señalización junto con TRPC1, TRPC6, el receptor de IP_3 tipo II y SERCA3. Posteriormente, el papel de TRPC1 en los procesos de agregación de plaquetas humanas se vio reforzado por el trabajo de Galán y colaboradores, resultado que contrastaba con los datos mostrados en plaquetas de ratones deficientes en TRPC1, donde se presentaba una ECC y fenotipo normales en comparación con las plaquetas de ratones “wild-type” [243], [293], [294]. Esta discrepancia podría ser justificada debido a las diferencias en los procesos de activación plaquetaria entre especies. Igual que sucede con TRPC1, no existe un consenso sobre el rol de TRPC6 en la fisiología plaquetaria. Autores como Paez Espinosa apoyan el rol de TRPC6 en la activación plaquetaria, describiendo aumentos en el tiempo de sangrado y la inhibición de la capacidad

trombogénica en las plaquetas de ratones TRPC6-KO [297]. Sin embargo, los trabajos realizados por los grupos de Ramanathan y Albarran no han sido capaces de replicar estos resultados y describen como normales los procesos de ECC y agregación plaquetaria en las plaquetas de ratones TRPC6-KO [298], [299]. No obstante, Albarran *et al.* observaron una disminución en la $[Ca^{2+}]$ citosólica en las plaquetas TRPC6-KO en estado de reposo, siendo esta diferencia atribuida a la capacidad de TRPC6 para controlar las fugas de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares [299].

2.4. Cáncer de mama:

2.4.1 Epidemiología y factores de riesgo del cáncer de mama:

Exceptuando el cáncer de piel, el cáncer de mama femenino se convirtió en el tipo más común de cáncer a nivel mundial durante el año 2020. Se estima que durante el año pasado se diagnosticaron 2,3 millones de nuevos casos, dato que representa el 11,7% del total de nuevos casos de cáncer diagnosticados [300]. Este hito refleja el aumento anual del 3,1% en la incidencia del cáncer de mama a nivel global desde el año 1980, siendo esta tendencia paralela al crecimiento y envejecimiento de la población [301]. Regiones como Norte América, con mayores ingresos, presentan una incidencia local de 89,4 casos por cada 100.000 habitantes, mientras que regiones como África central y el este asiático albergan una incidencia mucho menor (32,7 y 26,2 casos por cada 100.000 habitantes respectivamente)[300]. Esta diferencia podría atribuirse a una menor exposición a los factores de riesgo, pero también a la disparidad en la capacidad de diagnosticar la enfermedad. En 2020, el cáncer de mama fue la causa de 685.000 muertes a nivel mundial, convirtiéndose en la quinta causa de muerte asociada al cáncer [300]. Pero esta mortalidad no se distribuye de forma homogénea por las diferentes regiones geográficas, siendo, como cabía esperar, mayor en regiones con ingresos medios o bajos. Aunque con menor incidencia, estas zonas presentan una mayor mortalidad debido a factores como el diagnóstico tardío y la inaccesibilidad a tratamientos.

La epidemiología del cáncer de mama presenta diferencias claras entre países, que no son únicamente achacables a factores culturales o el nivel de sensibilización de la sociedad. La implementación de estudios epidemiológicos ha permitido detectar multitud de factores de riesgo relacionados con la aparición del cáncer de mama. Las hormonas sexuales podrían influir en el desarrollo del cáncer de mama por su capacidad para inducir la proliferación celular e incrementar la probabilidad de sufrir daños en el ADN [302]. En consecuencia, la aparición temprana de la menarquia o la entrada tardía en la menopausia podrían aumentar la probabilidad de desarrollar cáncer de mama. Factores como el embarazo, la lactancia o una menor edad al primer parto se relacionan con un menor riesgo de sufrir cáncer de mama. Se ha propuesto que esta influencia es mediada por alteraciones en la sensibilidad de las glándulas mamarias a las hormonas, reducción del número de células madre o

progenitoras y cambios en la expresión génica, que inhibirían los procesos de proliferación y favorecerían la diferenciación celular [303], [304]. En los últimos años, se ha sugerido que el uso de anticonceptivos hormonales podría aumentar el riesgo de desarrollar cáncer de mama, enfatizando la necesidad de adoptar otro tipo de medidas con el objetivo de reducir el riesgo [305]. El consumo de alcohol, la obesidad, la inactividad física o la implementación de dietas proinflamatorias también se han relacionado con el desarrollo de esta enfermedad, estimándose que alrededor de un 20% de los casos a nivel mundial son atribuibles a factores modificables [306].

Aproximadamente un 10% de los casos de cáncer de mama se asocian a factores hereditarios, aunque este porcentaje varía con frecuencia dependiendo de la etnia de la población, la edad a la cual se diagnostica el cáncer o la tipología del mismo [307]. Mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2, involucrados en la reparación del ADN, presentan una alta repercusión y se asocian con un riesgo elevado de desarrollar cáncer de mama. Las mutaciones en estos genes tienen un patrón hereditario autosómico dominante, provocando la pérdida de la función en las proteínas resultantes [308]. Aunque en menor medida, multitud de mutaciones en líneas germinales han sido descritas como factores de riesgo en cáncer de mama. La mayoría de los genes relacionados se encuentran involucrados en la reparación del ADN y de entre ellos destacan *ATM*, *CHEK2*, *PTEN*, *STK11* o *TP53* [309].

2.4.2 Clasificación del cáncer de mama:

Basándonos en el perfil histológico, el cáncer de mama se ha categorizado como carcinoma *in situ* o carcinoma invasivo. Dentro de la denominación de carcinoma mamario *in situ*, encontramos a su vez una diferenciación entre aquellos procesos de origen ductal o lobular. De forma similar, el carcinoma mamario invasivo es un grupo que presenta una gran heterogeneidad, abarcando los subtipos ductal infiltrante, lobular invasivo, mixto, mucinoso, tubular, medular y papilar. El carcinoma ductal invasivo es la variante más común, siendo responsable de en torno al 80% de las lesiones invasivas [310]. Marcadores como el receptor de estrógenos (ER), el receptor de la progesterona (PR), o el receptor del factor de crecimiento epidermal humano 2 (HER2) han sido utilizados de forma rutinaria en el análisis clínico de los casos de cáncer de mama, debido a su alto valor predictivo y a su

relevancia a la hora de determinar opciones terapéuticas de mayor especificidad. En consecuencia, estos marcadores han sido utilizados como base para desarrollar una clasificación molecular del cáncer de mama, la cual diferencia entre 4 subgrupos [311]:

1. Luminal A: en este grupo encontramos carcinomas positivos para ER (ER+) y/o PR (PR+) y negativos (expresión normal) para HER2. Constituye la forma más común en la clasificación molecular, siendo responsable de entre el 40% y el 50% de los carcinomas mamarios invasivos; sin embargo, también es el grupo con mejor pronosis [312], [313].
2. Luminal B: carcinomas ER+ y/o PR+ y positivos (sobrexpresión) para HER2. En comparación con el subgrupo luminal A, los tumores luminal B presentan una menor expresión de genes asociados al ER, y mayor expresión de los genes dependientes del HER2. Tienen peor pronosis que los tumores luminal A, aunque las personas diagnosticadas con lesiones de este tipo pueden beneficiarse tanto del uso de terapias hormonales como de quimioterapia [312].
3. HER2 sobreexpresado: carentes de ER y PR y positivos para HER2; este grupo representa el 15% de los carcinomas mamarios invasivos y suelen manifestarse como tumores con un comportamiento eminentemente agresivo. Sin embargo, este grupo responde de forma positiva a las terapias dirigidas al HER2, siendo constante la mejora de estas opciones terapéuticas y el manejo de la enfermedad [312], [314].
4. Basal o triple negativo: carentes de ER, PR y sin sobreexpresión del HER2, estos tumores se caracterizan por su mayor capacidad proliferativa e invasiva. Constituye la variante con peor pronóstico, siendo la quimioterapia la única alternativa y presentando recaídas entre el segundo y tercer año tras la primera presentación de forma común [312], [315].

La metástasis es el proceso que engloba la diseminación de las células cancerosas y la formación de nuevos tumores en una localización diferente a la lesión primaria. Es un proceso con una gran relevancia clínica, siendo responsable del 90% de las muertes inducidas por el cáncer [316]. La metástasis abarca una serie de eventos secuenciales e interrelacionados que comienzan con la escisión del tumor primario y la invasión del tejido circundante. Posteriormente se produce la entrada de las células cancerosas al sistema linfático y/o circulatorio, facilitando su diseminación. Por último, tiene lugar la salida de los

vasos sanguíneos o linfáticos y la relocalización de las células cancerosas en un nuevo órgano, etapa que incluye la adaptación al ambiente y la reprogramación del estroma para formar micrometástasis [317]. La presencia de metástasis en el momento del diagnóstico del cáncer de mama es un marcador claro de la prognosis de la enfermedad. Los casos en los que las células malignas se encuentran localizadas únicamente en el lóbulo o en el ducto mamario en el diagnóstico muestran un 98% de supervivencia a los 5 años. Sin embargo, este porcentaje se ve reducido hasta el 83% si se observan signos de invasión en los nódulos linfáticos regionales, y hasta el 23% si se observa metástasis distal durante el diagnóstico [318]. Dentro de la clasificación molecular del cáncer de mama se han señalado diferencias en la capacidad y tendencia invasiva de los diferentes subtipos. Los tumores luminal A y luminal B tienden a metastatizar en el hueso y los nódulos linfáticos; los tumores HER2 sobreexpresado muestran igualmente una tendencia por el hueso y los nódulos linfáticos además de por el cerebro; mientras que el subtipo basal tendría preferencia por invadir los pulmones y el cerebro [319].

2.4.3 Calcio y cáncer de mama:

Históricamente los procesos de señalización intracelular dependientes de Ca^{2+} han sido considerados como irrelevantes para la fisiopatología del cáncer. Teoría que, aunque se haya demostrado errónea, reflejaba la línea de pensamiento predominante hace no muchos años, la cual sustentaba que estos mecanismos de comunicación se desarrollaban de forma homogénea en todas las células no excitables [320]. En la última década, tras multitud de avances en el conocimiento de la maquinaria celular involucrada en el desarrollo y control de las señales de Ca^{2+} , esta maquinaria ha sido el objetivo de un amplio número de herramientas terapéuticas, tanto para el cáncer como para otras enfermedades [321], [322]. Actualmente, no existen dudas sobre la relevancia de los mecanismos de señalización de Ca^{2+} en la aparición y desarrollo del cáncer, siendo los procesos celulares de proliferación, migración, invasión o muerte celular mediados gracias al control de las señales de Ca^{2+} . En algunos subtipos de cáncer se han descrito alteraciones en la maquinaria celular implicada en la homeostasis del Ca^{2+} . Dentro de estas son frecuentes los cambios en la expresión de proteínas o la introducción de modificaciones post-traduccionales, adaptaciones que se ajustan a los requerimientos de las células malignas [323].

El cáncer de mama, como se ha descrito anteriormente, es una terminología que engloba un grupo heterogéneo de lesiones originadas en las glándulas mamarias. Esta heterogeneidad se refleja también en las adaptaciones de los mecanismos de señalización de Ca^{2+} , existiendo hasta la fecha un número reducido de estudios que relacionen los diferentes subtipos de cáncer de mama con la alteración de algún elemento involucrado en la señalización de Ca^{2+} . Debido a su implicación en los procesos de lactancia, el remodelado de los sistemas de homeostasis del Ca^{2+} es una característica del tejido mamario [324]. Por ello, proteínas con un peso importante en este proceso, como PMCA2, ORAI1 y SPCA2 [325], se han relacionado con la aparición y desarrollo del cáncer de mama.

La implicación de la ECC en la fisiopatología del cáncer de mama fue evidente desde los primeros estudios que relacionaban esta enfermedad con la homeostasis del Ca^{2+} [326]–[328]. Actualmente, la ECC se presenta como un evento de vital importancia para el crecimiento celular, proliferación, migración, metástasis y resistencia a la apoptosis de los diferentes subtipos de cáncer de mama [324]. La sobreexpresión de los canales Orai1 se ha descrito tanto en muestras de pacientes como en una gran variedad de líneas celulares de cáncer de mama. Dentro de las últimas destacan las líneas MCF7 y MDA-MB-231, que son los modelos más extendidos de las variantes ER^+ y triple negativo respectivamente [329], [330]. En líneas celulares y muestras clínicas caracterizadas como ER^+ también se ha descrito la sobreexpresión de Orai3. Modificación que es dependiente de la actividad del $\text{ER}\alpha$, y que otorga a Orai3 el control de la proliferación y migración de estas células [221], [331], [332]. Dentro de la familia de canales TRPC, tanto TRPC1 como TRPC6 se encuentran sobreexpresados en algunas líneas celulares de cáncer de mama, especialmente en aquellas del subtipo basal [333]. Nuestro grupo identificó a TRPC6 como parte de la maquinaria celular anexa a la ECC en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF7. En estos modelos, la actividad de TRPC6 es muy relevante en la ECC y el desarrollo de los procesos de proliferación, migración e invasión. Papel que es desarrollado a través del control de la expresión de membrana de Orai1 y Orai3 en los respectivos modelos celulares [330].

Papel de la ECC en la proliferación y evasión de la muerte de las células de cáncer de mama:

Multitud de estudios han identificado a la ECC como un mecanismo esencial para los procesos de proliferación y evasión de la muerte celular en el cáncer de mama. Estudios *in vitro e in vivo* han relacionado las elevadas concentraciones de Na^+ del microambiente celular de los tumores mamarios con los procesos inflamatorios y el aumento de la proliferación celular. En estos estudios, el incremento de la concentración de Na^+ extracelular es descrito como un evento capaz de activar la ECC, mecanismo que es mediado por la sobreexpresión de la SIK3 [334]. Además, el aumento en la actividad de los canales Orai1 por esta vía habilita la sobreexpresión de las glicoproteínas P, agentes que promueven la quimio-resistencia al ser capaces de expulsar los fármacos al exterior celular [334], [335]. SPCA2, la bomba ATPasa de Ca^{2+} del aparato del Golgi, también ha sido involucrada en los mecanismos de proliferación del cáncer de mama. Durante el proceso de lactancia, la expresión de SPCA2 aumenta en las células del epitelio mamario [325], y esta misma alteración se ha descrito en un número elevado de muestras de cáncer de mama. En este contexto, SPCA2 media una entrada de Ca^{2+} no capacitativa a través de los canales Orai1, promoviendo la activación de NFAT1, la proliferación celular y la progresión de la enfermedad. Otro factor ambiental determinante para la aparición y desarrollo del cáncer de mama son los depósitos de colágeno del tejido mamario. Un estudio reciente ha desvelado la capacidad del colágeno para promover las características tumorales de las células MCF7 y evitar la muerte celular. Esta influencia es mediada por la sobreexpresión y colocalización de los canales de membrana $\text{K}_v10.1$ y Orai1, asociación que determina la conducción de una entrada de Ca^{2+} constitutiva en estas células [336]. Paralelamente, Orai3 también promueve la proliferación de las células MCF7 a través de su influencia positiva sobre la expresión del oncogen *c-myc*, proceso que se ha descrito como dependiente de la activación de la cinasa MAP [332]. Por último, se ha descrito cómo la sobreexpresión y aumento de la actividad de Orai3 provoca la activación de la vía PI3K/Sgk-1/Sek-1 y la degradación del supresor tumoral p53, contribuyendo con ambos factores a los procesos de evasión de la muerte celular en algunos tumores mamarios [337].

Papel de la ECC en la migración, metástasis y angiogénesis de las células de cáncer de mama:

Dentro de la maquinaria implicada en los procesos de migración del cáncer de mama, la ECC también desarrolla un papel crucial. Gueder *et al.* han descrito como la inhibición de la α -glucosidasa, en las células MCF7 y MDA-MB-231, reduce la expresión de STIM1 y la ECC. Esta alteración conduce a la reducción de la expresión de la integrina- β 1, la inhibición de la fosforilación de la cinasa de adhesión focal (FAK) y la inactivación de las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2); cambios que resultan en una menor velocidad en la renovación de la adhesión focal y la reducción de la capacidad migratoria de las células de cáncer de mama [338], [339]. Yu *et al.* han descrito una relación negativa entre la actividad del eje enzima convertidora de angiotensina II/angiotensina 1-7/MAS y la capacidad metastática de las células de cáncer de mama. La activación de este eje, de especial relevancia en el microambiente tumoral, inhibe la capacidad metastática del cáncer de mama a través de una disminución de la ECC, el bloqueo de la señal PAK1/NF- κ B/Snail, y el aumento de la expresión de E-caderina [340]. En células MCF7, la ECC mediada por Orai3 ha sido descrita como un evento clave para el desarrollo de la migración celular. Este rol es mediado gracias a la capacidad de Orai3 para activar NFAT y ERK1/2, además de promover la fosforilación de FAK. La transición desde un estado epitelial a un fenotipo mesenquimal (EMT), más invasivo, es un proceso que ha sido ampliamente relacionado con la metástasis del cáncer de mama. Recientemente, un mecanismo regulador entre la actividad del factor de transcripción Oct4 y los eventos dependientes del factor de crecimiento transformante β (TGF β) ha sido propuesto como el mecanismo responsable de controlar esta transformación. En líneas celulares como las MCF7, la expresión de Oct4 predomina imponiendo el fenotipo epitelial; por el contrario, al estimular las MCF7 con TGF β se desencadena el proceso de EMT. Durante este proceso, la expresión de Oct4 es inhibida y la ECC es potenciada gracias a la sobreexpresión del tándem STIM1-Orai1 [341]. Recientemente la actividad de STIM1 y STIM2 se ha involucrado en los procesos de EMT inducidos por TGF β ; sin embargo, aunque ambas proteínas serían capaces de mediar la ECC tras la estimulación por este factor, únicamente STIM2 estaría involucrado en los mecanismos de entrada de Ca²⁺ operados por receptor durante el proceso de transición [342]. La hipoxia es otro estímulo capaz de inducir la EMT y promover procesos como la migración, invasión y angiogénesis en las células de cáncer de mama triple negativo. Tras la hipoxia, Liu *et al.* han descrito un aumento en los procesos de señalización dependientes de Notch y la

consecuente sobreexpresión de Orai1, alteración que determina un aumento en la ECC y la activación de los mecanismos dependientes de Orai1. En este eje, la actividad de NFAT4 es de especial relevancia ya que será el encargado de mediar los procesos de invasión y angiogénesis [343]. Paralelamente, en las células MDA-MB-468 la EMT inducida por hipoxia se ha relacionado con la sobreexpresión de TRPC1, siendo la actividad de este canal capaz de controlar el estado de fosforilación de Akt y la expresión del factor inducible por hipoxia 1 α (HIF 1 α) [333]. La implicación TRPC1 en la EMT ha sido confirmada en una amplia variedad de líneas celulares de cáncer de mama, mostrándose evidente que la expresión de TRPC1 está relacionada de forma directa con la capacidad de estas células para desarrollar la EMT inducida por TGF β [344], [345].

Debido a su relación con la mitocondria, la ECC también ha sido involucrada en el metabolismo celular, interacción que ha cobrado un especial interés en algunos modelos de cáncer de mama. La relación entre la ECC y la mitocondria es articulada por la proteína MCU, habiendo sido observada la sobreexpresión de este canal en multitud de muestras de cáncer de mama. Esta alteración promueve la captación de Ca²⁺ por la mitocondria, la producción de especies reactivas de oxígeno y la capacidad migratoria de las células malignas. Consecuentemente, el silenciamiento de MCU, o su inhibición por el agente rojo de rutenio, ha demostrado inhibir la ECC y la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231 [346].

Papel de la ECC en el desarrollo de fármacos antitumorales contra el cáncer de mama:

Atendiendo a la importancia de la ECC en la fisiopatología del cáncer de mama, multitud de estudios están enfocando el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos sobre este mecanismo de señalización. Ensayos *in vitro* han mostrado la mayor capacidad anti-proliferativa de aquellos inhibidores de tirosina cinasa que también son capaces de inhibir la ECC, en comparación con aquellos inhibidores que no tienen efecto sobre la ECC [347]. Recientemente, ensayos *in vitro* en células MDA-MB-468 han demostrado que los inhibidores farmacológicos de SOCE, SYNTA66 y YM58483, reducen la proliferación y migración de este modelo tras una amplia variedad de estímulos [348]. Chakraborty y sus colaboradores han descrito el potencial antitumoral del compuesto Phemindole, un

derivado del 3,3'-diindolilmetano. El efecto negativo de Phemindole sobre la viabilidad de células de cáncer de mama triple negativo se ha justificado debido a la disminución en la expresión de STIM1 y la reducción de su colocalización con Orai1, resultando en un aumento del stress reticular, disminución de la ECC y la muerte celular [349]. Las posibilidades que ofrece Orai3 en la generación de nuevos fármacos contra el cáncer de mama, al igual que para otras tipologías de cáncer, no han pasado inadvertidas para la comunidad científica. Focalizar la acción de los nuevos agentes terapéuticos sobre Orai3 podría eliminar la problemática asociada a la inhibición del canal Orai1, mucho más ubicuo. Opción que ha resultado ser contraproducente para algunos quimioterápicos capaces de inducir estrés reticular. Además, se ha comprobado como este enfoque terapéutico ejerce una influencia negativa sobre la respuesta inmune antitumoral de las células T CD8⁺, donde la ECC es un evento crucial [350], [351]. Por el contrario, esta idea ha sido recientemente cuestionada tras la publicación de un artículo que describe como la inhibición parcial de Orai1 resulta en un aumento de la actividad anticancerígena de los linfocitos T citotóxicos y células natural killer [352].

Objetivos:

3. Objetivos:

- 1.- Explorar la funcionalidad de la proteína filamina A dentro del mecanismo de ECC, así como su influencia sobre la interacción entre STIM1 y Orai1.

- 2.- Definir el papel funcional de la adenilato ciclasa 8 en la regulación de la ECC y su influencia sobre la capacidad migratoria y proliferativa de las células de cáncer de mama triple negativo.

- 3.- Caracterizar el papel del canal TRPC6 en la homeostasis de la concentración de Ca^{2+} citosólico y reticular basal en las células de cáncer de mama caracterizadas como ER+.

3. Objectives:

- 1.- To ascertain the functional role of filamin A in SOCE, as well as its influence on the STIM1-Orai1 interaction.

- 2.- To define the functional role of adenylyl cyclase 8 in the regulation of SOCE and its relevance in the migratory and proliferative capability of triple negative breast cancer cells.

- 3.- To characterize the role of TRPC6 channels in the homeostasis of resting cytosolic and endoplasmic reticulum Ca^{2+} concentration in ER+ breast cancer cells.

Material y métodos:

4. Material y métodos:

La información recogida en este apartado complementa las secciones de material y métodos de cada una de las publicaciones que forman la presente Tesis Doctoral.

4.1 Reactivos:

- 1, 4-ditiotreitol (DTT) - ThermoFisher Scientific (Waltham, Estados Unidos).
- 8-Br-cAMP - Sigma (St Louis, Estados Unidos).
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) - Sigma (St Louis, Estados Unidos).
- Ácido tetracético etilenglicol (EGTA) - Sigma (St Louis, Estados Unidos).
- Albúmina de suero bovino (BSA) - Sigma (St Louis, Estados Unidos).
- Apirasa - Sigma (St Louis, Estados Unidos).
- BAPTA-AM – Sigma (St Louis, Estados Unidos).
- Blotting paper – Amersham Biosciences (Amersham, Reino Unido)
- Brefeldina A - Sigma (St Louis, Estados Unidos).
- Carbamilcolina Clorhidrato (Carbacol) - ThermoFisher Scientific (Waltham, Estados Unidos).
- Clean-Blot™ - ThermoFisher Scientific (Waltham, Estados Unidos).
- Cloruro cálcico (CaCl₂) - ThermoFisher Scientific (Waltham, Estados Unidos).
- DharmaFECT agente de transfección - Dharmacon Inc (Lafayette, Estados Unidos).
- Dimetil sulfóxido (DMSO) - ThermoFisher Scientific (Waltham, Estados Unidos).

- Dodecilsulfato sódico (SDS) - Sigma (St Louis, Estados Unidos).
- Endotelina 1 - Sigma (St Louis, Estados Unidos).
- Fura-2-acetilmetil éster (fura-2/AM) - Molecular Probes (Leiden, Países Bajos).
- Glucosa - Sigma (St Louis, Estados Unidos).
- HEPES - Sigma (St Louis, Estados Unidos).
- Inhibidores de proteasas - Roche (Basilea, Suiza).
- Ionomicina - Sigma (St Louis, Estados Unidos).
- Kit de Ácido bicinconinico (BCA) - ThermoFisher Scientific (Waltham, Estados Unidos).
- Kit de Bromodeoxiuridina (BrdU) - BioVision Inc (Milpitas, EEUU).
- KT5720 - Sigma (St Louis, Estados Unidos).
- Lipofectamina RNAiMAX - Invitrogen (Carlsbad, CA, Estados Unidos).
- Marcador de peso molecular - Bio Rad Laboratories Inc (Hércules, Estados Unidos).
- Membrana de nitrocelulosa – Amersham Biosciences (Amersham, Reino Unido).
- Penicilina/Estreptomina - ThermoFisher Scientific (Waltham, Estados Unidos).
- PNGasa F de *Elizabethkingia miricola* - Promega (Madison, Estados Unidos).
- Prostaglandina I₂ - Sigma (St Louis, Estados Unidos).
- Bolitas de agarosa conjugadas a proteína A - Merck-Millipore (Burlington, Estados Unidos).
- Resinas de agarosa conjugadas con estreptavidina de alta capacidad - Sigma (St Louis, Estados Unidos).

- Suero de caballo (HS) - ThermoFisher Scientific (Waltham, Estados Unidos).
- Suero fetal bovino (FBS) - ThermoFisher Scientific (Waltham, Estados Unidos).
- Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin - ThermoFisher Scientific (Waltham, Estados Unidos).
- SuperSignal® West Dura - ThermoFisher Scientific (Waltham, Estados Unidos).
- Sustrato fluorogénico de la Caspasa 3 - Sigma (St Louis, Estados Unidos).
- Tapsigargina (TG) – Sigma (St Louis, Estados Unidos).
- TPEN - Sigma (St Louis, Estados Unidos).
- Tripsina 5% EDTA 10X - ThermoFisher Scientific (Waltham, Estados Unidos).
- Trizol - ThermoFisher Scientific (Waltham, Estados Unidos).
- Trombina - Sigma (St Louis, Estados Unidos).
- Turbofect agente de transfección – Invitrogen (Carlsbad, CA, Estados Unidos).
- Tween-20 - ThermoFisher Scientific (Waltham, Estados Unidos).

4.2 Anticuerpos:

Anticuerpo:	Hospedador	Epítipo.	Dilución Western Blotting / tiempo de incubación.
Anticuerpo anti-inmunoglobulina G de conejo conjugado con peroxidasa de rábano - Jackson laboratories (West Grove, Estados Unidos)	Cabra.	IgG y cadena ligera de otras inmunoglobulinas de conejo.	1:10000 / 1 H.
Anticuerpo anti-inmunoglobulina G de ratón conjugado con peroxidasa de rábano - Jackson laboratories (West Grove, Estados Unidos).	Cabra.	IgG y cadena ligera de otras inmunoglobulinas de ratón.	1:10000 / 1 H.
Anticuerpo policlonal anti-fosfo-Filamina (pSer2152).	Conejo.	Residuo Serina 2152 fosforilado	1:1000 / overnight.
Anticuerpo policlonal anti-Filamina – Bionova (Madrid, España).	Conejo.	Residuos 2597-2647	1:1000 / overnight.
Anticuerpo monoclonal anti-Filamina – ThermoFisher Scientific (Waltham, Estados Unidos).	Ratón.	No especificado.	1:1000 / overnight.
Anticuerpo policlonal anti-Adenilato ciclase 8 - ThermoFisher Scientific (Waltham, Estados Unidos).	Conejo.	Aminoácidos 946-972 de la región central de la AC8 humano.	1:1000 / overnight.
Anticuerpo anti- β -actina - Sigma (St Louis, Estados Unidos).	Conejo.	11 aminoácidos del extremo carboxilo de β -actina.	1:10000 / 1 H.
Anticuerpo monoclonal anti-FAK - Abcam (Cambridge, Reino Unido).	Conejo.	Secuencia de aminoácidos del FAK humano entre 700-800.	1:2000 / overnight.

Material y métodos

Anticuerpo monoclonal anti-FAK fosforilado- Abcam (Cambridge, Reino Unido).	Conejo.	Y-397 fosforilado. Secuencia no especificada.	1:1000 / overnight.
Anticuerpo policlonal anti-Orai1 - Sigma (St Louis, Estados Unidos).	Conejo.	Aminoácidos 288-301 de Orai1 humano.	1:500 / 2 H.
Anticuerpo monoclonal anti-Orai3 - Sigma (St Louis, Estados Unidos).	Ratón.	19 aminoácidos del extremo carboxilo de Orai3.	1:500 / overnight.
Anticuerpo monoclonal anti-STIM1 - BD Transduction Laboratories (Franklin Lakes, Estados Unidos)	Ratón.	Aminoácidos 25-139 de STIM1 humano.	1:500 / 2 H.
Anticuerpo policlonal anti-STIM2 - ThermoFisher Scientific (Waltham, Estados Unidos).	Conejo.	18 aminoácidos del extremo carboxilo de STIM2.	0.5-1:1000 / overnight.
Anticuerpo policlonal anti-TRPC6 – Origene (Rockville, United States)	Conejo.	Aminoácidos 573-586 del TRPC6 de rata (2° loop extracelular).	1:500 / overnight.
Anticuerpo anti-antiphospho-eIF2 α Cell Signaling (Boston, Estados Unidos).	Conejo.	Ser51 fosforilada. Secuencia no especificada.	1:1000 / overnight.
Anticuerpo monoclonal anti-PMCA - ThermoFisher Scientific (Waltham, Estados Unidos).	Ratón.	No especificado.	1:1000 / 2 H.
Anticuerpo monoclonal anti-fosfoserina - Merkmillipore (Burlington, Estados Unidos).	Ratón.	Fosfoserina unida a KLH.	2:1000 / overnight.

Tabla 1. Listado de anticuerpos utilizados.

4.3 siARNs y plásmidos:

ARN de interferencia para FLNA - Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, Estados Unidos).

ARN de interferencia para Adenilato ciclasa 8 - ThermoFisher Scientific (Waltham, Estados Unidos).

ARN de interferencia para Orai3 - Sigma (St Louis, Estados Unidos).

ARN de interferencia para STIM2 - Sigma (St Louis, Estados Unidos).

ARN de interferencia control negativo - Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, Estados Unidos).

ARN de interferencia control negativo - ThermoFisher Scientific (Waltham, Estados Unidos).

Plásmido de sobreexpresión pcDNA-myc-FLNA-WT, cedido por el Dr. Blenis, Universidad de Harvard, Boston, MA, Estados Unidos.

Plásmido de sobreexpresión pcDNA-myc-FLNA-S2152A, cedido por el Dr. Blenis Universidad de Harvard, Boston, MA, Estados Unidos.

Plásmido de sobreexpresión de Orai1 (YFP-Orai1), cedido por el Dr. Christoph Romanin, Universidad de Linz, Linz, Austria.

Plásmido de sobreexpresión del fragmento OASF (YFP-OASF), cedido por el Dr. Christoph Romanin, Universidad de Linz, Linz, Austria.

Plásmido de sobreexpresión de Adenilato ciclasa 8 (YFP-AC8), cedido por la Dr. Michelle Halls, Monash university, Melbourne Australia.

Plásmidos de sobreexpresión de mutantes de Orai1: Flag-Orai1-S27A/S30A y Flag-Orai1-S27D/S30D, cedidos por el Dr. Agustín Guerrero, CINVESTAV, Mexico.

Plásmido de sobreexpresión mutante de Orai1: G-GECO1.2-Orai1 el Dr. Michael Cahalan (Addgene plasmid #73562).

Plásmido de sobreexpresión pCMV R-CEPIA1er, cedido por el Dr. Masamitsu Iino (Addgene plasmid # 58216).

Plásmido de sobreexpresión del dominante negativo del TRPC6 (dnTRPC6), cedido por la Dr. Kristina Friedland, Universidad Friedrich-Alexander, Nürnberg, Alemania.

Plásmido de silenciamiento del TRPC6 (shTRPC6), cedido por la Dr. Kristina Friedland, Universidad Friedrich-Alexander, Nürnberg, Alemania.

4.4 Líneas de cultivo:

4.4.1 MCF-10A:

Línea celular epitelial mamaria no tumorigénica cedida por la Dr. Potier-Cartereau (Université François Rabelais, Tours, Francia). Originalmente esta línea fue extraída de una donante caucásica de 36 años en 1984 [353]. Su contaje cromosómico es próximo al diploide, desarrollan un programa proliferativo y un arresto del crecimiento bien definidos, no mostrando signos de diferenciación ni senescencia. La concentración de Ca^{2+} en el medio tiene un efecto sobre la morfología de las MCF-10A, las cuales son capaces de formar estructuras acinares que asemejan a la anatomía mamaria in vivo. Esta línea celular se cultivó a 37 °C, en condiciones de humedad saturada y con una presión parcial de CO_2 del 5% en medio DMEM-F12 suplementado con: suero de caballo (5% v/v), penicilina (100U/mL), estreptomycin (100U/mL), insulina humana (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), toxina colérica (1 ng/mL), hidrocortisona (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y factor de crecimiento epidermal (EGF) (10 ng/mL).

4.4.2 MCF7:

Línea celular epitelial adherente, extraída en 1970 de la efluición pleural de una donante caucásica de 69 años diagnosticada con un carcinoma ductal invasivo [354]. Las MCF7 albergaban un número de cromosomas superior al triploide y retienen algunas de las características del epitelio mamario, como la capacidad de procesar el estradiol a través de receptores estrogénicos citoplasmáticos. Presentan receptores para los estrógenos y progesterona, siendo comúnmente utilizada como modelo in vitro de cáncer de mama luminal A. Esta línea celular se cultivó a 37 °C en condiciones de humedad saturada, con una presión parcial de CO_2 del 5% y en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (10% v/v), penicilina (100U/mL) y estreptomycin (100U/mL).

4.4.3 T47D:

Línea celular epitelial adherente, extraída en 1978 por I. Keydar de la efluición pleural de una donante caucásica de 54 años diagnosticada con un carcinoma ductal invasivo [355]. Las T47D son células hipotriploides que presentan receptores para los estrógenos y progesterona, y junto a la línea MCF7 son las células más comúnmente utilizadas en la formación de modelos xenógrafos de cáncer de mama luminal A. Recientemente, se ha

propuesto la línea T47D como el modelo in vitro preferente para el estudio del cáncer de mama luminal A sensible a progesterona, presentando las MCF7 como insensibles a la misma en presencia de estrógenos [356]. Esta línea celular se cultivó a 37 °C, en condiciones de humedad saturada y con una presión parcial de CO₂ del 5% en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (10% v/v), penicilina (100U/mL) y estreptomycin (100U/mL).

4.4.4 BT20:

Línea celular epitelial adherente, extraída del tejido tumoral primario de una donante caucásica de 74 años diagnosticada con carcinoma ductal invasivo [357]. Las BT-20 son una línea hiperdiploide categorizada como modelo de cáncer de mama triple negativo. Se ha descrito que las BT-20 expresan el ARN mensajero de un receptor de estrógenos, el cual carece del exón 5, además, también se ha registrado la expresión de los oncogenes WNT3 y WNT7B [358]. A la hora de realizar experimentos funcionales con estas células, es importante tener en cuenta que su crecimiento es inhibido por el factor de necrosis tumoral alfa. Esta línea celular se cultivó a 37°C, en condiciones de humedad saturada y con una presión parcial de CO₂ del 5% en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (10% v/v), penicilina (100U/mL) y estreptomycin (100U/mL).

4.4.5 MDA-MB-468:

Línea celular epitelial adherente, extraída en 1977 de la eflujo pleural de una donante de raza negra de 51 años diagnosticada con un adenocarcinoma metastático de mama [359]. Las MDA-MB-468 son una línea celular aneuploide que es clasificada como triple negativo, siendo comúnmente utilizada en la formación de modelos xenógrafos de este subtipo de cáncer de mama. Esta línea celular se cultivó a 37 °C, en condiciones de humedad saturada y con una presión parcial de CO₂ del 5% en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (10% v/v), penicilina (100U/mL) y estreptomycin (100U/mL).

4.4.6 MDA-MB-231:

Línea celular epitelial adherente, extraída de la eflujo pleural de una donante caucásica de 51 años, la cual fue diagnosticada con un carcinoma ductal invasivo [360]. Esta línea celular aneuploide no presenta receptores para la progesterona, los estrógenos, ni el factor de

crecimiento epidérmico; siendo además carentes de la E-cadherina. Ensayos de microarrays han permitido caracterizar a las MDA-MB-231 como basal o triple negativo, conservando su gran potencial proliferativo e invasivo en los ensayos in vitro. Esta línea celular se cultivó a 37 °C, en condiciones de humedad saturada y con una presión parcial de CO₂ del 5% en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (10% v/v), penicilina (100U/mL) y estreptomycin (100U/mL).

4.4.7 Hs578T:

Línea celular epitelial adherente, extraída en 1973 por A.J. Hackett, *et al.* de la efluencia pleural de una donante caucásica de 74 años diagnosticada con carcinoma ductal invasivo [361]. Esta línea celular fue adquirida gracias a la cesión del Dr. Benítez (CNIO, Madrid, España). Las Hs578T son células hipotriploides caracterizada como triple negativo. Esta línea celular se cultivó a 37 °C, en condiciones de humedad saturada y con una presión parcial de CO₂ del 5% en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (10% v/v), penicilina (100U/mL) y estreptomycin (100U/mL).

4.4.8 M2 y M2A7 (A7):

Las células M2 son una línea epitelial adherente, identificada originalmente en un estudio basado en el cultivo de melanomas humanos primarios y metastáticos. La línea M2 fue identificada por su movilidad y morfología anormal [362], las cuales fueron posteriormente relacionadas con la ausencia de filamina A [363]. La expresión de filamina A en las células M2 es indetectable por anticuerpos anti-filamina A, mientras que, en otras líneas de melanoma, caracterizadas por su mayor movilidad, esta proteína es expresada en una ratio filamina/actina de entre 1:80 y 1:140. Posteriormente, la línea celular A7 se generó tras la sobreexpresión de la filamina A en las células M2, siendo su ratio de expresión filamina/actina cercano al encontrado en las líneas de melanoma filamina A+ "wild type" (1:160) [363]. Tanto las M2 como las A7 se cultivaron a 37 °C, en condiciones de humedad saturada y con una presión parcial de CO₂ del 5% en medio MEM suplementado con suero fetal bovino (10% v/v), penicilina (100U/mL) y estreptomycin (100U/mL).

4.5 Preparación de plaquetas:

Las muestras utilizadas se obtuvieron como donaciones destinadas a la investigación por parte del servicio de Hematología General del Hospital San Pedro de Alcántara (Avenida Pablo Naranjo Porras, s/n; Cáceres). Todos los procesos se llevaron a cabo cumpliendo los principios de la Declaración de Helsinki y sus revisiones posteriores para estudios en humanos, la Ley 14/2007 de investigación biomédica, el Convenio del Consejo de Europa relativo a los Derechos Humanos y de la Biomedicina, la declaración de la Unesco sobre genoma humano y derechos humanos, y la legislación vigente en España y la Unión Europea para tal fin. Asimismo, los experimentos realizados cumplieron también con los principios de los comités de Bioética del Servicio Extremeño de Salud y de la Universidad de Extremadura.

Tras la recepción de las muestras, y con el objetivo de evitar la activación plaquetaria y la coagulación sanguínea, la sangre obtenida se mezcló con una solución de ácido cítrico dextrosa (ACD) en una proporción 1:6 (ACD:sangre). Tras este paso, la sangre fue centrifugada 5 minutos a $700 \times g$, dando como resultado tres fracciones bien diferenciadas: en el fondo del tubo y formando una fase de color rojo se aglutinan los eritrocitos, inmediatamente por encima de estos se localizó un halo blanquecino donde se sitúan los leucocitos; y en la parte superior, un líquido de color amarillento denominado plasma rico en plaquetas (PRP). El PRP fue extraído y suplementado con ácido acetilsalicílico ($100 \mu\text{M}$), un inhibidor irreversible de la ciclooxigenasa COX-1, el cual es capaz de evitar la liberación de prostaglandinas plaquetarias. Además, con el objetivo de hidrolizar el ADP y ATP secretado por las plaquetas, e impedir la activación plaquetaria, se procedió a suplementar el PRP con apirasa ($40 \mu\text{g}/\text{mL}$). El PRP suplementado se centrifugó a $350 \times g$ durante 20 minutos para sedimentar las plaquetas en el fondo del tubo formando un pellet blanquecino. Posteriormente se procedió a la extracción del plasma pobre en plaquetas, generado en el proceso de centrifugación como sobrenadante, y se resuspendió el pellet en buffer HBS suplementado con apirasa ($40 \mu\text{g}/\text{mL}$).

Solución ACD:	
Reactivos:	concentración
Ácido cítrico	85 mM
Citrato sódico	78 mM
Glucosa	111 mM

pH 7,4

Tabla 2. Composición solución ACD.

4.6 Transfección celular:

El proceso de transfección celular se basa en la introducción artificial de ácidos nucleicos al interior de una célula con el objetivo de producir modificaciones en el genoma y proteoma celular [364]. El desarrollo de las diferentes técnicas de transfección ha posibilitado el estudio de la función y los mecanismos de regulación de multitud de genes. Podemos diferenciar entre transfecciones puntuales, en las que el ácido nucleico es degradado tras un periodo de tiempo variable, o transfecciones estables, donde la molécula introducida es insertada en el ADN del hospedador, o se desarrollan otras metodologías para seleccionar las células descendientes que conserven la molécula transfectada. Dentro de las funcionalidades de esta técnica resaltan la posibilidad de inhibir o aumentar la expresión de las proteínas de interés, sea en su forma nativa o habiendo introducido alguna modificación. En el desarrollo de este proyecto la inhibición de la expresión de las proteínas se consiguió a través de la transfección de ARN interferente pequeño (*siARN* en inglés) y/o la transfección de plásmidos que codificaban ARN de horquilla pequeño (*shARN* en inglés). Para introducir los ácidos nucleicos al interior celular se utilizó los reactivos de transfección DharmaFECT™, Turbofect™ o Lipofectamina. Estos agentes están compuestos por lípidos catiónicos que recubren las moléculas de ácidos nucleicos, facilitando su paso al interior celular sin ser degradadas. La transfección de las células adherentes se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del fabricante, siendo adaptadas las condiciones a la línea celular utilizada:

1. La transfección se realizó cuando el cultivo celular se encontraba en una confluencia comprendida entre el 70% y el 90%.
2. El agente de transfección fue mezclado con medio de cultivo sin suero y con el plásmido o siARN que se deseaba transfectar. Tras ser incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos, la mezcla se añadió al cultivo. Esta incubación

favorece la asociación de las micelas lipídicas a las moléculas de ácidos nucleicos, aumentando la eficacia de transfección.

- Los experimentos se realizaron 24 o 48 horas después de la transfección. Todas las condiciones experimentales fueron comparadas con el respectivo control, habiendo comprobado la eficacia de la transfección tanto por Western blotting como visualizando los marcadores fluorescentes si los hubiese.

Soporte de cultivo:	Área de cultivo cm ² :	Volumen de agente de transfección:	Cantidad de ADN o ARN:	Volumen de medio de cultivo carente de suero:
Placa 90 mm	64	36 µL	12 µg	600 µL
Placa de 6 pocillos	9.5 (pocillo)	9 µL	4 µg	200 µL

Tabla 3. Condiciones más comunes de transfección según el soporte de cultivo.

Para transfectar las plaquetas, se preparó una dilución que albergaba 2×10^8 plaquetas por mL (diluidas en Tyrode's buffer modificado). Seguidamente, se añadió a este medio 40 nM del siARN y el volumen de Lipofectamina RNAiMAX recomendado por el fabricante.

Medio Tyrode's buffer modificado:	
NaCl	138 mM
Dextrosa	5,5 mM
NaHCO ₃	12 mM
CaCl ₂	800 µM
MgCl ₂	400 µM
KCl ₂	2,9 mM
Na ₂ HPO ₄	360 µM
HEPES	20 mM
Prostaglandina I ₂	1 µM
pH:7.4	

Tabla 4. Composición del medio Tirode's buffer modificado

La electroporación es un sistema de transfección física que permite introducir tanto ácidos nucleicos como otros elementos en el interior celular gracias a la utilización de pulsos eléctricos con una duración no mayor de un milisegundo. Tras la aplicación de una corriente eléctrica, se produce la desestructuración de la bicapa de fosfolípidos y la formación temporal de poros en la membrana celular. A través de estos poros las moléculas presentes en el medio extracelular podrán acceder al medio intracelular. Para el presente trabajo, las suspensiones de plaquetas fueron traspasada a una cubeta de electroporación con 4 µg/mL de anticuerpo anti-FLNA o anti-rabbit, de acuerdo con los métodos publicados anteriormente [365]. La electroporación fue llevada a cabo a 4kV/cm, con una capacidad de 25 microfaradios y siendo desarrollados 7 pulsos consecutivos. Posteriormente, las plaquetas se dejaron en reposo y fueron incubadas con los anticuerpos durante 1 hora a 37 °C. Al término de la hora, las muestras se centrifugaron 20 min a 350 x g, siendo finalmente las plaquetas resuspendidas en medio HBS y preparadas para la ejecución de los experimentos. Esta técnica fue implementada en un sistema de electroporación Bio-Rad Gene Pulser Xcell (Bio-Rad - Hércules, California, Estados Unidos).

Tampón HEPES salino (HBS):	
HEPEs	10 mM
NaCl	145 mM
KCl	5 mM
MgSO ₄	1 mM
Diluir en H ₂ O miliQ pH: 7,4	

Tabla 5. Composición del medio HBS.

4.7 Técnicas de aislamiento de proteínas:

4.7.1 Lisis celular:

Dependiendo la naturaleza de la muestra con la que se trabaja, existen múltiples metodologías de lisis celular. Tradicionalmente los métodos mecánicos han sido utilizados

para el procesamiento de tejidos, en la actualidad la mayoría de los laboratorios optan por una combinación de métodos mecánicos y químicos. Dentro de los métodos químicos, las soluciones basadas en detergentes muestran una gran utilidad, destacando por su capacidad para lisar las células y solubilizar proteínas. Por tanto, es preciso conocer las propiedades de cada solución existente en función del tipo del tejido, la localización de las moléculas a estudiar y las técnicas que se pretendan realizar consecutivamente. En la realización de nuestros estudios hemos usado dos soluciones de lisis:

- **Búfer de lisis RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay):** solución que tiene una gran capacidad de lisis celular y para solubilizar proteínas, siendo considerada un estándar en técnicas como el Western blotting. Su versatilidad se basa en la capacidad de mantener las estructuras proteicas en su estado nativo además de minimizar uniones inespecíficas de proteínas. Estas propiedades son complementadas con la posibilidad de incorporar inhibidores de proteasas y fosfatasas. Es posible utilizar RIPA cuando se pretenda solubilizar todo el extracto proteico de la muestra, o en los casos en los que las proteínas de interés se encuentren alojadas en membranas lipídicas, no obstante, este tampón es especialmente eficaz solubilizando proteínas localizadas en el núcleo y orgánulos como la mitocondria.

Buffer de lisis RIPA:		Buffer de lisis NP40:	
Reactivos:	Reactivos:	Concentración final:	Concentración final:
TRIS BASE	20 mM	TRIS -HCl	40 mM
NaCl	316 mM	NaCl	274 mM
EGTA	2 mM	EDTA	4 mM
SDS	0,2%	Glicerol	20%
Deoxicolato Sódico	2%	IGEPAL Ca-630	2%
Triton x-100	2%	Diluir en H ₂ O miliQ pH 7,4	
Diluir en H ₂ O miliQ pH 7,4			

Tabla 6. Composición de las soluciones de lisis RIPA y NP40.

- Búfer de lisis NP40: solución ampliamente utilizada para la extracción de proteínas citoplasmáticas y de membrana, la ausencia de surfactantes iónicos y la presencia de glicerol hace que este búfer de lisis no altere las interacciones entre proteínas y por consiguiente sea recomendado para ensayos de inmunoprecipitación.

A la hora de realizar nuestros experimentos, el búfer de lisis RIPA fue utilizado de forma general. Esta solución nos permite lisar los cultivos celulares a través de dos metodologías diferentes:

1. Los cultivos celulares son tripsinizados, resuspendidos en medio de cultivo y centrifugados (100 x g 5 min). El pellet resultante es lavado con PBS para eliminar restos del medio y centrifugado de nuevo. Una vez retirada la solución de lavado, el pellet es resuspendido en RIPA 1X hasta conseguir una solución homogénea.
2. Los cultivos celulares son lavados con PBS en el soporte de cultivo. Una vez retirada de forma cuidadosa la solución de lavado, 1 mL de RIPA 1X es añadido y extendido por la superficie de cultivo. Las células son despegadas con ayuda de un rascador y el lisado recogido y homogeneizado con una micropipeta.

Tampón fosfato salino (PBS):	
NaCl	137 mM
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
Diluir en H ₂ O miliQ pH: 7,42	

Tabla 7. Composición del medio PBS.

Estas variantes metodológicas se adaptaron a las necesidades de cada ensayo, siendo la segunda técnica utilizada siempre que fue posible. Tras la lisis celular, las muestras fueron sonicadas (20 kHz, 2 pulsos, 8 segundos) para asegurar una correcta disgregación de las membranas. Posteriormente, las muestras fueron depositadas en hielo durante media hora

y centrifugadas a 16000 x *g*, durante 30 min, a 4 °C, con el objetivo de sedimentar los restos celulares insolubles y extraer las proteínas localizadas en el sobrenadante. De forma rutinaria el sobrenadante resultante tras este paso es la base de los experimentos resumidos en este documento, en él se encuentran las proteínas pertenecientes a la fracción citosólica y de membrana. En experimentos concretos el pellet resultante tras la centrifugación de los lisados celulares fue solubilizado en Laemmli Buffer, procedimiento que posibilita el análisis de las proteínas asociadas al citoesqueleto celular.

4.7.2 Cuantificación de proteínas:

La concentración de proteína de todas las muestras empleadas en los diferentes estudios fue determinada utilizando el método del ácido bicinónico (BCA), el cual fue adquirido a través de un kit comercial: Pierce™ BCA Protein Assay ThermoFisher Scientific (Waltham, Estados Unidos). El Ensayo de la BCA fue desarrollado por Smith *et al.*, en 1985 y se basa en la coordinación de dos reacciones diferentes [366]. Inicialmente tiene lugar la reacción de Buiet, donde el Cu^{2+} , en un medio alcalino, es reducido a Cu^{1+} por las proteínas de la muestra. Posteriormente la asociación de dos moléculas de BCA con el Cu^{1+} produce una coloración púrpura. El complejo BCA/cobre es soluble en agua y presenta una relación lineal entre su absorbancia a 562nm y la concentración proteica de la muestra, esta característica nos permite determinar la concentración proteica de los lisados celulares al comparar los datos colorimétricos de los mismos con una recta patrón obtenida a partir de concentraciones conocidas de proteínas. Al contrario que los demás aminoácidos, la cisteína, tirosina y el triptófano tienen la capacidad de reducir los cationes de Cu^{2+} , favorecer la formación del complejo BCA/Cu y aumentar la coloración de la muestra. Este hecho es un factor que no debe ser tenido en cuenta en las cuantificaciones estándar ya que, en estas condiciones, la reducción del cobre es realizada mayoritariamente por el esqueleto de aminoácidos presentes en la muestra.

En el desarrollo de nuestros experimentos, las cuantificaciones de proteínas se llevaron a cabo a temperatura ambiente y realizando 4 mediciones por muestra. Para cada medición, se mezcló 12,5 μL de muestra con 100 μL de reactivo BCA (preparado inmediatamente antes según las especificaciones del fabricante). Tras una incubación de 15 min en oscuridad se

procedió a la lectura de la absorbancia a 562 nm en un lector de microplacas Gen5™ BioTek (Vermont, Estados Unidos). Los valores resultantes fueron entonces extrapolados a la curva estándar para calcular la concentración proteica de las muestras.

4.7.3 Inmunoprecipitación:

La inmunoprecipitación es una técnica derivada de la cromatografía en columna que nos permite aislar una proteína, o complejo proteico, estableciendo una interacción entre la misma y un soporte insoluble. Esta asociación es mediada a través de un anticuerpo preinmovilizado o no al soporte insoluble, el cual reconocerá la proteína de forma específica. En nuestros experimentos de inmunoprecipitación, la concentración y volumen de los extractos proteicos fueron igualados antes de introducir el anticuerpo y el soporte insoluble, siendo la concentración de proteínas ajustada a 1 µg/µL siempre que las condiciones experimentales lo permitieron. La concentración del anticuerpo de inmunoprecipitación varió entre 1 y 2 µg/mL, dependiendo de las características del mismo. Como soporte insoluble, se utilizaron bolitas de agarosa recubiertas por proteína A, proteína de la superficie de *Staphylococcus aureus* con gran afinidad por la cadena pesada de las inmunoglobulinas. La mezcla compuesta por el extracto proteico, las bolitas de agarosa y el anticuerpo fue incubada durante toda la noche, a 4 °C, en agitación constante. A la mañana siguiente, el complejo bolita-anticuerpo-proteína fue sedimentado por centrifugación y aislado del sobrenadante. Por último, el complejo de inmunoprecipitación fue lavado con PBS 3 veces, eliminando posibles uniones inespecíficas, y resuspendido en Laemmli buffer para su análisis por Western blotting.

4.7.4 Biotinilación de proteínas de la superficie celular:

La biotina es una vitamina con una gran afinidad para unirse a la avidina y estreptavidina. La interacción entre la biotina y estos polipéptidos es una de las uniones no covalentes con mayor estabilidad, permitiendo desarrollar múltiples técnicas de aislamiento y purificación de proteínas. La biotina es una molécula de bajo peso molecular (244 Da) que puede ser conjugada con otros elementos sin alterar su actividad biológica. Su conjugación con el éster N-hidroxisuccinimida (NHS) es comúnmente utilizada para la biotinilación de anticuerpos o proteínas de membrana, posibilidad que viene asociada a la capacidad del NHS para unirse

con los grupos NH_2 de las cadenas laterales de los residuos de lisina (K) y con el final de la cadena polipeptídica.

La biotilación de proteínas permite caracterizar de forma sencilla su expresión en la membrana citoplasmática, tanto en estado basal como tras la estimulación celular. En nuestro caso las células fueron cultivadas en placas de Petri hasta que alcanzaron una confluencia cercana al 90%. El día del experimento las células fueron lavadas tres veces con PBS atemperado a 4 °C (pH 8) y posteriormente incubadas 1 h con una solución de sulfo-NHS-LC-biotina (05 mg/mL). Esta incubación se desarrolló en un agitador orbital en presencia de hielo, siendo de gran importancia mantener las células refrigeradas para evitar la internalización de vesículas y la consecuente biotilación de proteínas intracelulares. Aunque esta posibilidad fue reducida con la adición de sulfato sódico al éster para formar sulfo-NHS-LC-biotina, modificación que confiere polaridad y carácter hidrosoluble a la molécula. Al término de la biotilación, el buffer fue retirado y los restos de biotina existente tamponados con una solución de Tris-Base (50 mM). Las células fueron lavadas 3 veces con PBS atemperado a 4 °C y lisadas con RIPA buffer 1X y con la ayuda de un rascador. El extracto celular fue sometido al procedimiento descrito anteriormente en el aislamiento de proteínas, siendo las muestras sonicadas y centrifugadas para precipitar la fracción insoluble. La concentración proteica del sobrenadante fue igualada en el caso de ser necesario y este fue incubado overnight con 30 μL de bolas de agarosa recubiertas de estreptavidina. Al día siguiente las bolas fueron aisladas mediante centrifugación, lavadas con PBS y resuspendidas en Laemmli Buffer. Este último paso permite eluir las proteínas biotiladas y prepararlas para ser analizadas mediante Western blotting.

4.8 Western blotting:

Desarrollada por Towbin y colaboradores en el año 1979 [367], esta técnica es una de las más extendidas en los estudios de biología celular y molecular, permitiendo identificar proteínas específicas albergadas dentro de un complejo macroproteico. Podemos dividir el Western blotting en cuatro fases: preparación de las muestras, electroforesis, transferencia a un soporte sólido y por último marcaje con anticuerpos y detección de las proteínas.

4.8.1 Preparación de las muestras para realizar Western blotting:

Dependiendo de los objetivos del experimento, las características de la proteína que se deseen estudiar o el anticuerpo de detección es posible establecer ciertas diferencias en la preparación de las muestras. En nuestro caso, la adicción del buffer Laemmli y la realización de un choque térmico (95 °C 5 min) preparan las proteínas de la muestra para desarrollar de forma exitosa las siguientes fases del Western blotting. El buffer Laemmli está compuesto por SDS, un detergente aniónico que desnatura las proteínas rompiendo los enlaces no covalentes y envolviendo la cadena peptídica con cargas negativas. La unión de las moléculas de SDS al polipéptido en una proporción de masas 1,4:1 otorga al segundo una carga negativa proporcional a su tamaño e iguala la densidad de carga de todos los polipéptidos de la muestra. Agentes reductores como el ditioneitol (DTT) o el β -mercaptoetanol son también utilizados en este buffer para promover la ruptura de puentes disulfuro intra e interproteicos. El desarrollo del choque térmico en compañía con estos agentes asegura la desnaturación de las proteínas, la ruptura de complejos multiproteicos y facilita la detección de los epítomos por parte de los anticuerpos. Por otro lado, el glicerol y el azul de bromofenol son incorporados al buffer para facilitar la ejecución de la electroforesis. El primero aumenta la densidad de la muestra facilitando su manejo en el medio acuoso donde se desarrolla la electroforesis, el segundo es un colorante aniónico que permite controlar visualmente la migración de las proteínas durante la electroforesis.

Buffer Laemmli:	
Trizma Base	70 mM
Glicerol	10%
Azul de bromofenol	0,002%
Dodecil sulfato sódico (SDS)	2%
H ₂ O miliQ	-
Ditioneitol (DTT) / β -mercaptoetanol	5%
pH 7,4	

Tabla 8. Composición del buffer Laemmli.

4.8.2 Electroforesis:

La electroforesis se fundamenta en la separación de las proteínas de la muestra según su tamaño al ser forzadas a viajar a través de un gel de acrilamida gracias al establecimiento de un campo eléctrico. Las proteínas, cargadas de forma negativa gracias al SDS, viajarán a través del gel hacia el polo positivo con una velocidad (V) relacionada a la carga neta de las mismas (Z), la fuerza del campo eléctrico a la que se ven sometidas (E) y la resistencia al avance o fricción (F), siendo esta última dependiente del tamaño y forma de las mismas.

$$V = \frac{(E \times Z)}{F}$$

Composición de los geles de acrilamida:				
% del gel	4% (10 mL)	8% (10 mL)	10% (10 mL)	12% (10 mL)
Acrilamida-Bisacrilamida (39:1)	1 mL	2,02 mL	2,5 mL	3 mL
Tris 1,5 M (pH 8,8)	-	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
Tris 0,5 M (pH 6,8)	2,5 mL	-	-	-
SDS (10%)	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Persulfato de amonio (AMPS)	10 mg	5 mg	5 mg	5 mg
TEMED	10 μ L	5 μ L	5 μ L	5 μ L
H ₂ O miliQ	6,4 mL	5,38 mL	4,9 mL	4,4 mL

Tabla 9. Composición de los geles de acrilamida elaborados para el desarrollo de la electroforesis.

En el desarrollo de nuestros experimentos se utilizaron geles de acrilamida discontinuos elaborados en el propio laboratorio. El sistema discontinuo dispone inicialmente un gel de carga, el cual presenta un pH ligeramente ácido y contiene un porcentaje de acrilamida-bisacrilamida del 4%. Este factor implica un tamaño de poro que permite que todas las proteínas viajen a la misma velocidad y se compacten en una pequeña franja antes de alcanzar el gel de separación. Posteriormente, se dispone el gel separador, el cual presenta un pH básico y contiene un porcentaje de acrilamida-bisacrilamida variable entre el 7% y el 15% en función de las proteínas que se quisieron identificar. Según varíe este porcentaje se

modificará la resistencia al avance de las proteínas, produciendo con ello perfiles de separación diferentes, factor que se debe tener muy en cuenta si se desea obtener una buena resolución en el revelado final.

Una vez cargadas las muestras en los pocillos del gel de carga, se programó un campo eléctrico de 30 mA por cada gel durante dos horas. En este tiempo, los geles estuvieron sumergidos en un tampón salino denominado tampón de electroforesis. Dentro de las funciones de este destacaremos su importancia para el desarrollo del campo eléctrico y para compactar las proteínas en la fase inicial del proceso. Los pocillos que quedaron vacíos se utilizaron para incluir una solución denominada estándar de proteínas coloreadas. Esta solución permite tener un control visual del perfil de separación del gel y del tamaño de las proteínas identificadas al finalizar el Western blotting.

Tampón de electroforesis (running buffer):	
Trizma Base	25 mM
SDS	0,1%
Glicina	252 mM
H ₂ O miliQ	

Tabla 10. Composición del running buffer.

4.8.3 Electrotransferencia:

Una vez terminada la electroforesis se procedió a transferir las proteínas del gel a un soporte sólido, donde las mismas sean más accesibles a los anticuerpos utilizados con posterioridad. Para ello utilizaremos membranas de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0,2 μm y un sistema de electrotransferencia semiseca. Dentro del sistema se disponen cuatro capas de papel de transferencia a ambos lados del gel de acrilamida y la membrana de nitrocelulosa. Esta estructura fue embebida en tampón de transferencia sin inundar la cubeta en ningún momento, permitiendo que la corriente pase de forma uniforme a través de todo el sistema. Además de permitir el establecimiento de la corriente, el tampón de transferencia estabiliza la estructura del gel, asegurando su integridad durante la transferencia y aumentando la resolución del revelado final. La electrotransferencia se desarrolló durante dos horas estableciendo una intensidad de corriente de 0,8 A/cm² de papel de transferencia.

Tampón de electrotransferencia (blotting buffer):	
Trizma Base	25 mM
Glicina	125 mM
Metanol	20%
H ₂ O miliQ	
pH 7.4	

Tabla 11. Composición del blotting buffer.

4.8.4 Bloqueo:

Con el objetivo de bloquear todos los espacios de la membrana de nitrocelulosa que hubieran quedado vacíos tras la electroforesis, se incubaron las membranas con solución de bloqueo durante dos horas a temperatura ambiente y en agitación moderada.

Solución de bloqueo (blocking buffer):	
BSA	10% p/v
Ácida sódica	0,02% p/v
TBST	
pH7,4	

Tabla 12. Composición del blocking buffer.

4.8.5 Incubación con anticuerpos:

La fiabilidad del Western blotting se asienta en la especificidad de los sucesivos anticuerpos frente a los epítomos hacia los que van dirigidos. Es importante recordar que para la realización de esta técnica es necesario que los epítomos se encuentren dentro de la secuencia lineal de la proteína, evitado el uso de anticuerpos que reconocen estructuras terciarias o cuaternarias. Previo a la incubación, los anticuerpos fueron diluidos en solución de bloqueo a la concentración recomendada por el fabricante. Una vez preparados, Las membranas se incubaron con anticuerpos primarios específicos en agitación constante y durante un tiempo variable (ver tabla 1), oscilando entre una hora a temperatura ambiente

y toda la noche a 4 °C. Al término de la incubación del primario, este se retiró y las membranas se lavaron con una solución de lavado (TBST) 6 veces durante cinco minutos cada vez. Estos lavados eliminan los restos del anticuerpo primario que hayan podido quedar, evitando posibles señales inespecíficas en el revelado final. Tras los lavados, las membranas se incubaron con anticuerpo secundario diluido 1:10000 en TBST durante una hora a temperatura ambiente y en agitación constante. En este estudio se han utilizado inmunoglobulina G específicas contra la región constante del anticuerpo primario (determinada por el animal de origen de este anticuerpo), las cuales estaban conjugadas a una peroxidasa de rábano picante (HRP). En otras ocasiones, principalmente en el procesamiento de las muestras procedentes de inmunoprecipitaciones, se utilizó el reactivo Clean Blot para detectar el anticuerpo primario. Este reactivo fue diluido (4:1000) en TBST e incubado durante una hora a temperatura ambiente en agitación constante. Al unirse únicamente a la estructura intacta de las inmunoglobulinas, el empleo de este reactivo disminuye la señal procedente del anticuerpo de inmunoprecipitación, el cual ha acompañado durante todo el proceso a las proteínas inmunoprecipitadas. Por último, se retiró el anticuerpo secundario o Clean Blot y se repitió el protocolo de lavado de las membranas para eliminar los restos de anticuerpo secundario que no se hubiera unido.

Solución de lavado (TBST):	
Trizma Base	20 mM
NaCl	137 mM
Tween 20	0,1%
H ₂ O miliQ	
pH 7,4	

Tabla 13. Composición del TBST.

4.8.6 Revelado:

Este proceso se inicia con la incubación de las membranas durante 5 min con el sustrato específico de la peroxidasa de rábano picante (SuperSignal™ West Dura). Al reaccionar la enzima con el sustrato el segundo es oxidado produciendo una quimioluminiscencia prolongada, la cual fue detectada por un escaner digital Li-Cor C-digit (Lincoln, Nebraska, Estados Unidos). Las imágenes resultantes se analizaron con el software Imagen J (NIH,

Bethesda, EEUU), siendo medida la intensidad de las bandas mediante densitometría.

4.9 Determinación de la asociación entre proteínas con tinción de plata:

De forma paralela a los ensayos de coimmunoprecipitación, se determinó la interacción proteína-proteína a través de la técnica de tinción de plata. En esta técnica los lisados celulares son incubados con bolitas de agarosa y un anticuerpo contra la proteína objetivo, siguiendo la metodología utilizada en la técnica de inmunoprecipitación. Tras este paso, las muestras son procesadas lavando las resinas de agarosa y añadiendo Laemmli buffer. Consecutivamente, se separaron las proteínas de la muestra a través de su electroforesis en un gel de acrilamida. Tras la electroforesis, los geles fueron fijados al sumergirse en una solución con etanol (50%) y ácido acético (10%) durante 30 minutos. con el objetivo de sensibilizarlos, los geles fueron incubados durante 15 min en un buffer compuesto por etanol (30%), tiosulfato sódico (12,7 mM) y acetato sódico (0,82 M). Posteriormente, los geles fueron lavados con agua destilada 3 veces durante 3 minutos cada vez. La tinción de plata se realizó a través de la incubación de los geles durante 20 min, en oscuridad y en una solución de nitrato de plata (12 mM). Tras la tinción, los geles fueron lavados con agua destilada y revelados incubándolos con una solución de carbonato sódico (2%) y formaldehído (37%), en vigorosa agitación, durante 2 minutos. Por último, los geles fueron incubados en una solución de parada, con EDTA- Na_2 (1,5%), y las bandas que coincidían con el peso molecular estimado de las proteínas de interés fueron extraídas y analizadas por el método de espectrometría de masas MALDITOF/TOF (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid).

4.10 Determinación de la $[\text{Ca}^{2+}]$ por métodos fluorimétricos:

4.10.1 Determinación de la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica mediante la sonda fura-2:

Fura-2/AM:

La sonda fura-2 acetoximetiléster (Fura-2/AM) es un fluoróforo de Ca^{2+} que fue descrito por primera vez en 1985 por Roger Tsien y sus colaboradores [368]. Desde entonces ha sido ampliamente utilizado para estudiar aquellos eventos fisiológicos en los que el ion Ca^{2+} se ve involucrado. Gracias a la presencia del grupo acetoximetiléster (AM), esta sonda es capaz de

penetrar la membrana celular y alcanzar el citoplasma de forma pasiva. Aquí, las esterasas citosólicas librarán el grupo éster impidiendo que atraviese de nuevo la membrana plasmática y la de los orgánulos celulares. La K_d del fura-2 para el Ca^{2+} es aproximadamente de 135 nM a 20 °C (pH 7,1-7,2) y de 224 nM a 37 °C (pH 7,8), característica que permite detectar variaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ del rango nanomolar [368]. Fura-2 también es capaz de unir otros iones divalentes como el Mn^{2+} , Sr^{2+} o el Zn^{2+} .

Fura-2 es un fluoróforo que presenta dos longitudes de excitación, una a 340 nm y otra a 380nm, y una longitud de onda de emisión a 505 nm. Cuando la sonda se asocia a Ca^{2+} su emisión a 505nm tras ser excitada a 340 nm aumenta, mientras que la emisión a 505nm tras ser excitada a 380 disminuye. Esta característica permite utilizar esta sonda como ratiométrica, obteniendo información de los máximos y mínimos de emisión a 505 nm y presentando una ratio de estos valores. Las variaciones en el ratio entre la fluorescencia emitida a 340 nm y 380 nm (340/380) son proporcionales a las variaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica hasta concentraciones del orden nM, evitando errores que puedan surgir de una distribución no homogénea de la sonda, carga deficiente del marcador y otros posibles artefactos originados durante la manipulación experimental [369]. Otra ventaja que ofrece el fura-2 es su punto isosbético (punto de isofluorescencia), el cual surge tras la excitación de la sonda a 360 nm. A esta longitud de onda el Fura-2 permite monitorizar cambios en la fluorescencia no relacionados con variaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]$, o apreciar el apagamiento de la fluorescencia cuando la molécula se une a metales pesados como el Mn^{2+} [290].

Carga del indicador:

Las líneas celulares fueron incubadas con la sonda fura-2/AM a una concentración de 2 μM en el medio de cultivo celular. Las plaquetas, sin embargo, fueron incubadas en un medio HBS suplementado con glucosa (1,8 mg/mL), BSA (1 mg/mL) y 1,8 mM de cloruro de calcio. La incubación se desarrolló durante 30 minutos a 37 °C en condiciones de oscuridad en ambos casos. Terminado el tiempo de incubación, el medio fue retirado y las células fueron lavadas con el tampón HBS descrito anteriormente. Una vez lavadas, las células adheridas a un cubreobjetos fueron montadas en una cubeta y mantenidas en medio HBS hasta comenzar el experimento.

Determinación de la $[Ca^{2+}]$ citosólica:

Para registrar la $[Ca^{2+}]$ citosólica y las variaciones de esta en las células estudiadas se utilizaron dos equipamientos. Para las células adherentes se utilizó un microscopio de fluorescencia invertido Nikon Eclipse Ti2 (Tokio, Japón) asociado a un sistema de adquisición y análisis de imágenes para microscopía (NIS Elements Imaging Software). En contraposición, los experimentos que implicaban la determinación de la $[Ca^{2+}]$ citosólica en células en suspensión fueron desarrollados utilizando un espectrofotómetro Cary Eclipse (Varian Ltd., Madrid, España). Durante el experimento, las células adherentes fueron perfundidas continuamente con medio HBS, siendo excitadas alternativamente a 340/380 nm con la luz de una lámpara de xenón pasada a través de un monocromador de alta velocidad Optoscan ELE 450 (Cairn Research, Reino Unido). Tras ser observada a través de un objetivo de aumento 40X, la emisión a 505 nm fue registrada usando una cámara digital refrigerada Zyla 4.2 (Andor, Reino Unido), y las imágenes procesadas con el software NIS-Elements AR. La ratio de la fluorescencia (F_{340}/F_{380}) fue calculado en todos los píxeles y fue presentada como $\Delta F_{340}/F_{380}$. Para tratar las células se utilizó el sistema de perfusión diluyendo los reactivos en HBS a la concentración final deseada. De forma paralela, un sistema de aspiración de vacío eliminó los volúmenes sobrantes. En el caso de los experimentos desarrollados en el espectrofotómetro, la medición de la $[Ca^{2+}]$ citosólica y su posterior calibrado se realizaron mediante el método desarrollado por Grynkiewicz en 1985, aplicando para ello la siguiente fórmula:

$$[Ca^{2+}]_{citosólica} = K_d * \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} * \frac{S_f}{S_b}$$

- K_d = Constante de disociación del fura-2 y el Ca^{2+} (214 nM a 37 °C).
- R = Ratio de la muestra (340/380).
- R_{min} = Ratio mínimo cuando la $[Ca^{2+}]$ es igual a 0.
- R_{max} = Ratio máximo en condiciones de saturación por Ca^{2+} del indicador.
- S_f = Emisión del fura-2 al ser excitado a 380.
- S_b = Emisión del fura-2 al ser excitado a 340.

Para obtener estos parámetros, cada experimento realizado en el espectrofluorímetro se calibró al término. Esta calibración requiere de la saturación del fura-2 con Ca^{2+} (S_b y el R_{\max}), proceso que se consiguió con la lisis celular, añadiendo una solución de Triton X-100 (0,05%), y la adición de Ca^{2+} a la cubeta hasta alcanzar una concentración de 10 mM. El S_f y el R_{\min} se obtuvieron añadiendo una solución con una concentración elevada de EGTA (500 mM) y de Trizma Base (3M), consiguiendo con ello que el fluoróforo quede libre de Ca^{2+} .

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

La liberación de Ca^{2+} inducida por TG se estimó calculando el área bajo la curva del incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica durante los 150 segundos posteriores a la adición del compuesto, siendo esta estimación corregida con la resta de la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica basal previa a la adición del estímulo y en ausencia de Ca^{2+} extracelular. Del mismo modo, la entrada de Ca^{2+} inducida tras la adición de CaCl_2 al medio extracelular se determinó calculando el área bajo la curva del incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]$ durante los 150 segundos posteriores a la adición de CaCl_2 , siendo esta estimación corregida con la resta de la $[\text{Ca}^{2+}]$ previa a su adicción. Para comparar la ratio del incremento exponencial de la fluorescencia del fura, las líneas fueron ajustadas a la ecuación $y = A(1 - e^{-K_1 T})e^{-K_2 T}$, siendo K_1 , la constante del crecimiento exponencial, comparada entre los grupos experimentales.

4.10.2 Entrada inducida por el fragmento OASF:

La utilización de la TG como elemento desencadenante de la entrada capacitativa no siempre se ajusta a las necesidades experimentales. Este reactivo produce un vaciamiento de los depósitos que no refleja ningún proceso fisiológico de señalización y provoca, tras un periodo de tiempo prologado, la muerte celular. La utilización de proteínas mutantes, que den lugar a dominantes negativos o elementos activados de forma anormal, ha sido de gran utilidad para estudiar tanto la entrada capacitativa como otros muchos eventos implicados en los procesos de señalización celular. Uno de estos mutantes es el fragmento OASF (ORAI1-activating small fragment), descrito por Martin Muik y sus colaboradores, este fragmento comprende la porción del extremo C terminal de STIM1 que abarca los aminoácidos 233-474 [141]. OASF es capaz de activar de forma específica y constitutiva los canales formados por la familia Orai, siendo esta capacidad fundamentada en la ausencia de

los segmentos adyacentes de la secuencia de STIM1, donde se alojan los dominios inhibitorios de esta proteína. Experimentalmente las células se transfectaron con el plásmido YFP-OASF durante cuarenta y ocho horas. Al término de este periodo, las células fueron incubadas con la sonda Fura-2/AM siguiendo las pautas descritas anteriormente. Por tanto, con la introducción de esta molécula no es necesario el uso de TG o la estimulación con agonistas fisiológicos para estudiar la entrada de Ca^{2+} a través de los canales Orai. La adición al medio de Ca^{2+} provoca la entrada del mismo a través de los canales Orai preactivados y el incremento en la ratio de fluorescencia del Fura-2.

4.10.3 Determinación de la fluorescencia del Fura-FFP18:

Sonda anfipática generada a partir del BAPTA FF6 que contiene una fracción piperazina y una cola hidrofóbica de doce carbonos alifáticos, la cual habilita la incorporación a la membrana plasmática de esta molécula. El fura-FFP18 fue diseñado por Vorndran y sus colaboradores con el objetivo de poder monitorizar las variaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]$ en los microdominios cercanos a la membrana plasmática [370]. Al realizar los experimentos con Fura-FFP18 las células fueron incubadas con 5 μM de esta sonda durante dos horas a 37 °C. Posteriormente se ejecutó la misma metodología que ha sido descrita anteriormente en el apartado destinado a la monitorización de la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica con el fura-2/AM. Sin embargo, las frecuencias de excitación en este caso fueron 335/364 nm y la fluorescencia emitida fue recogida a 490/502 nm respectivamente. La ratio de fluorescencia fue calculado en todos los pixels y los datos fueron representados como $\Delta F_{335}/F_{364}$.

Los indicadores fluorescentes de la concentración de Ca^{2+} , como el Fura2, han sido ampliamente utilizado en los estudios de biología celular durante las últimas tres décadas. Durante este tiempo, se han desarrollado multitud de esfuerzos para mejorar los indicadores ya existentes y para desarrollar nuevos fluoróforos. El resultado de estos esfuerzos son indicadores con propiedades radiométricas, con longitudes de onda más larga, con mejores relaciones entre señal y ruido y con la posibilidad de ser codificados genéticamente. Dentro de los fluoróforos de calcio codificados genéticamente (GECI), GCaMP ha ostentado una gran popularidad. Originalmente, GCaMP estaba formado por una proteína fluorescente verde (GFP) fusionada en el extremo N terminal a una cinasa de la

cadena ligera de la miosina de pollo (M13), y a un dominio calmodulina en su extremo C terminal. La unión del Ca^{2+} al dominio calmodulina permite un cambio conformacional y la interacción de esta región con la M13, este cambio en la estructura de la molécula provoca una alteración en la interfase entre la calmodulina y la proteína fluorescente, resultando en el aumento de la emisión de luz por la segunda [371]. El avance de las técnicas de ingeniería molecular ha permitido desarrollar indicadores de Ca^{2+} de gran especificidad que se basan en la fusión de las sondas codificadas genéticamente con proteínas relevantes en la homeostasis del calcio:

4.10.4 Determinación de la fluorescencia del G-GECO1.2-Orai1:

G-GECO1.2-Orai1 es una proteína de fusión compuesta por el canal Orai1 y una sonda de calcio fluorescente (G-GECO1.2) acoplada en su extremo amino. Este mutante opera de tal forma que la apertura del canal y la asociación del calcio al dominio CaM produce un aumento de su fluorescencia. Esta señal permite registrar la emisión intermitente correspondiente a la apertura de un canal Orai1 individual, abriendo la puerta para estudiar los procesos en los que Orai1 se ve involucrado, así como para caracterizar el patrón de actividad en cada uno de estos procesos [372].

Las células MDA-MB-231 fueron cultivadas sobre cubres y transfectadas con G-GECO1.2-Orai1. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, los cubres fueron montados en una cámara de perfusión y colocados en un microscopio de epifluorescencia invertido (Nikon – Tokio, Japón) con un sistema de adquisición y análisis de imagen NIS-Elements (Nikon – Tokio, Japón). Durante el experimento, las células fueron perfundidas de forma continua con HBS suplementado con 0,1% (p/v) BSA y 0,18% (p/v) glucosa. Las células fueron observadas con un objetivo de aumento 60X y excitadas utilizando un sistema de laser confocal (Melles-Griot, USA) a 488 nm. La fluorescencia del GECO fue recogida a 515 nm antes de la adicción de TG (basal: 100 μEGTA), durante 30 segundos después de la adicción de 1 μM de TG en ausencia de calcio extracelular y durante 30 segundos después de la adicción de 1 mM CaCl_2 . Las imágenes fueron analizadas utilizando el software ImagenJ (NIH, Bethesda, MD, USA).

4.10.5 Determinación de la fluorescencia del R-CEPIA1er:

El avance de las sondas codificadas genéticamente ha posibilitado el desarrollo y mejora de fluoróforos que permiten monitorizar la concentración de Ca^{2+} en espacios celulares muy específicos de forma individual y múltiple. Para monitorizar el contenido reticular de Ca^{2+} en el presente trabajo se utilizó la sonda R-CEPIA1er (*Calcium-measuring organelle-Entrapped Protein Indicator 1 ER*). Sonda que fue desarrollada por Suzuki y sus colaboradores tomando como referencia el indicador de calcio citosólico R-GECO1, e incorporando la secuencia de localización propia del retículo endoplasmático a esta sonda [373].

Las células MCF7 fueron transfectadas con el plásmido pCMV R-CEPIA1er y cultivadas sobre cubres. Cuarenta y ocho horas de transfección, las células fueron montadas en una cámara de perfusión y colocadas en un microscopio de epifluorescencia invertido (Nikon – Tokio, Japón) con un sistema de adquisición y análisis de imagen NIS-Elements (Nikon – Tokio, Japón). Durante el experimento, las células fueron perfundidas de forma continua con HBS atemperado y suplementado con 0,1% (p/v) BSA y 0,18% (p/v) glucosa. Un objetivo de aumento 100X se utilizó para visualizar las células y estas fueron excitadas con la luz de una lámpara de xenón pasada por un monocronador de alta velocidad Optoscan ELE 450 (Cairn Research, Reino Unido) a 562 nm. La fluorescencia emitida fue registrada a 641 nm utilizando una cámara digital refrigerada Zyla 4.2 (Andor, Reino Unido) y se utilizó el software NIS-Elements AR (Nikon - Tokyo, Japan) para almacenar y analizar las imágenes. Por último, con el objetivo de comparar la ratio de caída de la sonda R-CEPIA1er tras la adición de ionomicina y TG, las líneas fueron ajustadas a la ecuación $y=AK+B$ donde la K representaría la pendiente de la curva.

4.11 Determinación de la proliferación celular:

La capacidad proliferativa de las células se evaluó a través de un kit comercial que emplea el compuesto 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU). La BrdU es un análogo de la pirimidina que es incorporado en las cadenas de ADN sintetizadas en las células en división, en lugar de la timina. Tras la incubación con la BrdU y la fijación y permeabilización de las células, la BrdU será detectado por un anticuerpo primario específico. Este anticuerpo será detectado a su vez por un anticuerpo secundario conjugado con una peroxidasa de rábano picante.

Consecutivamente, al añadir el sustrato de esta enzima, la 3,3',5,5'-tetrametil bencidina, la reacción entre la enzima y el sustrato produce un producto soluble azul que puede ser leído por espectrofotometría a 655 nm. Por último, un ácido bloquea la reacción y torna la muestra de color amarillo pudiendo ser leída a 450 nm. La intensidad de la señal será proporcional a la cantidad de BrdU incorporado en las células lo que nos permitirá cuantificar la proliferación celular y comparar entre los diferentes grupos experimentales.

En nuestro estudio, las células MDA-MB-231 y Hs578T fueron transfectadas con los siARNs para bloquear la expresión de AC8 o con los controles negativos correspondientes, siguiendo el protocolo indicado con anterioridad. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células fueron levantadas y 5×10^3 células fueron sembradas en los pocillos de una placa de 96 pocillos, siendo cultivadas durante 24 o 48 horas. El día de la medición, las células se incubaron con la BrdU durante 4 horas a 37 °C y 5% de CO₂. Al término de la incubación, el medio de cultivo se desechó y se incubó cada pocillo con 100 µL de solución de fijación/desnaturalización durante 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez pasado este tiempo, el buffer fue desechado y se incubaron los pocillos con el anticuerpo primario anti BrdU (100 µL de la dilución final en cada pocillo) durante una hora con agitación suave a temperatura ambiente. Tras la incubación del primario se realizaron dos lavados con 300 µL de buffer de lavado cada uno. Después este paso, se incubaron los pocillos con el anticuerpo secundario anti-ratón HRP durante una hora con agitación suave a temperatura ambiente. Tras repetir de nuevo los lavados, se añadió a cada pocillo 100 µL de la solución del sustrato TMB y se midió la absorbancia a 650 nm a los 30 minutos de añadirlo, utilizando un lector de placas (Epoch, Biotek - Swindon, Reino Unido). Para terminar la reacción se añadió en cada pocillo 100 µL de "solución stop" y se midió la absorbancia a 450 nm.

4.12 Determinación de la migración celular:

Para evaluar la capacidad migratoria de las células se utilizó el ensayo de cierre de herida. Este protocolo se realizó siguiendo las recomendaciones de Liang y col. [374], aunque se adaptó a nuestras condiciones experimentales. Así, las células fueron sembradas en placas de seis pocillos hasta alcanzar una confluencia cercana al 80%. Cuando las condiciones experimentales lo demandaron, las células fueron transfretadas con siARNs para bloquear la

expresión de AC8 o con los controles negativos correspondientes, siguiendo el protocolo indicado con anterioridad. Una vez que las células ocuparon todo el espacio de cultivo formando una monocapa, se realizaron, con una pipeta de plástico estéril de 200 μ L, dos heridas en cada pocillo. Tras la realización de la herida, las células fueron lavadas con PBS estéril dos veces y posteriormente fueron cultivadas en DMEM suplementado con 1% SFB. Las fotos de la herida fueron tomadas con un microscopio invertido de campo claro Nikon Eclipse TS100 (Tokyo, Japan) a tiempo 0, a las 24 y a las 48 horas. Dependiendo de las condiciones experimentales, una vez realizada la herida las células fueron estimuladas con 10 mM Carbacol, 300 μ M 8-Br-cAMP o 1 μ M KT-5720. El procesamiento de las imágenes y la medición de las heridas fueron llevada a cabo utilizando el software Fiji ImageJ (NIH; Bethesda, MD, USA).

4.13 Determinación de la viabilidad celular:

Los experimentos de viabilidad celular tienen el objetivo de cuantificar la proporción de células vivas dentro de una población. Estas técnicas son comúnmente utilizadas para determinar el estado de salud de la población, monitorizar la respuesta de las células a un estímulo o determinar las condiciones experimentales óptimas. Los ensayos de viabilidad se fundamentan en parámetros como el número de divisiones celulares, la medición de la actividad metabólica, la concentración de ATP, o la permeabilidad de la membrana celular entre otros; además, suelen estar basados en la detección de productos fluorescentes, bioluminiscentes y colorimétricos. En el desarrollo de esta tesis se han utilizado el siguiente ensayo:

4.13.1 Detección de yoduro de propidio y calceína:

Uno de los aspectos a considerar al analizar la viabilidad celular es la pérdida de la integridad de la membrana. Multitud de ensayos de viabilidad se fundamentan en la habilidad de las membranas intactas para impedir la internalización o la difusión de ciertos marcadores. La mayor limitación de estos ensayos consiste en la incapacidad para distinguir entre células sanas y aquellas que no son viables pero se encuentran en un estado inicial de su degeneración.

El marcador de fluorescente calceina-AM es un sustrato lipofílico que atraviesa las membranas celulares de forma pasiva. Dentro de la célula, es hidrolizado por las esterasas para formar un producto polar (calceina) que emite una fuerte fluorescencia verde (longitud de onda de excitación: 490 nm, longitud de onda de emisión 515 nm), marcando el citoplasma de las células intactas. De esta forma, la utilización de este sustrato analiza tanto la integridad de las membranas como la actividad de las esterasas. La calceina presenta una baja sensibilidad a pH y buena retención, manteniendo la señal varias horas después de ser fijado. El yoduro de propidio es una tinción fluorescente que se intercala en las cadenas de ácidos nucleicos, pero que es incapaz de atravesar la membrana celular. En ausencia de células, el yoduro de propidio presenta un máximo de excitación/emisión de 500/625 nm, pero cuando este fluoróforo se asocia al ADN provoca un desplazamiento del máximo de excitación/emisión hasta 540/640 nm, con un notable aumento de la fluorescencia. Debido a su incapacidad para penetrar las membranas, este compuesto difundirá atravesando las estructuras desordenadas y marcará el núcleo de las células muertas.

En nuestras condiciones experimentales, las células MCF7 fueron cultivadas en placas de 6 pocillos hasta alcanzar una confluencia cercana al 80%. Una vez alcanzada, las células fueron transfectadas con los plásmidos de silenciamiento del TRPC6, dominante negativo del TRPC6, (shTRPC6 y DNTRPC6) o el correspondiente plásmido vacío siguiendo las pautas generales marcadas en los apartados anteriores. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se incubaron simultáneamente con 2 μ M de calceina-AM durante 45 minutos y 4 μ M de yoduro de propideo durante 30 minutos. Una vez terminada la incubación, ambos fluoróforos fueron visualizados utilizando un microscopio EVOSTM FL auto 2 imaging system (Invitrogen - Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Para recopilar la señal de la calceina, se excitaron las células a 430 nm y se recopiló la emisión a 542 nm, de forma simultánea y con el objetivo de visualizar el yoduro de propideo, se excitaron las células a 555 nm y se recopiló la señal a 624 nm. EL análisis de las imágenes y conteo de las células marcadas se llevó a cabo utilizando el software Fiji ImageJ (NIH; Bethesda, MD, USA).

4.14 Determinación de la muerte celular:

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programada con características bioquímicas y morfológicas únicas, el cual desarrolla un papel esencial en la homeostasis de los organismos multicelulares. Dentro de los eventos celulares que median la señal proapoptótica, es necesario destacar la activación de las caspasas, proceso que requiere la proteólisis de las procaspasas y la posterior asociación de las diferentes subunidades que conforman la enzima [375], [376]. La actividad de las caspasas está considerada como un marcador de los procesos apoptóticos, siendo posible determinar su actividad de forma relativamente sencilla tras la introducción de los diferentes sustratos fluorogénicos. En el desarrollo de esta tesis se han utilizado el siguiente ensayo:

4.14.1 Medición de la actividad de la caspasa-3:

La caspasa-3 es una caspasa ejecutora cuya actividad ha sido ampliamente descrita en el desarrollo de la apoptosis, independientemente del origen intrínseco o extrínseco del proceso [377]. Además, la actividad de la caspasa-3 es también relevante en la mediación de la apoptosis inducida por estrés reticular [378]. Para determinar la actividad de la caspasa-3 en nuestros estudios ha sido empleado un sustrato fluorogénico específico (secuencia: Z-Asp-Glu-Val-Asp-AFC). Conforme este sustrato es degradado por la encima, el fluoróforo AFC que lleva integrado experimenta un cambio en su espectro de emisión, pasando de emitir de azul a verde y permitiendo cuantificar la actividad de la encima en los extractos celulares aislados.

En nuestras condiciones experimentales, las células MCF7 fueron cultivadas en placas Petri hasta obtener una confluencia cercana al 80%. Una vez alcanzada, las células fueron transfectadas con los plásmidos de silenciamiento del TRPC6, dominante negativo del TRPC6 (shTRPC6 y DNTRPC6) o el correspondiente plásmido vacío siguiendo las pautas generales marcadas en los apartados anteriores. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células controles fueron tratadas con TPEN (200 μ M) durante treinta minutos. Al finalizar el tratamiento, todas las células fueron levantadas con la ayuda de un rascador y centrifugadas durante 5 minutos a 100 G. Tras retirar el medio y realizar un lavado con HBS atemperado, las células fueron lisadas con NP40 en ausencia de inhibidores de proteasas y suplementado

con 5 mM de DTT. Los lisados fueron sonicados, depositados en hielo durante media hora y centrifugados a 16000 x g durante treinta minutos. Posteriormente, la concentración de proteína de los sobrenadantes fue igualada tras ser cuantificada por el método de la BCA, y 250 μ L de sobrenadante fueron mezclados con 2 mL de NP40 (suplementado con DTT 5 mM y el sustrato de la caspasa-3 8,25 mM). Tras incubar la mezcla a 37 °C durante dos horas, la degradación del sustrato fue medida con un espectrofotómetro de fluorescencia (excitación/emisión 400/505 nm), y la actividad de la caspasa-3 calculada a partir de los datos de degradación del sustrato siguiendo las especificaciones del fabricante.

4.15 Determinación de la agregación plaquetaria:

Los ensayos de agregación plaquetaria permiten cuantificar la habilidad de los diferentes agonistas, o condiciones experimentales, para inducir o influenciar la activación in vitro de las plaquetas. Los ensayos de agregometría basados en la transmisión de luz se han considerado históricamente como una estándar en la medición de la activación plaquetaria. En estos experimentos, las plaquetas se resuspendieron en un medio ausente de ácido acetilsalicílico y se ajustó su concentración a 1×10^8 plaquetas/mL. Tras un periodo de reposo de 15 minutos, que atenúa el estado hiperreactivo de las plaquetas originado por su manipulación, la suspensión de plaquetas fue transferida a una cubeta, desarrollándose en esta una agitación constante, (1200 rpm) y manteniendo la temperatura a 37 °C; condiciones que imitan parcialmente las características del torrente sanguíneo. Paralelamente, un haz de luz atraviesa la muestra y es detectado por una fotocélula, permitiendo conocer la capacidad de transmisión de luz de la suspensión. Previo a la adición de cualquier agonista plaquetario, la suspensión homogénea de las plaquetas limita notablemente la transmisión de luz y la activación del fotoreceptor. Una vez que el agonista es añadido y da comienzo la asociación plaqueta-plaqueta, la transmisión de la luz es cada vez mejor, aumentando la señal recibida por el fotoreceptor en proporción al porcentaje de agregación presente en la muestra. Para desarrollar los experimentos de agregación mostrados en el presente documento se utilizó un equipo Chronolog Aggregometer (Havertown, Filadelfia, Estados Unidos) asociado a un procesador que elabora un registro gráfico a partir de los datos de la transmisión óptica detectada. En un experimento estándar, tras la adición del agonista se puede percibir una disminución en la transmisión de

luz por parte de la muestra, efecto que corresponde al cambio conformacional de las plaquetas en las etapas iniciales del proceso de activación. Seguidamente, las asociaciones plaqueta-plaqueta y la precipitación de los agregados permiten aumentar la señal óptica detectada y el aumento de la función.

4.16 Análisis estadístico:

En el análisis estadístico de los datos del presente estudio se evaluó 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 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, los cuales son 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:

Filamin A Modulates Store-Operated Ca²⁺ Entry by Regulating STIM1 (Stromal Interaction Molecule 1)–Orai1 Association in Human Platelets

Jose J. Lopez,* Letizia Albarrán,* Isaac Jardín, Jose Sanchez-Collado, Pedro C. Redondo, Nuria Bermejo, Regis Bobe, Tarik Smani, Juan A. Rosado

Objective—Here, we provide evidence for the role of FLNA (filamin A) in the modulation of store-operated calcium entry (SOCE).

Approach and Results—SOCE is a major mechanism for calcium influx controlled by the intracellular Ca²⁺ stores. On store depletion, the endoplasmic reticulum calcium sensor STIM1 (stromal interaction molecule 1) redistributes into puncta at endoplasmic reticulum/plasma membrane junctions, a process supported by the cytoskeleton, where it interacts with the calcium channels; however, the mechanism for fine-tuning SOCE is not completely understood. Our results demonstrate that STIM1 interacts with FLNA on calcium store depletion in human platelets. The interaction is dependent on the phosphorylation of FLNA at Ser²¹⁵² by the cAMP-dependent protein kinase. Impairment of FLNA phosphorylation and knockdown of FLNA expression using siRNA increased SOCE in platelets. Similarly, SOCE was significantly greater in FLNA-deficient melanoma M2 cells than in the FLNA-expressing M2 subclone A7. Expression of FLNA in M2 cells attenuated SOCE, an effect prevented when the cells were transfected with the nonphosphorylatable FLNA S2152A mutant. Transfection of M2 cells with the STIM1(K684,685E) mutant reduced the STIM1–FLNA interaction. In platelets, attenuation of FLNA expression using siRNA resulted in enhanced association of STIM1 with the cytoskeleton, greater STIM1–Orai1 interaction, and SOCE. Introduction of an anti-FLNA (2597–2647) antibody attenuated the STIM1–FLNA interaction and enhanced thrombin-induced platelet aggregation.

Conclusions—Our results indicate that FLNA modulates SOCE and then the correct platelet function, by fine-tuning the distribution of STIM1 in the cytoskeleton and the interaction with Orai1 channels.

Visual Overview—An online [visual overview](#) is available for this article. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38:386-397. DOI: 10.1161/ATVBAHA.117.310139.)

Key Words: calcium signaling ■ filamins ■ ion channel ■ phosphorylation ■ stromal interaction molecule 1

Store-operated calcium entry (SOCE) is a major mechanism for calcium influx triggered by depletion of the intracellular Ca²⁺ stores, a phenomenon that is sensed by the proteins of the STIM family, with a predominant role of the STIM1 (stromal interaction molecule 1).¹ STIM1 is a protein with a single transmembrane domain located in the endoplasmic reticulum (ER),² the lysosomal like acidic Ca²⁺ stores,³ and the plasma membrane.^{4,5} On Ca²⁺ store depletion, that is, by inhibition of the Ca²⁺-ATPase SERCA using thapsigargin, ER-resident STIM1 forms oligomers and distributes into puncta at the ER/plasma membrane (PM) junctions.^{6–9} Activation of Ca²⁺ release-activated channels (CRAC) requires that STIM1 undergoes a conformational change from a closed to an extended state, which facilitates the communication with the channels.¹⁰ Redistribution of STIM1 into puncta involves the association with the cytoskeleton and movement along the

microtubules.¹¹ Furthermore, maneuvers aimed at disorganizing or stabilizing the cytoskeleton have resulted in impairment of the STIM1–Orai1 interaction and SOCE.^{12,13}

FLNA (Filamin A) is a 2647-amino acid-long actin-cross-linking protein, with 2 N-terminal actin-binding domains followed by 24 immunoglobulin-like repeats.¹⁴ FLNA is mostly located in the membrane cytoskeleton, underneath the PM, where it has been found to regulate a variety of cytoskeleton-related processes, including receptor clustering and cross talk among different receptors and the actin cytoskeleton.¹⁴ FLNA has been found to be phosphorylated by PKA (protein kinase A),¹⁵ and FLNA phosphorylation at Ser²¹⁵², located in the Ig20 repeat, by PKA is essential for many cellular functions, such as cytoskeleton remodeling, cell migration, and platelet aggregation.^{16–18} Mouse models with deficient expression of FLNA have been found to show platelets that fail to spread, have

Received on: August 19, 2017; final version accepted on: December 13, 2017.

From the Department of Physiology, University of Extremadura, Cáceres, Spain (J.J.L., L.A., I.J., J.S.-C., P.C.R., J.A.R.); Department of Hematology, Hospital San Pedro de Alcantara, Cáceres, Spain (N.B.); INSERM Unité Mixte de Recherche-Santé 1176, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre, France (R.B.); and Department of Medical Physiology and Biophysics, Institute of Biomedicine of Seville, University of Seville, Spain (T.S.).

*These authors contributed equally to this article.

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://atvb.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/ATVBAHA.117.310139/-DC1>. Correspondence to Juan A. Rosado, DVM, PhD, Department of Physiology, University of Extremadura, 10003-Cáceres, Spain. E-mail jarosado@unex.es © 2017 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol is available at <http://atvb.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/ATVBAHA.117.310139

Nonstandard Abbreviations and Acronyms	
FLNA	filamin A
PKA	protein kinase A
SOCE	store-operated calcium entry
STIM1	stromal interaction molecule 1

decreased α -granule secretion and protein tyrosine phosphorylation, and exhibit hyperaggregability and thrombocytopenia because of platelet loss,^{19,20} which indicates that FLNA plays a functional role in platelets.

Here, we have investigated the possible function of FLNA on the STIM1–Orai1 interaction and SOCE. We have found that on Ca^{2+} store depletion, STIM1 interacts with FLNA in human platelets in a Ca^{2+} -dependent manner, which requires phosphorylation at FLNA Ser²¹⁵². FLNA expression knock-down results in clustering of STIM1 in the cytoskeletal fraction and enhancement of STIM1–Orai1 interaction, as well as SOCE and platelet function. These findings indicate that FLNA plays an essential role in the cross talk between STIM1 and Orai1 and modulates SOCE, avoiding Ca^{2+} overload, and then ensuring a correct platelet function.

Materials and Methods

Materials and Methods are available in the online-only Data Supplement.

Results

Identification of FLNA as a New STIM1-Associated Protein

To ascertain whether FLNA is associated with STIM1 on Ca^{2+} store depletion, human platelets were stimulated with 1 $\mu\text{mol/L}$ thapsigargin in the presence of 1 mmol/L extracellular Ca^{2+} or left untreated and lysed after 30 seconds. Whole-cell lysates were precleared with protein A-agarose and immunoprecipitated with anti-STIM1 antibody. We identified a band >150 kDa whose association with STIM1 was modified after treatment with thapsigargin with apparent molecular mass of ≈ 280 kDa (Figure 1A). The 280-kDa band was analyzed by MALDI TOF/TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight) mass spectrometry at the Biotechnology National Center (Madrid, Spain) yielding the results presented in the Table. The protein with the highest score was identified as FLNA, and the score provided for the remaining proteins was relatively low; hence, we analyzed the FLNA–STIM1 interaction.

FLNA Coimmunoprecipitates With STIM1 in a Ca^{2+} -Dependent Manner

Immunoprecipitation and subsequent Western blotting were conducted in platelets suspended in a medium containing 1 mmol/L Ca^{2+} and in platelets heavily loaded with dimethyl-BAPTA (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-*N,N,N,N*-tetraacetic acid), to prevent Ca^{2+} , but not store depletion, -dependent signals, that were suspended in a Ca^{2+} -free medium (125 $\mu\text{mol/L}$ EGTA added). Platelets were stimulated with thapsigargin or left untreated. The analysis revealed the presence of FLNA in resting BAPTA-loaded and control cells (Figure 1B, top; n=6).

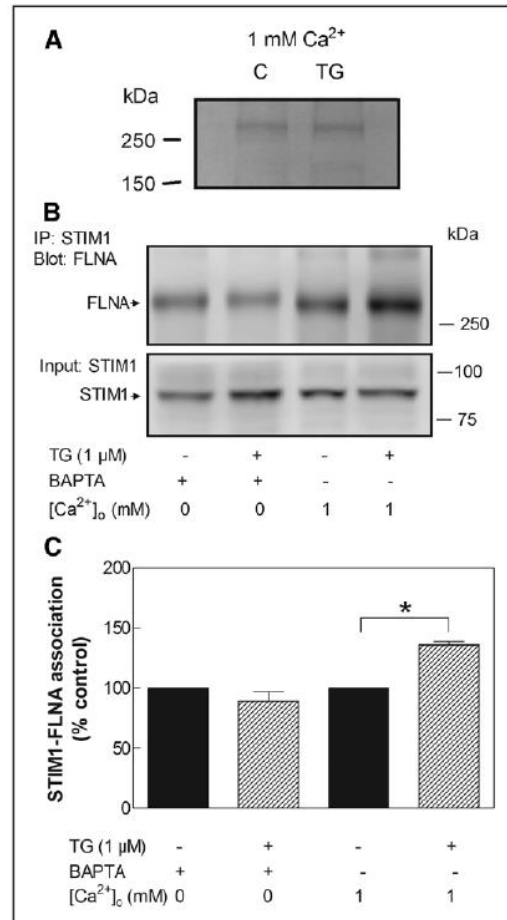


Figure 1. FLNA (filamin A) coimmunoprecipitates with STIM1 (stromal interaction molecule 1) in a Ca^{2+} -dependent manner. **A**, Human platelets were treated with 1 $\mu\text{mol/L}$ thapsigargin (TG) for 30 s and lysed. Platelet lysates were precleared by incubation for 1 h with protein A-agarose and then were immunoprecipitated with anti-STIM1 antibody. Immunoprecipitated proteins were separated by SDS/PAGE followed by silver staining of the gel as described in the Materials and Methods section in the online-only Data Supplement. Positions of molecular-mass markers are shown on the left. **B** and **C**, Platelets were loaded with dimethyl BAPTA or left untreated and suspended in a Ca^{2+} -free medium ($[\text{Ca}^{2+}]_o=0$ mmol/L) or a medium containing 1 mmol/L Ca^{2+} , as indicated. Cells were then stimulated with 1 $\mu\text{mol/L}$ TG for 30 s or the vehicle and then lysed. Platelet lysates were immunoprecipitated with anti-STIM1 antibody, and proteins were separated by SDS/PAGE followed by Western blotting with anti-FLNA antibody (**B**, top). Membranes were reprobed with anti-STIM1 antibody (**B**, bottom) as described in the Materials and Methods section in the online-only Data Supplement. Positions of molecular-mass markers are shown on the right. **C**, Bar graphs represent the quantification of STIM1–FLNA coimmunoprecipitation. Values are mean \pm SEM of 6 independent experiments. * $P<0.05$, Student *t* test) compared with the STIM1–FLNA association in resting cells.

In cells suspended in a medium containing 1 mmol/L Ca^{2+} , coimmunoprecipitation of STIM1 and FLNA was significantly enhanced by 40% on treatment with thapsigargin (Figures 1B and 1C; $P<0.05$; n=6). By contrast, in BAPTA-loaded cells thapsigargin was unable to increase the STIM1–FLNA interaction (Figure 1B and 1C; $P<0.05$; n=6), which indicates that the STIM1–FLNA association requires rises in $[\text{Ca}^{2+}]_o$. Reprobing of the membranes with anti-STIM1 antibody confirmed a similar content of this protein in all lanes (Figure 1B, bottom).

Table. Protein Identification by MALDI-TOF Mass Spectrometry of the 280-kDa Band

	Accession	Mass	Score	Description
1	P21333	283301	763	Filamin-A OS=Homo sapiens GN=FLNA PE=1 SV=4
2	Q14315	293407	56	Filamin-C OS=Homo sapiens GN=FLNC PE=1 SV=3
3	P50990	60153	44	T-complex protein 1 subunit theta OS=Homo sapiens GN=CCT8 PE=1 SV=4
4	P49642	50327	41	DNA primase small subunit. OS=Homo sapiens GN=PRIM1 PE=1 SV=1
5	Q7Z406	228701	39	Myosin-14 OS=Homo sapiens GN=MYH14 PE=1 SV=2
6	Q9Y490	271766	39	Talin-1 OS=Homo sapiens GN=TLN1 PE=1 SV=3
7	Q96PX9	141576	39	Pleckstrin homology domain- containing family G member 4B OS=Homo sapiens GN=PLEKHG4B PE=2 SV=4
8	Q9H9G7	98495	37	Protein argonaute-3 OS=Homo sapiens GN=AGO3 PE=1 SV=2
9	Q9HCK5	98175	36	Protein argonaute-4 OS=Homo sapiens GN=AGO4 PE=1 SV=2
10	Q96EK9	38820	36	Protein KTI12 homolog OS=Homo sapiens GN=KTI12 PE=1 SV=1
11	P26196	54781	35	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6 OS=Homo sapiens GN=DDX6 PE=1 SV=2
12	Q9HCX3	77450	34	Zinc finger protein 304 OS=Homo sapiens GN=ZNF304 PE=2 SV=2
13	Q9NQ75	87888	34	Cas scaffolding protein family member 4 OS=Homo sapiens GN=CASS4 PE=1 SV=2
14	P05423	44539	34	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC4 OS=Homo sapiens GN=POLR3D PE=1 SV=2
15	Q7RTP6	225297	32	Protein-methionine sulfoxide oxidase MICAL3 OS=Homo sapiens GN=MICAL3 PE=1 SV=2

GN indicates gene name; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight; OS, organism name; PE, protein existence; and SV, sequence version.

FLNA–STIM1 Interaction Requires Phosphorylation of FLNA at Serine 2152

FLNA phosphorylation at residue 2152 has been reported to play a crucial role in its biological functions.^{21–23} It is well recognized that FLNA can be phosphorylated at Ser²¹⁵² by PKA,^{15,24} a relevant event for its function.^{18,25} To investigate whether phosphorylation

at Ser²¹⁵² is required for the STIM1–FLNA interaction, we first explored whether Ca²⁺ store depletion is able to induce FLNA phosphorylation and whether this event is Ca²⁺ dependent, as for the STIM1–FLNA interaction (see above). As shown in Figure 2A (top) and 2C, thapsigargin modifies FLNA phosphorylation at Ser²¹⁵² in a time-dependent manner. An increase in FLNA phosphorylation was detected after 10 seconds of treatment, which reached a maximum within 30 seconds with a 1.44±0.04 (SEM)-fold increase and then decreased, reaching the resting level after 120 seconds of stimulation. In BAPTA-loaded cells, thapsigargin was unable to induce FLNA phosphorylation at Ser²¹⁵², which strongly supports that this event requires changes in [Ca²⁺]_i (Figures 2B and 2C; *P*<0.05; *n*=6). Membranes were reprobbed with anti-β-actin antibody for protein loading control (Figures 2A and 2B, bottom).

We have further explored whether FLNA phosphorylation at Ser²¹⁵² evoked by store depletion is dependent on PKA, as previously reported under other conditions,²⁴ by using KT-5720, which impairs PKA activation in human platelets.²⁶ As depicted in Figures 2D and 2F, preincubation of platelets for 30 minutes at 37°C with 1 μmol/L KT-5720 abolished thapsigargin-induced FLNA phosphorylation at least during 120 seconds (*P*<0.05; *n*=6). By contrast, inhibition of the brefeldin A–sensitive guanine nucleotide-exchange 2 has been found to lead to FLNA phosphorylation; hence, we have explored the effect of brefeldin A on FLNA Ser²¹⁵² phosphorylation in human platelets. As depicted in Figures 2E and 2F, treatment with brefeldin A (100 μmol/L) for 60 minutes significantly enhanced FLNA phosphorylation at Ser²¹⁵² both in nonstimulated cells and in cells stimulated with thapsigargin for 10, 30, and 60 seconds (*P*<0.05).

Next, we explored whether phosphorylation at Ser²¹⁵² is relevant for the association between FLNA and STIM1. As shown in Figures 3A and 3B, treatment of human platelets with KT-5720 abolished the STIM1–FLNA interaction evoked by thapsigargin without modifying the association at rest (Figures 3A and 3B; *P*<0.05; *n*=6). These findings strongly support that phosphorylation at Ser²¹⁵² is a prerequisite for the interaction of FLNA with STIM1.

As expected, preincubation of human platelets with KT-5720 abolished the coimmunoprecipitation of FLNA phosphorylated with STIM1 (Figures 3C and 3D; *P*<0.05; *n*=6).

Phosphorylation of FLNA at Serine 2152 Modulates Store-Operated Ca²⁺ Entry

Because FLNA phosphorylated at Ser²¹⁵² associates with STIM1 on store depletion, we have explored its role in SOCE. As shown in Figure 3E, treatment of platelets with thapsigargin in a Ca²⁺-free medium resulted in a prolonged elevation of [Ca²⁺]_i, because of Ca²⁺ release from intracellular stores. The subsequent addition of Ca²⁺ (1 mmol/L) to the external medium induced a sustained increase in [Ca²⁺]_i, indicative of SOCE. Preincubation with KT-5720 was unable to alter thapsigargin-evoked Ca²⁺ release from the stores but significantly enhanced SOCE by 45% (the integrals of the rise in [Ca²⁺]_i after the addition of CaCl₂ were 74072±6442 and 107404±1750 nM·s in the absence and presence of KT-5720; Figure 3F; *P*<0.05). These findings suggest that impairment of the association between STIM1 and FLNA, by dephosphorylation of

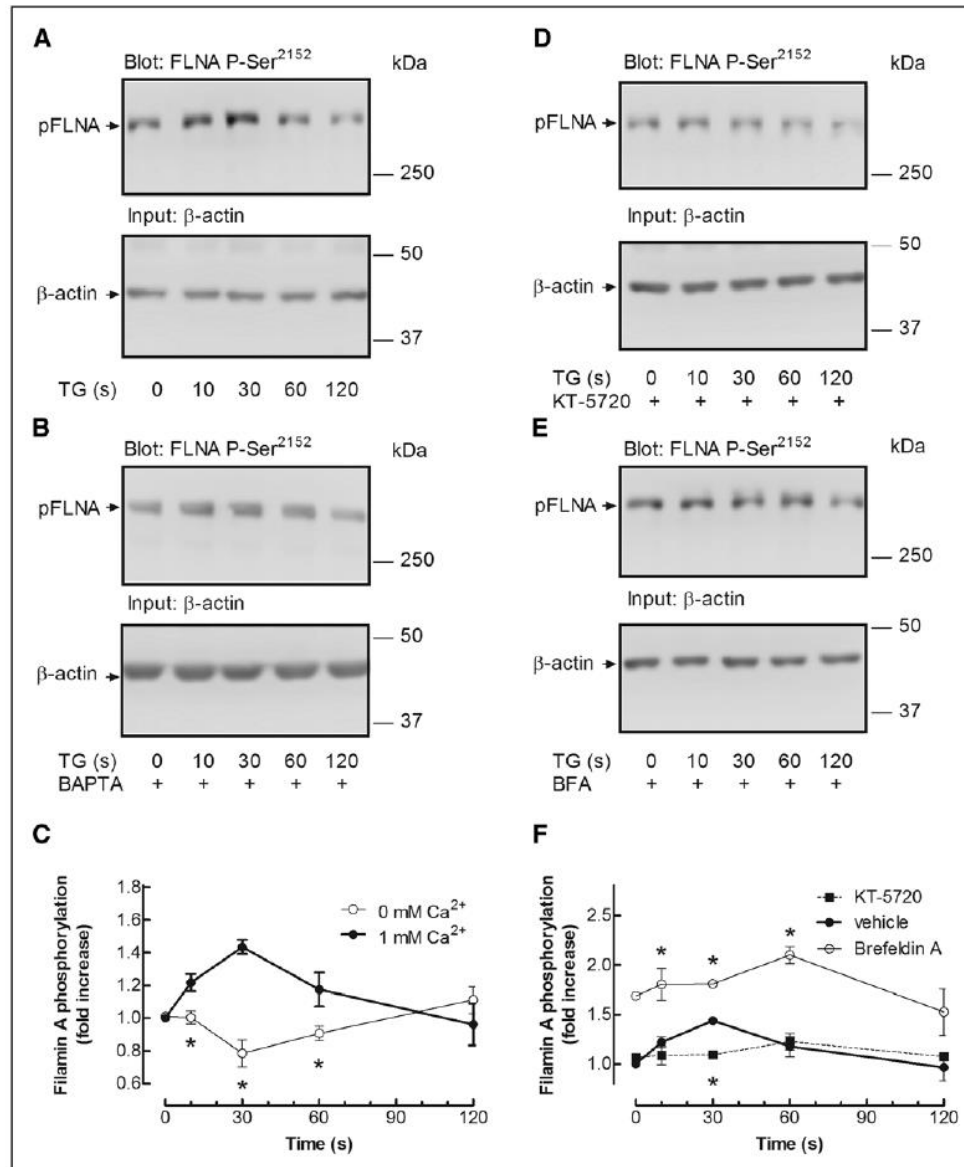


Figure 2. Phosphorylation of FLNA (filamin A) at serine 2152 is Ca²⁺- and PKA-dependent process. **A–C**, Platelets were loaded with dimethyl BAPTA (**B**) or left untreated (**A**) and suspended in a Ca²⁺-free medium (**B**) or a medium containing 1 mmol/L Ca²⁺ (**A**). Cells were then stimulated with 1 μmol/L thapsigargin (TG) for various periods of time (10–120 s) and lysed. Proteins were separated by SDS/PAGE followed by Western blotting with anti-phospho-FLNA (FLNA P-Ser²¹⁵²) antibody (**top**) or anti-β-actin antibody (**bottom**) as described in the Materials and Methods section in the online-only Data Supplement. Positions of molecular-mass markers are shown on the right. **C**, Graph represents the quantification of FLNA phosphorylation. Values are mean±SEM of 6 separate experiments. **P*<0.05 (ANOVA combined with the Dunnett test) compared with FLNA phosphorylation in cells not loaded with BAPTA. **D–F**, Platelets were pretreated at 37°C for 30 min with 1 μmol/L KT-5720 (**D**) or for 60 min with 100 μmol/L brefeldin A and then stimulated with 1 μmol/L TG for various periods of time (10–120 s) in the presence of 1 mmol/L extracellular Ca²⁺ and lysed. Proteins were separated by SDS/PAGE followed by Western blotting with anti-phospho-FLNA (pSer2152) antibody (**top**) or anti-β-actin antibody (**bottom**) as described in the Materials and Methods section in the online-only Data Supplement. Positions of molecular-mass markers are shown on the right. **F**, Graph represents the quantification of FLNA phosphorylation. Values are mean±SEM of 6 separate experiments. **P*<0.05 (ANOVA combined with the Dunnett test) compared with FLNA phosphorylation in cells treated with vehicle.

the latter, results in a significant increase in SOCE. To further explore the role of FLNA phosphorylation at Ser²¹⁵² on SOCE, we tested the effect of brefeldin A. As shown in Figure 3E, platelet treatment with brefeldin A significantly attenuated SOCE without having any effect on thapsigargin-induced Ca²⁺ release, which further supports the role of FLNA phosphorylation at Ser²¹⁵² on the activation of SOCE (the integral of the

rise in [Ca²⁺]_i after the addition of CaCl₂ in the presence of brefeldin A was 62 208±3066 nM·s; Figure 3F; *P*<0.05; n=6).

FLNA Plays a Relevant Role in the Modulation of Store-Operated Ca²⁺ Entry

The use of KT-5720 and brefeldin A provides indirect evidence for the involvement of FLNA on SOCE. Hence, we

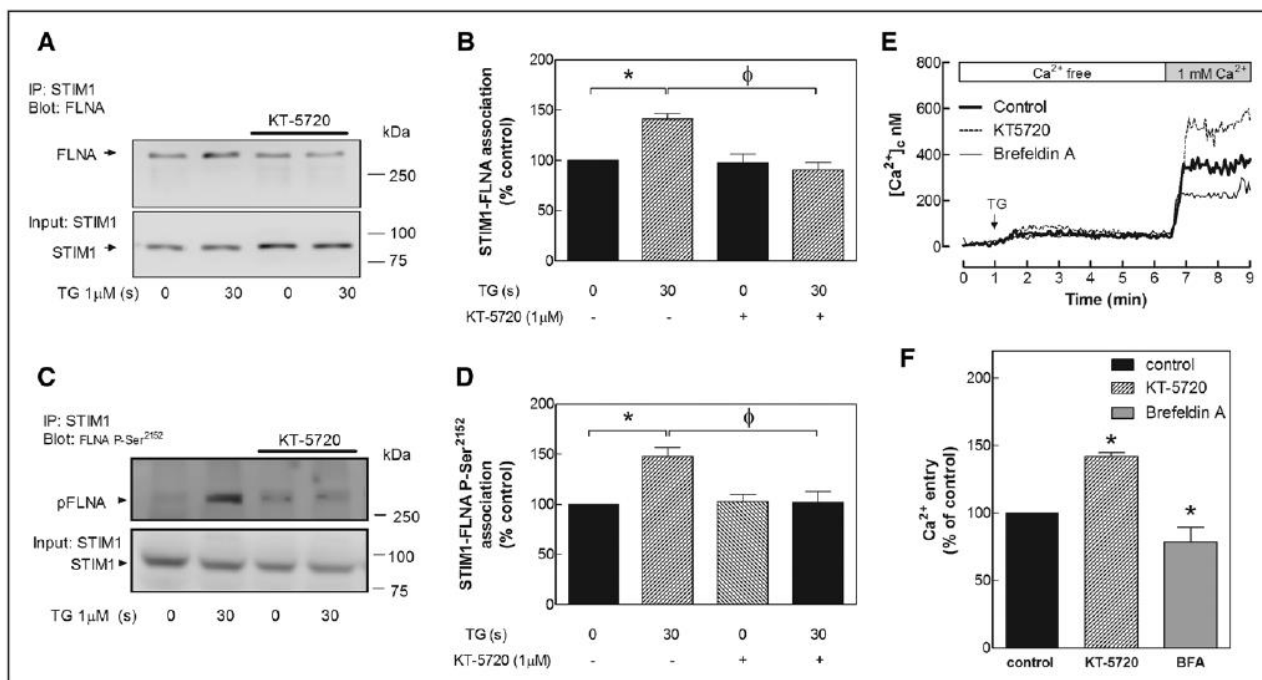


Figure 3. FLNA (filamin A) phosphorylation at serine 2152 is essential for its interaction with STIM1 (stromal interaction molecule 1) and the modulation of store-operated Ca^{2+} entry. **A** and **B**, platelets were pretreated for 30 min with 1 $\mu\text{mol/L}$ KT-5720 at 37°C or the vehicle in a medium containing 1 mmol/L Ca^{2+} . Cells were then stimulated with 1 $\mu\text{mol/L}$ thapsigargin (TG) for 30 s or the vehicle and then lysed. Platelet lysates were immunoprecipitated with anti-STIM1 antibody, and proteins were separated by SDS/PAGE followed by Western blotting with anti-FLNA antibody (**A, top**). Membranes were reprobed with anti-STIM1 antibody (**A, bottom**) as described in the Materials and Methods section in the [online-only Data Supplement](#). Positions of molecular mass markers are shown on the **right**. **B**, Bar graphs represent the quantification of STIM1-FLNA coimmunoprecipitation. Values are mean \pm SEM of 6 independent experiments. * $P < 0.05$ compared with the STIM1-FLNA association in resting cells and ^φ $P < 0.05$ compared with the STIM1-FLNA association in cells not treated with KT-5720 (ANOVA combined with the Dunnett test). **C** and **D**, Platelets were pretreated for 30 min with 1 $\mu\text{mol/L}$ KT-5720 or the vehicle in a medium containing 1 mmol/L Ca^{2+} . Cells were then stimulated with 1 $\mu\text{mol/L}$ TG for 30 s or the vehicle and then lysed. Platelet lysates were immunoprecipitated with anti-STIM1 antibody followed by Western blotting with antiphospho-FLNA (pSer2152) antibody (**C, top**). Membranes were reprobed with anti-STIM1 antibody (**C, bottom**) as described in the Materials and Methods section in the [online-only Data Supplement](#). Positions of molecular-mass markers are shown on the **right**. **D**, Bar graphs represent the quantification of STIM1-phospho-FLNA coimmunoprecipitation. Values are mean \pm SEM of 6 independent experiments. * $P < 0.05$ compared with the STIM1-phospho-FLNA association in resting cells and ^φ $P < 0.05$ compared with the STIM1-phospho-FLNA association in cells not treated with KT-5720 (ANOVA combined with the Dunnett test). **E**, Fura-2-loaded human platelets were preincubated for 30 min with 1 $\mu\text{mol/L}$ KT-5720, for 60 min with 100 $\mu\text{mol/L}$ brefeldin A or the vehicle at 37°C . Cells were then stimulated with TG (1 $\mu\text{mol/L}$) in a Ca^{2+} -free medium (125 $\mu\text{mol/L}$ EGTA added), and 5½ min later, CaCl_2 (final concentration 1 mmol/L) was added to the medium to initiate Ca^{2+} entry. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was monitored as described in the Materials and Methods section in the [online-only Data Supplement](#). Traces are representative of 6 independent experiments. **F**, Bar graphs indicating the percentage of Ca^{2+} entry under the different conditions relative to their control (vehicle was added). Ca^{2+} entry was determined as described in the Materials and Methods section in the [online-only Data Supplement](#). Values are mean \pm SEM; significant values indicate differences compared with TG-treated cells in the absence of inhibitors. * $P < 0.05$ (ANOVA).

have more directly evaluated the role of FLNA in SOCE by using interference RNA-based technology. siRNA has previously been proven to be an efficient technique for silencing the expression of platelet proteins.²⁷ In human platelets, transfection with FLNA siRNA significantly attenuated the expression of FLNA at the protein level after 24 hours (Figure 4A; $P < 0.05$; $n = 3$). To explore the role of FLNA on SOCE, platelets were transfected with FLNA siRNA, scramble target sequence (siRNA A), or left untreated. As shown in Figure 4B, the resting, as well as thapsigargin-evoked Ca^{2+} release from the stores, was not affected by any of the experimental maneuvers (Figures 4B and 4C); however, attenuation of FLNA expression significantly enhanced SOCE (the integrals of the rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ after the addition of CaCl_2 were 146748 ± 20634 , 67548 ± 12357 and 61796 ± 10092 nM·s in cells transfected with FLNA siRNA, siRNA A, or left untreated, respectively; Figures 4B and 4D; $P < 0.05$; $n = 6$).

These observations provide evidence for a relevant role of FLNA in the modulation of SOCE.

FLNA Modulates the Location of STIM1 in the Cytoskeletal Fraction and the Interaction With Orai1

Because FLNA is a cytoskeletal protein, we have explored whether it modulates the association of STIM1 with the platelet cytoskeleton. As shown in Figure 5A, attenuation of FLNA expression significantly enhanced the location of STIM1 in the cytoskeletal fraction ($P < 0.05$; $n = 6$). Consistent with this, the expression of STIM1 in the cytosolic and membrane fraction was reduced in cells transfected with FLNA siRNA (Figure 5B; $P < 0.05$; $n = 6$). These findings indicate that FLNA modulates the association of STIM1 with the cytoskeleton. As we have previously reported that the cytoskeleton plays a relevant role in the interaction between STIM1 and Orai1,¹²

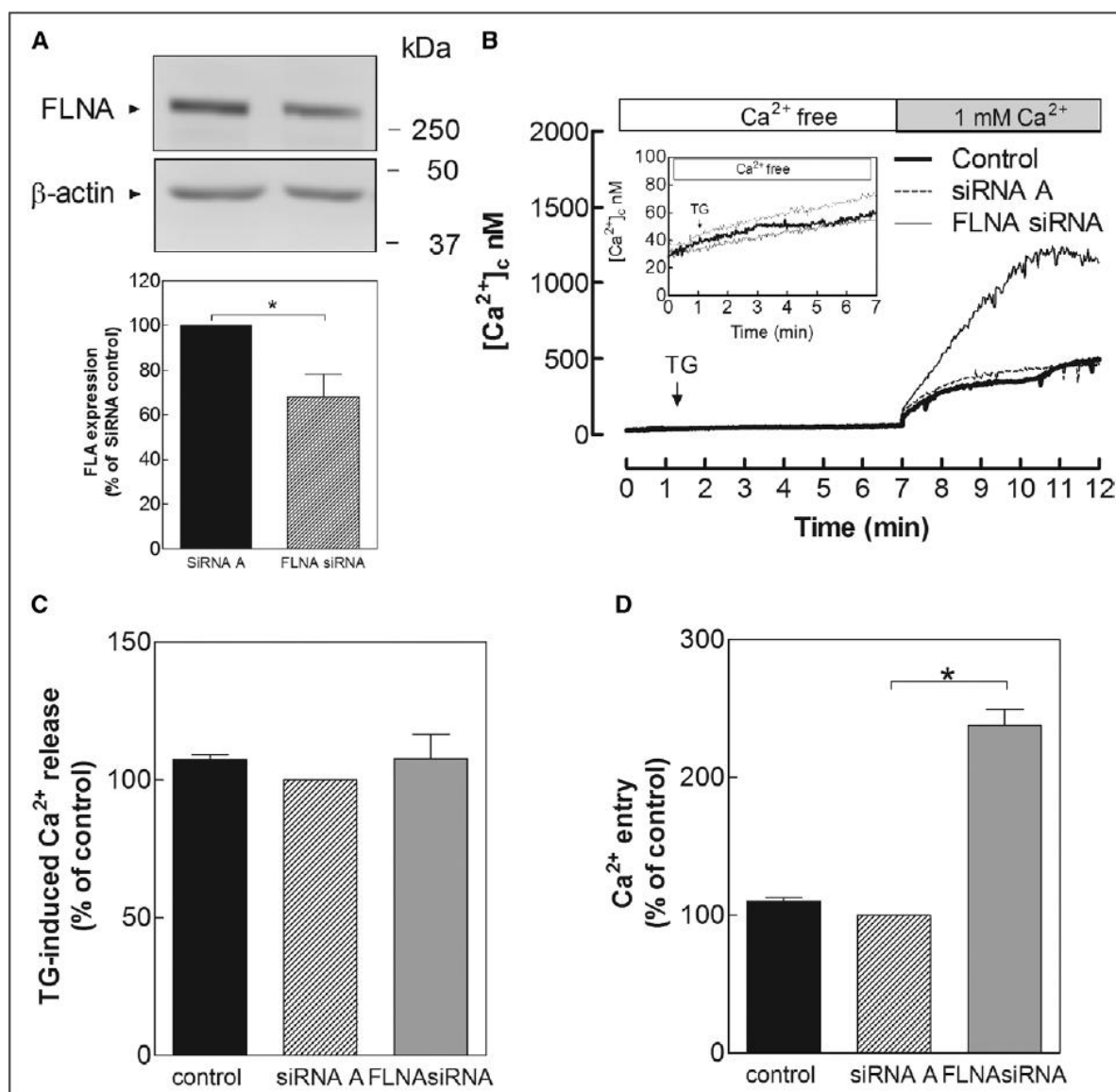


Figure 4. FLNA (filamin A) knockdown enhances store-operated Ca²⁺ entry. Human platelets were transfected with FLNA siRNA or scrambled siRNA (siRNA A). **A**, Twenty-four h after transfection, cells were lysed and subjected to Western blotting with anti-FLNA antibody, followed by reprobing with anti- β -actin antibody for protein loading control. * $P < 0.05$, Student t test. **B**, Platelets were transfected with FLNA siRNA or scrambled siRNA (siRNA A). Twenty-four h later, cells were loaded with fura-2. Cells were then stimulated with thapsigargin (TG; 1 μ mol/L) in a Ca²⁺-free medium (125 μ mol/L EGTA added), and 5/2 min later, CaCl₂ (final concentration 1 mmol/L) was added to the medium to initiate Ca²⁺ entry. [Ca²⁺]_c was monitored as described in the Materials and Methods section in the online-only Data Supplement. Traces are representative of 6 independent experiments. **C** and **D**, Bar graphs indicating the percentage of Ca²⁺ release and entry under the different conditions relative to their control (cells transfected with siRNA A). Ca²⁺ release and entry were determined as described in the Materials and Methods section in the online-only Data Supplement. Values are means \pm SEM; significance values indicate differences compared with control (cells transfected with siRNA A). * $P < 0.05$, ANOVA combined with the Dunnett test.

we have investigated the role of FLNA in the association of STIM1 with Orai1 in platelets transfected with FLNA siRNA or siRNA A and then stimulated with thapsigargin or left untreated. After immunoprecipitation with anti-STIM1 antibody, Western blotting revealed the presence of Orai1 in samples from resting platelets transfected with scramble siRNA, which was significantly enhanced by 32 \pm 9% on treatment with thapsigargin (Figure 5C; $P < 0.05$; $n = 6$). Interestingly, both resting and thapsigargin-evoked STIM1–Orai1 association was significantly greater in platelets transfected with FLNA

siRNA (Figure 5C; $P < 0.05$; $n = 6$), indicating that FLNA regulates SOCE by modulating the association of STIM1 with the cytoskeleton and, subsequently, STIM1–Orai1 interaction.

We have further explored the role of FLNA on ex vivo platelet aggregation in response to the physiological agonist thrombin. Human platelets transfected with siRNA A or FLNA siRNA for 24 hours were stimulated with 1 U/mL thrombin in a medium containing 1 mmol/L Ca²⁺. The percentage of aggregation on stimulation with thrombin was 52 \pm 7% in cells transfected with siRNA A and 73 \pm 5% in cells transfected with

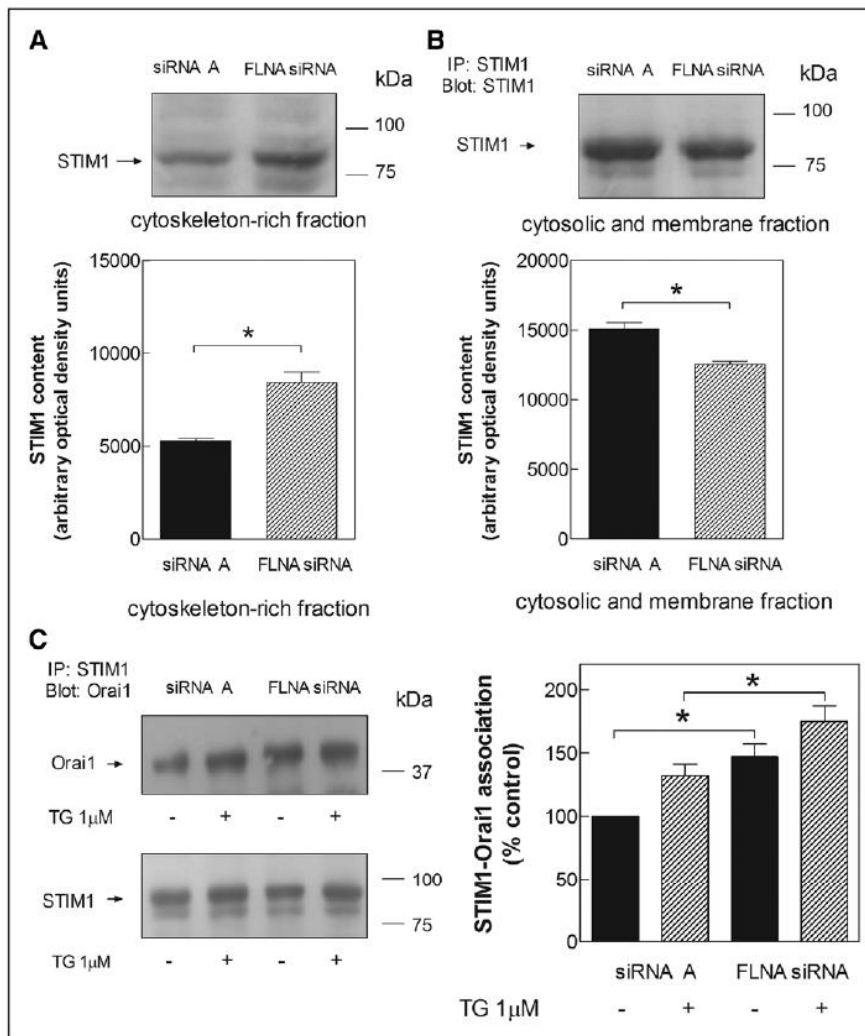


Figure 5. FLNA (filamin A) knockdown modulates the association of STIM1 (stromal interaction molecule 1) with the cytoskeleton and its interaction with Orai1. Human platelets were transfected with FLNA siRNA or scrambled siRNA (siRNA A). Twenty-four h after transfection, cells were lysed with triton buffer to separate cytoskeletal fraction (A) and cytosolic and membrane fraction (B), as indicated. The pellet (cytoskeletal fraction) was subjected to 10% SDS-PAGE and subsequent Western blotting with a specific anti-STIM1 antibody. The supernatant (cytosolic and membrane fraction) was immunoprecipitated with the anti-STIM1 antibody followed by Western blotting with the same antibody. The image shows results from 1 experiment representative of 5 others. Molecular masses indicated on the right were determined using molecular mass markers run in the same gel. Bar graphs represent the quantification of STIM1 in the cytoskeletal or cytosolic and membrane fractions. Results are presented as arbitrary optical density units and expressed as mean \pm SEM; significant values indicate differences compared with control (cells transfected with siRNA A). * P <0.05, Student t test. C, Platelets were transfected with FLNA siRNA or scrambled siRNA (siRNA A). Twenty-four h after transfection, cells were stimulated with 1 μ mol/L thapsigargin (TG) for 30 s and lysed. Platelet lysates were immunoprecipitated with anti-STIM1 antibody, and proteins were separated by SDS/PAGE followed by Western blotting with anti-Orai1 antibody (top). Membranes were re probed with anti-STIM1 antibody (bottom) for protein loading control. Positions of molecular-mass markers are shown on the right. Bar graphs represent the quantification of STIM1-Orai1 coimmunoprecipitation. Values are mean \pm SEM of 6 independent experiments. * P <0.05, ANOVA combined with the Dunnett test.

FLNA siRNA (P <0.05; n =6), indicating that FLNA modulates platelet aggregation probably by regulating Ca^{2+} signaling.

FLNA Modulates SOCE in Melanoma Cells Through Phosphorylation at Residue 2152

To confirm the regulatory role of FLNA in SOCE observed in human platelets, we have used the FLNA-deficient melanoma cell line M2 and the FLNA-expressing M2 subclone A7.²⁸ As shown in Figure 6A, top, FLNA was strongly detected in A7 cells but was undetectable in the M2 cell line. In A7 cells, our results indicate that treatment with the agonist endothelin-1 (10

nM) for 30 and 60 seconds significantly enhances FLNA phosphorylation at Ser²¹⁵² (Figure 6B; P <0.05; n =6), in agreement with previous studies reporting that G protein-coupled receptors induce recruitment and phosphorylation of FLNA, an event that has long been known to be essential for the regulation of the structure and dynamics of the actin cytoskeleton.²⁹

Treatment of A7 and M2 cells with thapsigargin in a Ca^{2+} -free medium resulted in a transient increase in $[Ca^{2+}]_c$ because of Ca^{2+} release from the intracellular stores. Subsequent addition of Ca^{2+} to the extracellular medium resulted in a further elevation in $[Ca^{2+}]_c$ indicative of SOCE. As shown in

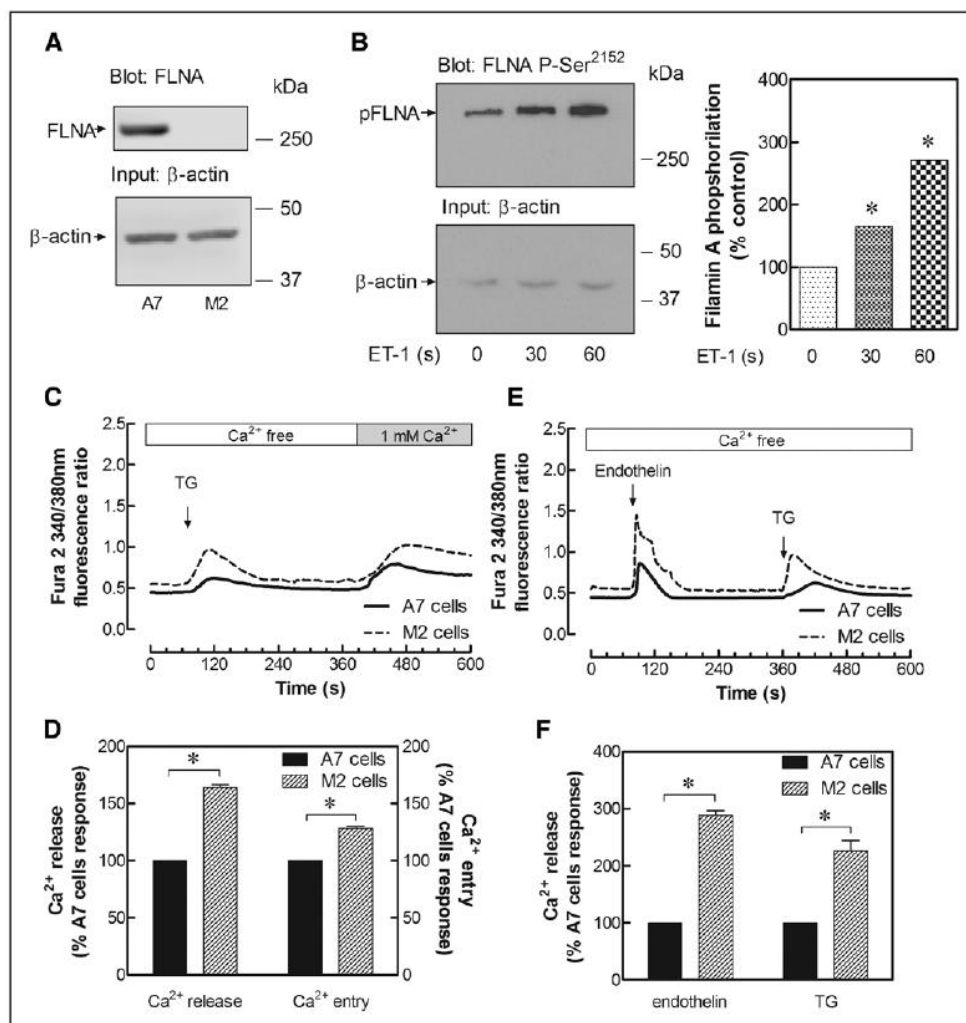


Figure 6. FLNA (filamin A) plays a relevant role in Ca²⁺ release and entry in melanoma cells. **A**, A7 and FLNA-deficient M2 melanoma cells were lysed and subjected to Western blotting with anti-FLNA antibody, followed by reprobing with anti-β-actin antibody for protein loading control. **B**, A7 cells were stimulated with 10 nM endothelin-1 and lysed. Cell lysates were subjected to Western blotting with antiphospho-FLNA (pSer²¹⁵²) antibody or anti-β-actin antibody, as indicated. Bar graphs represent the percentage of FLNA phosphorylation as compared with nonstimulated (control) cells. **C–F**, Fura-2-loaded A7 and M2 melanoma cells were stimulated with thapsigargin (TG; 1 μmol/L) in a Ca²⁺-free medium (125 μmol/L EGTA added) and 5½ min later CaCl₂ (final concentration 1 mmol/L) was added to the medium to initiate Ca²⁺ entry (**C** and **D**) or were stimulated with 10 nM endothelin-1 in a Ca²⁺-free medium (125 μmol/L EGTA added) followed by addition of 1 μmol/L TG (**E** and **F**). [Ca²⁺]_i was monitored as described in the Materials and Methods section in the [online-only Data Supplement](#). Traces are representative of 6 independent experiments. Bar graphs indicate the percentage of Ca²⁺ release and entry under the different conditions relative to their control (response in A7 cells). Values are means ± SEM; significance values indicate differences compared with the response in FLNA-expressing A7 cells. **P* < 0.05, Student *t* test.

Figure 6C and 6D, SOCE was significantly greater in FLNA-deficient M2 cells (the integrals of the rise in fura-2 fluorescence ratio after the addition of CaCl₂ were 58.4 ± 2.1 and 44.6 ± 1.4 au · s in M2 and A7 cells, respectively; *P* < 0.05; *n* = 6). These observations are consistent with the results obtained in human platelets and further support that FLNA regulates the activation of SOCE. Thapsigargin-evoked Ca²⁺ efflux from the internal stores was also found to be greater in M2 cells

to assess this possibility, cells were stimulated with endothelin-1 in a Ca²⁺-free medium followed by addition of thapsigargin to estimate the ability of the cells to store Ca²⁺. As depicted in Figure 6E and 6F, treatment of A7 and M2 cells with endothelin-1 (10 nM) induced a transient increase in [Ca²⁺]_i, subsequent addition of thapsigargin induced a further rise in [Ca²⁺]_i, indicative of the amount of Ca²⁺ accumulated in the stores.

the stores is greater in FLNA-deficient M2 and suggests that FLNA might regulate SERCA activity in these cells.

We have further explored whether phosphorylation of FLNA at Ser²¹⁵² is involved in the modulation of SOCE in melanoma cells as reported above in human platelets. To investigate this possibility, M2 cells were transfected with expression plasmids for wild-type FLNA or the nonphosphorylatable FLNA S2152A mutant (Figure 7A). As shown in Figure 7B and 7C, expression of FLNA in M2 cells significantly attenuated SOCE (the integrals of the rise in fura-2 fluorescence ratio after the addition of CaCl₂ were 42.2±2.2 and 28.5±2.2 ua·s in M2 and FLNA-expressing M2 cells, respectively; *P*<0.05;

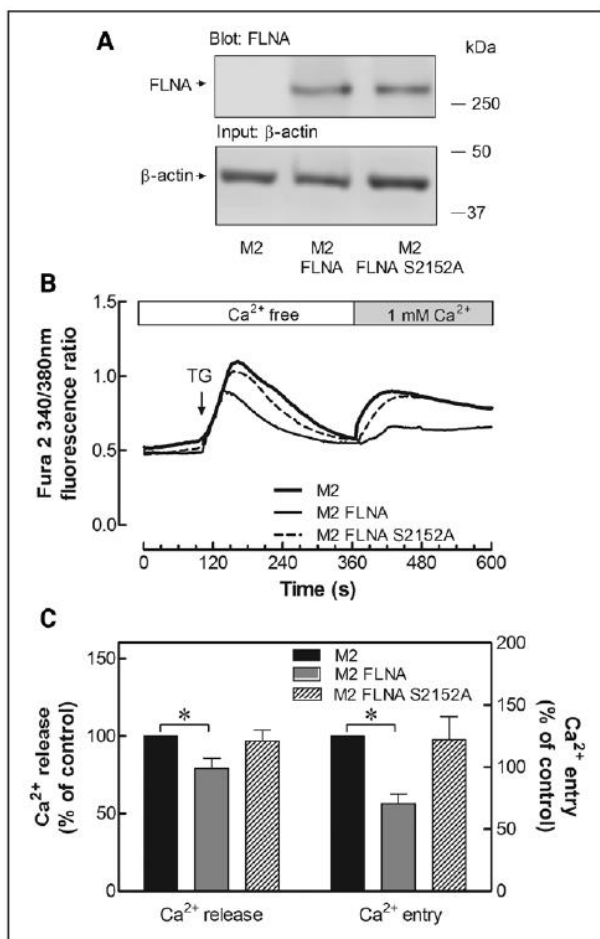


Figure 7. Modulation of store-operated calcium entry (SOCE) by filamin A (FLNA) requires phosphorylation at serine 2152 in melanoma cells. **A**, M2 melanoma cells were transfected with overexpression plasmids for or FLNA S2152A (FLNA S2152A) or empty vector, as control, and then were lysed and subjected to Western blotting with anti-FLNA antibody, followed by reprobing with anti- β -actin antibody for protein loading control. **B**, Wild-type M2 melanoma cells and M2 cells expressing FLNA or FLNA S2152A were stimulated with thapsigargin (TG; 1 μ mol/L) in a Ca²⁺-free medium (125 μ mol/L EGTA added) followed by the addition of CaCl₂ (final concentration 1 mmol/L) to the medium to initiate Ca²⁺ entry. [Ca²⁺]_i was monitored as described in the Materials and Methods section in the online-only Data Supplement. Traces are representative of 6 independent experiments. **C**, Bar graphs indicate the percentage of Ca²⁺ release and entry under the different conditions relative to their control (cells transfected with empty vector). Values are means±SEM; significant values indicate differences compared with control. **P*<0.05, ANOVA combined with the Dunnett test.

n=6), which further confirms the modulatory role of FLNA on SOCE. By contrast, expression of the nonphosphorylatable FLNA mutant was without effect on thapsigargin-induced Ca²⁺ release and entry (the integral of the rise in fura-2 fluorescence ratio after the addition of CaCl₂ was 40.7±3.2 ua·s in FLNA S2152A-expressing M2 cells; *n*=6), thus suggesting that the role of FLNA on these processes entirely depends on phosphorylation at Ser²¹⁵². The attenuation of thapsigargin-evoked Ca²⁺ release from the stores induced by the expression of FLNA was also impaired by the S2152A mutation (the integrals of the rise in fura-2 fluorescence ratio after the addition of thapsigargin were 41.4±2.2, 32.1±1.4, and 40.3±3.2 ua·s in M2, FLNA-expressing M2, and FLNA S2152A-expressing M2 cells, respectively; *P*<0.05; *n*=6).

C-Terminal Domain of STIM1 and Filamin A Dimerization Are Essential for Their Interaction and Platelet Function

We have finally analyzed the location of the STIM1- and FLNA-binding sites. STIM1 shows a polybasic lysine-rich domain in the C-terminal region that is involved in the interaction with TRPC1 channels³⁰ and phosphoinositides at the plasma membrane.³¹ Hence, we have investigated whether this region is responsible for the interaction with FLNA in M2 cells overexpressing pEYFP-STIM1 (full-length) or the pEYFP-STIM1(K684,685E) mutant together with FLNA. As shown in Figure 8A, our results indicate that coexpression of pEYFP-STIM1 and FLNA show detectable coimmunoprecipitation between both proteins at rest, which was enhanced by treatment with thapsigargin. Interestingly, STIM1–FLNA interaction was abolished in cells coexpressing FLNA and the STIM1(K684,685E) mutant, which strongly indicates that the lysine-rich region of STIM1 is required for FLNA interaction. Similarly, we have investigated the location of the relevant STIM1-interacting FLNA site. The C-terminal region of FLNA is especially important for the interaction with signaling molecules, and many of these interactions occur at the 24th dimerizing repeat of FLNA³²; therefore, we have investigated whether this region is important for the interaction with STIM1. To assess this possibility, the anti-FLNA antibody, which recognizes the sequence between residues 2597 and 2647, was introduced into platelets by electroporation, as described previously.⁵ The internalization of the antibody was investigated in samples from electroporated cells incubated with 4 μ g/mL anti-FLNA (2597–2647) antibody, by immunoprecipitation without adding any additional anti-FLNA antibody and subsequent Western blotting with the anti-FLNA (2597–2647) antibody (Figure 8B). As shown in Figure 8C, interaction between STIM1 and FLNA was significantly attenuated in cells transfected with 4 μ g/mL anti-FLNA (2597–2647) antibody (top, lanes 1 and 2) compared with cells transfected with a rabbit IgG (top, lanes 3 and 4) used as control because this is the nature of the anti-FLNA (2597–2647) antibody. The FLNA–STIM1 interaction was reduced by 82% and 74% in resting and thapsigargin-treated cells, respectively, in cells transfected with the anti-FLNA (2597–2647) antibody compared with control (cells transfected with rabbit IgG; *P*<0.05; *n*=6). Reprobing of the same membranes with anti-STIM1 antibody confirmed a similar protein loading in all lanes (Figure 8C, bottom). These findings indicate that the FLNA 2597 to 2647

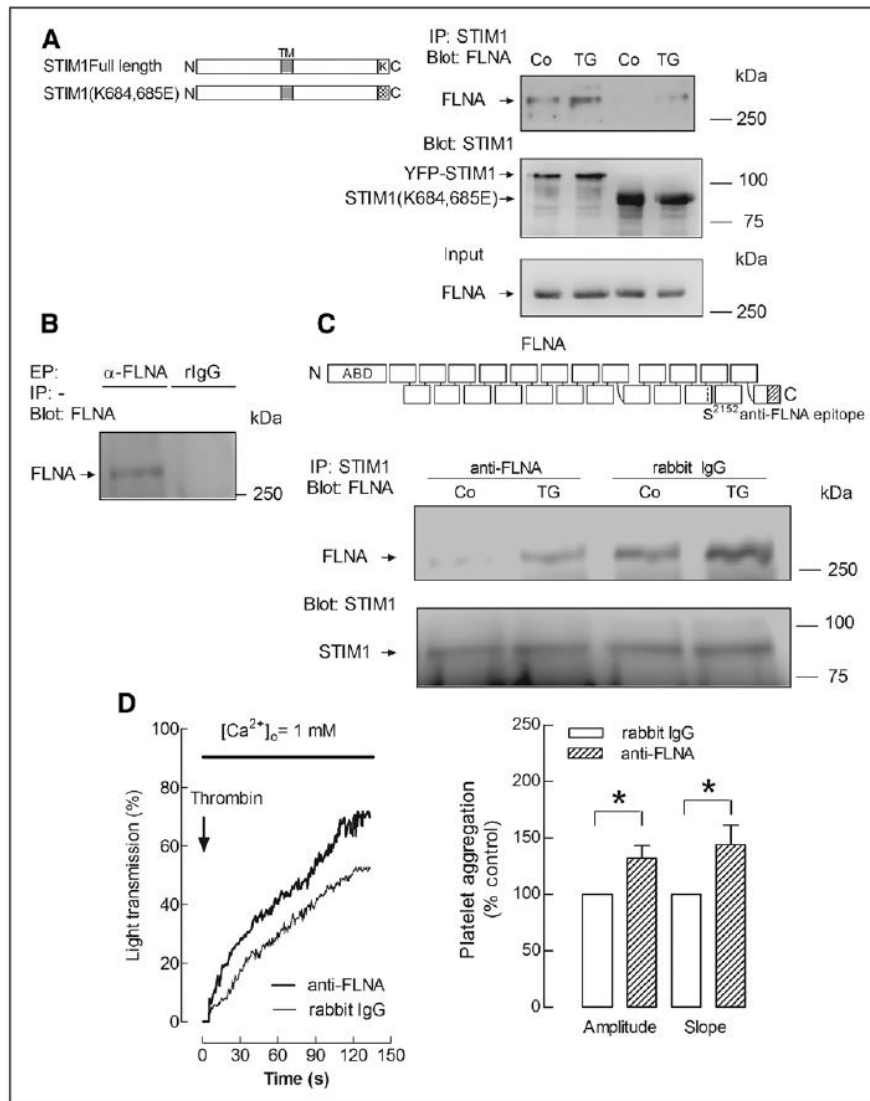


Figure 8. The C-terminal domains of STIM1 (stromal interaction molecule 1) and FLNA (filamin A) are essential for their interaction and platelet function. **A**, FLNA-deficient M2 melanoma cells were transfected with overexpression plasmids for STIM1 (lanes 1 and 2) or the STIM1(K684,685E) mutant (lanes 3 and 4) and FLNA or left untreated. Cells were then stimulated for 30 s with TG (1 μmol/L) or the vehicle (control; Co), as indicated, in a medium containing 1 mmol/L CaCl₂ and lysed. Cell lysates were immunoprecipitated with the anti-STIM1 antibody followed by Western blotting with the anti-FLNA antibody (**top**) and the anti-STIM1 antibody (**middle**; for protein loading control). The input with anti-FLNA antibody is shown in the **bottom**. The image shows results from 1 experiment representative of 5 others. Molecular masses indicated on the **right** were determined using molecular mass markers run in the same gel. **B**, Human platelets electropermeabilized (EP) in a Gene Pulser as described in the Materials and Methods section in the [online-only Data Supplement](#) were incubated in the presence of 4 μg/mL anti-FLNA antibody (α-FLNA) or 4 μg/mL rabbit IgG (rIgG), as indicated, for 60 min and then lysed. Whole cell lysates were immunoprecipitated in the absence of antibodies but adding protein A-agarose, and immunoprecipitated proteins were analyzed by Western blotting using anti-FLNA antibody. These results are representative of 3 independent experiments. **C**, Platelets (10⁹ cells/mL) were electropermeabilized and incubated with 4 μg/mL rabbit IgG or with 4 μg/mL anti-FLNA (2597–2647) antibody for an additional 60 min at 37°C, as indicated. Cells were then incubated for 30 s in the absence or presence of 1 μmol/L TG in a medium containing 1 mmol/L CaCl₂ and lysed. Whole-cell lysates were immunoprecipitated (IP) with anti-STIM1 antibody. Immunoprecipitates were analyzed by Western blotting (WB) using anti-FLNA antibody (**top**) and reprobed with anti-STIM1 antibody (**bottom**). Positions of molecular mass markers are shown on the **right**. These results are representative of 6 independent experiments. ABD, actin-binding domain. The structural domains of FLNA showing the location of the epitope recognized by the anti-FLNA (2597–2647) antibody is depicted on **top**. **D**, Human platelets were electropermeabilized and incubated with 4 μg/mL rabbit IgG or with 4 μg/mL anti-FLNA (2597–2647) antibody for an additional 60 min at 37°C, as indicated in the legend to Figure 6B. Platelets were then suspended in a medium containing 1 mmol/L CaCl₂ and then stimulated with 2 U/mL thrombin. Traces shown are representative of 6 separate experiments. Bar graphs indicate the amplitude and slope of platelet aggregation in response to thrombin in cells treated with anti-FLNA or rabbit IgG, as control.

sequence, located in the dimerizing repeat, is relevant for the STIM1-FLNA interaction and suggest that dimerization of FLNA is necessary for the interaction.

Because introduction of the anti-FLNA (2597–2647) antibody impairs the STIM1-FLNA interaction, we have investigated whether this interaction is important for platelet

aggregation. As shown in Figure 8D, introduction of the anti-FLNA (2597–2647) antibody into platelets significantly enhanced the amplitude and slope of thrombin-induced platelet aggregation compared with transfection of a rabbit IgG. These findings indicate that the STIM1–FLNA interaction plays a relevant functional role in human platelets.

Discussion

SOCE is a complex mechanism for Ca^{2+} influx controlled by the Ca^{2+} stores. Although the central event is based on the interaction between STIM1 and the store-operated channels at ER–PM junctions, many proteins fine-tune the amplitude of Ca^{2+} entry, an essential process for different cellular functions, including platelet physiology,^{33,34} B-cell response,³⁵ or neuronal differentiation.³⁶ Key modulators of STIM1–Orai1 interaction include CRACR2A, STIMATE, SARAF, septins, or ORMDL3, among others.³⁷ More precisely, STIM1–Orai1-supporting proteins include CRACR2A, which stabilizes the SOCE signalplex, STIMATE, required for the activation and translocation of STIM1, and septins, involved in the organization of membrane microdomains important for STIM1–Orai1 interaction. Among the negative modulators of SOCE are SARAF, ORMDL3 or golgi, which prevent excessive Ca^{2+} influx.³⁷ The SOCE signalplex is supported by the cytoskeleton,^{11–13} which is rapidly remodeled on store depletion.³⁸ By looking for new modulators of STIM1 function, we have identified FLNA as a protein that coimmunoprecipitates with STIM1 on Ca^{2+} store depletion in human platelets. Our results indicate that the interaction between FLNA and STIM1 is Ca^{2+} dependent and requires FLNA phosphorylation at Ser²¹⁵². Phosphorylation of FLNA at Ser²¹⁵² acts as a chemomechanical switch that modulates downstream cellular processes.¹⁸ We have found that impairment of FLNA phosphorylation enhances SOCE, meanwhile inhibition of FLNA dephosphorylation leads to the opposite effect, thus suggesting that FLNA might be a negative modulator of SOCE in platelets. We have confirmed the role of FLNA in SOCE in platelets using siRNA. Platelets carry out mRNA translation, a process that is relevant for platelet-mediated thrombosis and hemostasis,³⁹ and siRNA has been demonstrated to be efficiently introduced into platelets to modulate protein expression in these cells.²⁷ Our results indicate that 24 hours after transfection of the FLNA siRNA, FLNA expression was significantly reduced. Further transfection periods led to a significant reduction in cell viability (data not shown). Interestingly, attenuation of FLNA expression revealed that FLNA is a modulator of SOCE in human platelets. This function was confirmed in the FLNA-deficient melanoma cell line M2 where SOCE was greater than that in the FLNA-expressing M2 subclone A7. To our knowledge, this is the description of a role for FLNA in the modulation of SOCE. We also found that FLNA modulates Ca^{2+} uptake into the intracellular stores by SERCA, whereas this effect seems to be specific for melanoma cells, because this function was not observed in human platelets, we cannot exclude a possible role of FLNA on SERCA in platelets that can be difficult to detect because of the low rate of Ca^{2+} efflux from the stores in these cells on treatment with thapsigargin. Using melanoma cells, we have also confirmed that phosphorylation of FLNA at Ser²¹⁵² is essential for the regulation of SOCE, in agreement with the observations in human platelets.

Our results indicate that the C-terminal regions of STIM1 and FLNA play a relevant role in the interaction with each other, as mutation of the STIM1 lysine-rich domain and interference with the FLNA 2597 to 2647 region impair the STIM1–FLNA association.

Finally, we have investigated the regulatory mechanism of FLNA. Because FLNA is an actin-binding protein, we have initially investigated its role in the location of STIM1 in the cytoskeletal fraction. We have found that FLNA expression knockdown enhances the association of STIM1 with the cytoskeleton and subsequently increases the interaction of STIM1 with Orai1, leading to a dramatic increase in SOCE. Furthermore, impairment of FLNA–STIM1 interaction results in enhanced platelet aggregation in response to agonists. These findings strongly suggest that FLNA might be essential for an appropriate association of STIM1 with the cytoskeleton, which, in turn, is necessary to fine-tune the interaction with the store-operated channels and SOCE and also to modulate platelet function. Previous studies in a mouse model with deficient expression of FLNA have revealed that platelets exhibit hyperaggregability and thrombocytopenia because of platelet loss.^{19,20} Furthermore, a recent study has reported that a patient carrying a mutation that results in a 100-amino acid-long FLNA C-terminal extension (p.Ter2648SerextTer101) showed normal platelet count but upregulated platelet function.⁴⁰ Our results provide evidence that a deficient expression or function of FLNA in platelets might alter Ca^{2+} homeostasis, which, in turn, might underlie platelet function disorders.

Acknowledgments

J.J. Lopez and I. Jardín are supported by contract Juan de la Cierva (Ministerio Economía y Competitividad, Spain) JCI-2012 to 12934 and IJCI-2015 to 25665, respectively. L. Albarrán is supported by contract from MINECO (grant BFU2013-45564-C2-1-P).

Sources of Funding

This work is supported by MINECO (grants BFU2013-45564-C2-1-P/2-P and BFU2016-74932-C2-1-P/2-P) and Junta de Extremadura-FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional Grants IB16046 and GR15029). A7 and M2 cells were kindly gifted by Dr Mañe (Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología/Centro Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain).

Disclosures

None.

References

- Zhang SL, Yu Y, Roos J, Kozak JA, Deerinck TJ, Ellisman MH, Stauderman KA, Cahalan MD. STIM1 is a Ca^{2+} sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca^{2+} store to the plasma membrane. *Nature*. 2005;437:902–905. doi: 10.1038/nature04147.
- Wu MM, Buchanan J, Luik RM, Lewis RS. Ca^{2+} store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *J Cell Biol*. 2006;174:803–813. doi: 10.1083/jcb.200604014.
- Zbidi H, Jardín I, Woodard GE, Lopez JJ, Berna-Erró A, Salido GM, Rosado JA. STIM1 and STIM2 are located in the acidic Ca^{2+} stores and associates with Orai1 upon depletion of the acidic stores in human platelets. *J Biol Chem*. 2011;286:12257–12270. doi: 10.1074/jbc.M110.190694.
- Mignen O, Thompson JL, Shuttleworth TJ. STIM1 regulates Ca^{2+} entry via arachidonate-regulated Ca^{2+} -selective (ARC) channels without store

- depletion or translocation to the plasma membrane. *J Physiol*. 2007;579(pt 3):703–715. doi: 10.1113/jphysiol.2006.122432.
5. López JJ, Salido GM, Pariente JA, Rosado JA. Interaction of STIM1 with endogenously expressed human canonical TRP1 upon depletion of intracellular Ca²⁺ stores. *J Biol Chem*. 2006;281:28254–28264. doi: 10.1074/jbc.M604272200.
 6. Covington ED, Wu MM, Lewis RS. Essential role for the crac activation domain in store-dependent oligomerization of stim1. *Mol Biol Cell*. 2010;21:1897–1907.
 7. Liou J, Fivaz M, Inoue T, Meyer T. Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after Ca²⁺ store depletion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:9301–9306. doi: 10.1073/pnas.0702866104.
 8. Luik RM, Wang B, Prakriya M, Wu MM, Lewis RS. Oligomerization of STIM1 couples ER calcium depletion to CRAC channel activation. *Nature*. 2008;454:538–542. doi: 10.1038/nature07065.
 9. Stathopoulos PB, Li GY, Plevin MJ, Ames JB, Ikura M. Stored Ca²⁺ depletion-induced oligomerization of stromal interaction molecule 1 (STIM1) via the EF-SAM region: an initiation mechanism for capacitive Ca²⁺ entry. *J Biol Chem*. 2006;281:35855–35862. doi: 10.1074/jbc.M608247200.
 10. Ma G, Wei M, He L, et al. Inside-out Ca(2+) signalling prompted by STIM1 conformational switch. *Nat Commun*. 2015;6:7826. doi: 10.1038/ncomms8826.
 11. Lioudyno MI, Kozak JA, Penna A, Safrina O, Zhang SL, Sen D, Roos J, Stauderman KA, Cahalan MD, Orail and STIM1 move to the immunological synapse and are up-regulated during T cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:2011–2016. doi: 10.1073/pnas.0706122105.
 12. Galán C, Dionisio N, Smani T, Salido GM, Rosado JA. The cytoskeleton plays a modulatory role in the association between STIM1 and the Ca²⁺ channel subunits Orail and TRPC1. *Biochem Pharmacol*. 2011;82:400–410. doi: 10.1016/j.bcp.2011.05.017.
 13. Smyth JT, DeHaven WI, Bird GS, Putney JW Jr. Role of the microtubule cytoskeleton in the function of the store-operated Ca²⁺ channel activator STIM1. *J Cell Sci*. 2007;120(pt 21):3762–3771. doi: 10.1242/jcs.015735.
 14. Ithychanda SS, Hsu D, Li H, Yan L, Liu DD, Liu D, Das M, Plow EF, Qin J. Identification and characterization of multiple similar ligand-binding repeats in filamin: implication on filamin-mediated receptor clustering and cross-talk. *J Biol Chem*. 2009;284:35113–35121. doi: 10.1074/jbc.M109.060954.
 15. Wallach D, Davies PJ, Pastan I. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of filamin in mammalian smooth muscle. *J Biol Chem*. 1978;253:4739–4745.
 16. Bedolla RG, Wang Y, Asuncion A, Chamie K, Siddiqui S, Mudryj MM, Prihoda TJ, Siddiqui J, Chinnaiyan AM, Mehra R, de Vere White RW, Ghosh PM. Nuclear versus cytoplasmic localization of filamin A in prostate cancer: immunohistochemical correlation with metastases. *Clin Cancer Res*. 2009;15:788–796. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1402.
 17. Carroll RC, Gerrard JM. Phosphorylation of platelet actin-binding protein during platelet activation. *Blood*. 1982;59:466–471.
 18. Ithychanda SS, Fang X, Mohan ML, Zhu L, Tirupula KC, Naga Prasad SV, Wang YX, Karnik SS, Qin J. A mechanism of global shape-dependent recognition and phosphorylation of filamin by protein kinase A. *J Biol Chem*. 2015;290:8527–8538. doi: 10.1074/jbc.M114.633446.
 19. Falet H, Pollitt AY, Begonja AJ, Weber SE, Duerschmied D, Wagner DD, Watson SP, Hartwig JH. A novel interaction between FlnA and Syk regulates platelet ITAM-mediated receptor signaling and function. *J Exp Med*. 2010;207:1967–1979. doi: 10.1084/jem.20100222.
 20. Nurden P, Debili N, Coupry I, et al. Thrombocytopenia resulting from mutations in filamin A can be expressed as an isolated syndrome. *Blood*. 2011;118:5928–5937. doi: 10.1182/blood-2011-07-365601.
 21. Pons M, Izquierdo I, Andreu-Carbó M, Garrido G, Planagumá J, Muriel O, Del Pozo MA, Geli MI, Aragay AM. Phosphorylation of filamin A regulates chemokine receptor CCR2 recycling. *J Cell Sci*. 2017;130:490–501. doi: 10.1242/jcs.193821.
 22. Li L, Lu Y, Stemmer PM, Chen F. Filamin A phosphorylation by Akt promotes cell migration in response to arsenic. *Oncotarget*. 2015;6:12009–12019. doi: 10.18632/oncotarget.3617.
 23. Khatlani T, Pradhan S, Da Q, Gushiken FC, Bergeron AL, Langlois KW, Molkenkin JD, Rumbaut RE, Vijayan KV. The β isoform of the catalytic subunit of protein phosphatase 2B restrains platelet function by suppressing outside-in α IIb β 3 integrin signaling. *J Thromb Haemost*. 2014;12:2089–2101. doi: 10.1111/jth.12761.
 24. Jay D, García EJ, de la Luz Ibarra M. In situ determination of a PKA phosphorylation site in the C-terminal region of filamin. *Mol Cell Biochem*. 2004;260:49–53.
 25. Zhang J, Neal J, Lian G, Shi B, Ferland RJ, Sheen V. Brefeldin A-inhibited guanine exchange factor 2 regulates filamin A phosphorylation and neuronal migration. *J Neurosci*. 2012;32:12619–12629. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1063-12.2012.
 26. Rosado JA, Porras T, Conde M, Sage SO. Cyclic nucleotides modulate store-mediated calcium entry through the activation of protein-tyrosine phosphatases and altered actin polymerization in human platelets. *J Biol Chem*. 2001;276:15666–15675. doi: 10.1074/jbc.M009217200.
 27. Hong W, Kondkar AA, Nagalla S, Bergmeier W, Jin Y, Herman JH, Bray PF. Transfection of human platelets with short interfering RNA. *Clin Transl Sci*. 2011;4:180–182. doi: 10.1111/j.1752-8062.2011.00279.x.
 28. Gómez-Moutón C, Fischer T, Peregil RM, Jiménez-Baranda S, Stossel TP, Nakamura F, Mañes S. Filamin A interaction with the CXCR4 third intracellular loop regulates endocytosis and signaling of WT and WHIM-like receptors. *Blood*. 2015;125:1116–1125. doi: 10.1182/blood-2014-09-601807.
 29. Tirupula KC, Ithychanda SS, Mohan ML, Naga Prasad SV, Qin J, Karnik SS. G protein-coupled receptors directly bind filamin A with high affinity and promote filamin phosphorylation. *Biochemistry*. 2015;54:6673–6683. doi: 10.1021/acs.biochem.5b00975.
 30. Zeng W, Yuan JP, Kim MS, Choi YJ, Huang GN, Worley PF, Muallem S. STIM1 gates TRPC channels, but not Orail, by electrostatic interaction. *Mol Cell*. 2008;32:439–448. doi: 10.1016/j.molcel.2008.09.020.
 31. Bhardwaj R, Muller HM, Nickel W, Seedorf M. Oligomerization and Ca²⁺/calmodulin control binding of the ER Ca²⁺-sensors STIM1 and STIM2 to plasma membrane lipids. *Biosci Rep*. 2013;33.
 32. Kim H, McCulloch CA. Filamin A mediates interactions between cytoskeletal proteins that control cell adhesion. *FEBS Lett*. 2011;585:18–22. doi: 10.1016/j.febslet.2010.11.033.
 33. Saavedra FR, Redondo PC, Hernández-Cruz JM, Salido GM, Pariente JA, Rosado JA. Store-operated Ca(2+) entry and tyrosine kinase pp60(src) hyperactivity are modulated by hyperglycemia in platelets from patients with non insulin-dependent diabetes mellitus. *Arch Biochem Biophys*. 2004;432:261–268. doi: 10.1016/j.abb.2004.09.034.
 34. Singh AR, Morin G, Rochette J. Stormorken syndrome or York platelet syndrome: a clinician's dilemma. *Mol Genet Metab Rep*. 2015;2:80. doi: 10.1016/j.ymgmr.2015.01.003.
 35. King LB, Freedman BD. B-lymphocyte calcium influx. *Immunol Rev*. 2009;231:265–277. doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00822.x.
 36. Dupont G, Combettes L. Fine tuning of cytosolic Ca²⁺ oscillations. *F1000Res*. 2016;5:2036.
 37. Lopez JJ, Albarran L, Gómez LJ, Smani T, Salido GM, Rosado JA. Molecular modulators of store-operated calcium entry. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863:2037–2043. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.04.024.
 38. Redondo PC, Harper MT, Rosado JA, Sage SO. A role for cofilin in the activation of store-operated calcium entry by de novo conformational coupling in human platelets. *Blood*. 2006;107:973–979. doi: 10.1182/blood-2005-05-2015.
 39. Rowley JW, Chappaz S, Corduan A, Chong MM, Campbell R, Khoury A, Manne BK, Wurtzel JG, Michael JV, Goldfinger LE, Mumaw MM, Nieman MT, Kile BT, Provost P, Weyrich AS. Dicer1-mediated miRNA processing shapes the mRNA profile and function of murine platelets. *Blood*. 2016;127:1743–1751. doi: 10.1182/blood-2015-07-661371.
 40. Berrou E, Adam F, Lebret M, Planche V, Fergelot P, Issertier O, Coupry I, Bordet JC, Nurden P, Bonneau D, Colin E, Goizet C, Rosa JP, Bryckaert M. Gain-of-function mutation in filamin A potentiates platelet integrin α IIb β 3 activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37:1087–1097. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309337.

Highlights

- FLNA (filamin A) plays an essential role in the cross talk between STIM1 (stromal interaction molecule 1) and Orail.
- FLNA regulates store-operated calcium entry and the correct platelet function.
- FLNA phosphorylation at serine 2152 is required for the regulation of store-operated calcium entry.

Article

Adenylyl Cyclase Type 8 Overexpression Impairs Phosphorylation-Dependent Orai1 Inactivation and Promotes Migration in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells

Jose Sanchez-Collado ^{1,†}, Jose J. Lopez ^{1,†,*}, Isaac Jardin ¹, Pedro J. Camello ²,
Debora Falcon ³, Sergio Regodon ¹, Gines M. Salido ¹, Tarik Smani ³
and Juan A. Rosado ^{1,*}

¹ Department of Physiology, (Cellular Physiology Research Group), Institute of Molecular Pathology Biomarkers, University of Extremadura, 10003 Caceres, Spain

² Department of Physiology, (Smooth Muscle Physiology Research Group), Institute of Molecular Pathology Biomarkers, University of Extremadura, 10003 Caceres, Spain

³ Department of Medical Physiology and Biophysics, Institute of Biomedicine of Sevilla, 41013 Sevilla, Spain

* Correspondence: jjlopez@unex.es (J.J.L.); jarosado@unex.es (J.A.R.);

Tel.: +34-927-257-100 (ext. 51376) (J.J.L. & J.A.R.); Fax: +34-927-257-110 (J.J.L. & J.A.R.)

† These authors contributed equally to this work.

Received: 10 October 2019; Accepted: 21 October 2019; Published: 23 October 2019



Abstract: Orai1 plays a major role in store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) in triple-negative breast cancer (TNBC) cells. This channel is inactivated via different mechanisms, including protein kinase C (PKC) and protein kinase A (PKA)-dependent phosphorylation at Ser-27 and Ser-30 or Ser-34, respectively, which shapes the Ca^{2+} responses to agonists. The Ca^{2+} calmodulin-activated adenylyl cyclase type 8 (AC8) was reported to interact directly with Orai1, thus mediating a dynamic interplay between the Ca^{2+} - and cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-dependent signaling pathways. Here, we show that the breast cancer cell lines MCF7 and MDA-MB-231 exhibit enhanced expression of Orai1 and AC8 as compared to the non-tumoral breast epithelial MCF10A cell line. In these cells, AC8 interacts with the Orai1 α variant in a manner that is not regulated by Orai1 phosphorylation. AC8 knockdown in MDA-MB-231 cells, using two different small interfering RNAs (siRNAs), attenuates thapsigargin (TG)-induced Ca^{2+} entry and also Ca^{2+} influx mediated by co-expression of Orai1 and the Orai1-activating small fragment (OASF) of STIM1 (stromal interaction molecule-1). Conversely, AC8 overexpression enhances SOCE, as well as Ca^{2+} entry, in cells co-expressing Orai1 and OASF. In MDA-MB-231 cells, we found that AC8 overexpression reduces the Orai1 phosphoserine content, thus suggesting that AC8 interferes with Orai1 serine phosphorylation, which takes place at residues located in the AC8-binding site. Consistent with this, the subset of Orai1 associated with AC8 in naïve MDA-MB-231 cells is not phosphorylated in serine residues in contrast to the AC8-independent Orai1 subset. AC8 expression knockdown attenuates migration of MCF7 and MDA-MB-231 cells, while this maneuver has no effect in the MCF10A cell line, which is likely attributed to the low expression of AC8 in these cells. We found that AC8 is required for FAK (focal adhesion kinase) phosphorylation in MDA-MB-231 cells, which might explain its role in cell migration. Finally, we found that AC8 is required for TNBC cell proliferation. These findings indicate that overexpression of AC8 in breast cancer MDA-MB-231 cells impairs the phosphorylation-dependent Orai1 inactivation, a mechanism that might support the enhanced ability of these cells to migrate.

Keywords: *orai1* α ; adenylyl cyclase 8; store-operated calcium entry; breast cancer cells; migration

1. Introduction

Breast cancer is one of the most common malignancies in women worldwide. Among the different subtypes, triple-negative breast cancer (TNBC) is more aggressive and exhibits a poorer prognosis than other types of breast cancer. Immunohistochemically, TNBC is characterized by the lack of estrogen and progesterone receptors or excess HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) expression. Consequently, this type of cancer is resistant to hormonal therapies and chemicals that target the HER2 receptor [1]. Studies in TNBC cells revealed that Ca^{2+} signaling is remodeled and plays a key functional role [2–5]. TNBC cells overexpress Orai1, which is responsible for the activation of store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) [6]. Orai1 is a well-characterized regulator of the proliferation and migration of many TNBC cells, including the MDA-MB-231 cell line [7–9].

Orai1 is the pore-forming subunit of the highly Ca^{2+} -selective CRAC (Ca^{2+} -release activated Ca^{2+}) channel, the best characterized store-operated channel [10–12]. The CRAC channel is activated by the endoplasmic reticulum Ca^{2+} sensor STIM1 upon discharge of the intracellular Ca^{2+} stores, and the influx of Ca^{2+} through the channel is modulated by the regulation of STIM1 by proteins like SARAF (SOCE-associated regulatory factor) [13–15], as well as by CRAC channel inactivation. CRAC currents undergo Ca^{2+} -dependent inactivation to prevent excessive Ca^{2+} influx. Two different mechanisms, termed fast Ca^{2+} -dependent inactivation (FCDI) that occurs within milliseconds [16] and slow Ca^{2+} -dependent inactivation (SCDI) that commences tens of seconds after Orai1 activation [17], were described, although the precise mechanism remains unclear. Two variants of Orai1, generated by alternative translation initiation, were recently identified [18], a long form termed Orai1 α of approximately 33 kDa and a short form, Orai1 β , lacking amino acids 1–63, of approximately 23 kDa. Orai1 α exhibits a greater FCDI, thus suggesting that the N-terminal 63 amino acids might play a relevant role in this process [11]. A recent study reported direct interaction of Orai1 with the Ca^{2+} calmodulin-activated adenylyl cyclase type 8 (AC8) [19]. Willoughby et al. specifically identified interaction of the N-terminal region of AC8 with residues 26–34 of the Orai1 N-terminus [19]. This sequence, exclusively present in the Orai1 α variant, overlaps with three Orai1 phosphorylation sites, Ser-27, -30, and -34. Ser-27 and -30 are phosphorylated by PKC in vivo and in vitro, leading to strong inactivation of CRAC channel function and SOCE [20]. On the other hand, a recent study demonstrated that AC8 mediates CRAC inactivation by phosphorylation of Orai1 at Ser-34 [21]. The functional interaction between AC8 and Orai1 reveals a finely regulated interplay between the cAMP and Ca^{2+} signaling pathways.

Here, we show that TNBC MDA-MB-231 cells overexpress Orai1 and AC8, with predominant overexpression of AC8 over Orai1. Interaction of AC8 with Orai1 interferes with phosphorylation of the latter, probably due to overlapping of the phosphorylation sites with the AC8-binding sequence of Orai1. In MDA-MB-231 cells, silencing of AC8 results in attenuation of SOCE, while AC8 overexpression enhances Ca^{2+} influx, thus suggesting that AC8 impairs the inactivation of Orai1. AC8 was also found to be required for breast cancer cell migration, thus suggesting that AC8, by enhancing cAMP levels and/or Ca^{2+} influx, plays an important functional role in breast cancer cells.

2. Results

2.1. Expression and Interaction of Orai1 α and AC8 in Non-Tumoral and Breast Cancer Cell Lines

Consistent with previous studies [3,6], Western blot analysis of whole-cell lysates from the non-tumoral breast epithelial MCF10A cell line and the estrogen receptor positive (ER⁺) and TNBC cell lines MCF7 and MDA-MB-231, respectively, with a specific anti-human Orai1 antibody revealed a low expression of Orai1 in MCF10A cells and a significantly higher expression of this protein in breast cancer cells (Figure 1a,b; $p < 0.05$; $n = 6$). The increased expression of Orai1 in the breast cancer cell lines is consistent with the high expression of this protein in cancerous tissue [22]. As shown in Figure 1c,d, Western blot analysis of whole-cell lysates from MCF10A, MCF7, and MDA-MB-231 cells with a specific anti-AC8 antibody revealed that this protein is scarcely expressed in the non-tumoral

cell line, while it is highly expressed in MCF7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. The Orai1 and AC8 expression normalized to the β -actin content indicates that Orai1 expression was 371 ± 12 and $393 \pm 22\%$ of that in MCF10A cells in MCF7 and MDA-MB-231 cells, respectively, while the AC8 expression was 611 ± 75 and $621 \pm 98\%$ of that in MCF10A cells in MCF7 and MDA-MB-231 cells, respectively; therefore, the quantitative analysis indicated that AC8 overexpression in breast cancer cells is significantly greater than that of Orai1. Previous studies revealed a functional relationship between Orai1 and AC8 [19,21]; hence, we next explored the interaction between both proteins in the non-tumoral and tumoral breast cell lines by co-immunoprecipitation of cell lysates with anti-Orai1 antibody, followed by Western blotting with anti-AC8 antibody. The experiments were performed in resting cells as this interaction was previously shown to be constitutive [19]. Our results indicated that, while a detectable interaction was appreciated in non-tumoral cells, the co-immunoprecipitation between Orai1 and AC8 was significantly greater in MCF7 and MDA-MB-231 cells (Figure 1e,f; $p < 0.05$; $n = 6$).

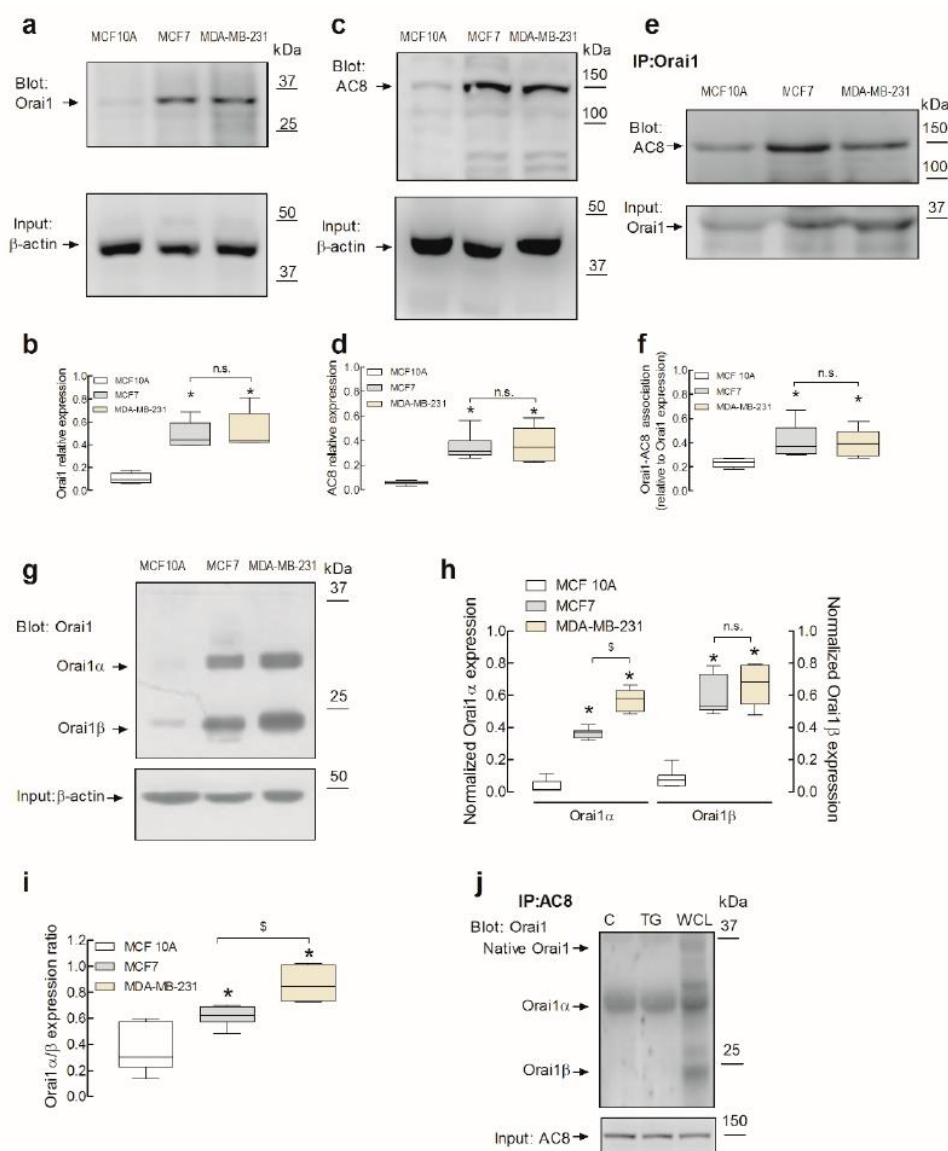


Figure 1. Expression and interaction of Orai1 variants with Ca^{2+} calmodulin-activated adenylyl cyclase type 8 (AC8) in non-tumoral and breast cancer cell lines. (a–d) Non-tumoral breast epithelial MCF10A

and breast cancer MCF7 and MDA-MB-231 cells were lysed and subjected to Western blotting with anti-Orai1 (a) or anti-AC8 (c) antibody, followed by reprobing with anti- β -actin antibody for protein loading control (b and d). The box-and-whisker plots (or box plots) represent Orai1 (b) or AC8 (d) expression normalized to the β -actin content. Molecular masses indicated on the right were determined using molecular-mass markers run in the same gel; * $p < 0.05$ compared to the expression in MCF10A cells. (e) MCF10A, MCF7, and MDA-MB-231 cells were lysed, and whole-cell lysates were immunoprecipitated (IP) with anti-Orai1 antibody. Immunoprecipitates were subjected to 10% SDS-PAGE and subsequent Western blotting with specific anti-AC8 antibody, as indicated. Membranes were reprobed with the antibody used for immunoprecipitation for protein loading control. The panels show results from one experiment representative of five others. Molecular masses indicated on the right were determined using molecular-mass markers run in the same gel. (f) The box plot represents the quantification of AC8–Orai1 interaction in resting cells. Results are presented as arbitrary optical density units, and expressed normalized to the Orai1 expression. (g) MCF10A, MCF7, and MDA-MB-231 cells were lysed, and whole-cell lysates were treated with N-glycosidase F (PNGaseF) and resolved by 10% SDS-PAGE. The blots were probed with anti-Orai1 antibody and anti- β -actin antibody for loading control. Molecular masses indicated on the right were determined using molecular-mass markers run in the same gel. (h) The box plot represents Orai1 α or Orai1 β expression normalized to the β -actin content. (i) The box plot represents the Orai1 α /Orai1 β expression ratio in the three cell lines investigated; * $p < 0.05$ compared to the expression in MCF10A cells, $^{\$} p < 0.05$ compared to the expression in MCF7 cells. (j) MDA-MB-231 cells were treated with thapsigargin (TG; 1 μ M) for 1 min or left untreated (C), as indicated, and lysed, and whole-cell lysates were immunoprecipitated (IP) with anti-AC8 antibody or subjected to Western blotting with anti-Orai1 antibody (WCL). Immunoprecipitates were treated with PNGaseF and then subjected to 10% SDS-PAGE and subsequent Western blotting with specific anti-Orai1 antibody, as indicated. Membranes were reprobed with the antibody used for immunoprecipitation for protein loading control. The panels show results from one experiment representative of five others. Molecular masses indicated on the right were determined using molecular-mass markers run in the same gel.

AC8 was reported to bind to an N-terminal sequence of Orai1 located between amino acids 26 and 34, which contains three serines (27, 30, and 34) [23]. This sequence is only present in the mammalian-specific full-length Orai1 α variant and is absent in the short Orai1 variant, Orai1 β [18]; thus, AC8 was reported to interact solely with Orai1 α [21]. We assessed the expression of Orai1 α and Orai1 β in the three breast derived cell lines. The native Orai1 variant expression was analyzed by Western blotting after protein deglycosylation with PNGaseF. As shown in Figure 1g, two distinct bands with lower molecular weight than glycosylated Orai1 were detected, corresponding to Orai1 α and Orai1 β . Our results indicated that both Orai1 variants were highly expressed in the breast cancer MCF7 and MDA-MB-231 cell lines as compared to non-tumoral MCF10A cells (Figure 1h; $p < 0.05$; $n = 6$). Furthermore, we found that the expression of Orai1 α was significantly greater in MDA-MB-231 cells than in MCF7 cells (Figure 1h; $p < 0.05$) while no differences were detected in the Orai1 β expression among the cancer cell lines investigated. The latter might explain the greater Orai1 α /Orai1 β expression ratio in MDA-MB-231 cells as compared to MCF7 cells (Figure 1i; $p < 0.05$; $n = 6$). The analysis of the expression ratio between the Orai1 variants indicates a greater expression of Orai1 β in all the cell types investigated and, interestingly, a greater Orai1 α /Orai1 β expression ratio in MCF7 and MDA-MB-231 breast cancer cells than in non-tumoral MCF10A cells (Figure 1i; $p < 0.05$; $n = 6$). We further explored the interaction of AC8 and Orai1 α in MDA-MB-231 cells by co-immunoprecipitation of cell lysates with anti-AC8 antibody, followed by treatment of the immunoprecipitates with PNGaseF and Western blotting with anti-Orai1 antibody. As shown in Figure 1j, our results indicate that Orai1 α , but not Orai1 β , co-immunoprecipitates with AC8 in resting conditions, confirming previous results [19,21]. This interaction was not modified by treatment for 1 min with the sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA) inhibitor thapsigargin (TG; 1 μ M), which is in agreement with a previous study by Willoughby and coworkers suggesting a constitutive interaction between both proteins [19].

2.2. The Interaction between Orai1 and AC8 Is Partially Dependent on Ca^{2+} Influx and Orai1 Phosphorylation at Ser-27 and -30

In order to explore the mechanism regulating the Orai1–AC8 interaction, we tested the possible Ca^{2+} dependency of this event. To address this issue, we assessed the role of Ca^{2+} released from the intracellular stores and Ca^{2+} entry through Orai1 in the Orai1–AC8 co-immunoprecipitation. Hence, we tested Orai1–AC8 interaction in resting cells or in cells treated with TG, to induce net Ca^{2+} release from intracellular Ca^{2+} stores, suspended either in the presence of 1 mM extracellular Ca^{2+} or in a Ca^{2+} -free medium. When indicated, cells were loaded with dimethyl BAPTA, and suspended either in a Ca^{2+} -free medium, to prevent rises in cytosolic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) induced by both Ca^{2+} release and entry, or in the presence of 1 mM external Ca^{2+} , to prevent rises in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ due to Ca^{2+} release but allowing rises in Ca^{2+} concentration in the vicinity of the Orai1 channels.

Our results indicated that, in the presence of extracellular Ca^{2+} , there was a detectable Orai1–AC8 association, which was unaffected by BAPTA loading or treatment with TG (Figure 2a,b; $n = 6$), as previously reported [19]. Figure 2c–e depict a detectable increase in the Ca^{2+} concentration in the Orai1 vicinity in cells not loaded with BAPTA, as well as, with less intensity but still significant, in BAPTA-loaded cells as detected with G-GECO1.2-Orai1 [24] ($p < 0.05$; $n = 6$), and similar results were obtained using the near plasma membrane Ca^{2+} indicator fura-FFP18 (the initial slopes of the increase in fura-FFP18 fluorescence ratio were 1.0299 ± 0.1325 and 0.3793 ± 0.0205 in control and BAPTA-loaded cells, respectively, and the maximal fura-2 fluorescence ratios were 0.20 ± 0.01 and 0.11 ± 0.01 in control and BAPTA-loaded cells, respectively, Figure S1, Supplementary Materials), which demonstrate that detectable rises in Ca^{2+} concentration in the Orai1 microdomain due to Ca^{2+} influx via Orai1 were still detectable in BAPTA-loaded cells. Cell loading with dimethyl BAPTA was without a significant effect on the resting fura-FFP18 fluorescence ratio (the resting ratios were 0.60 ± 0.03 and 0.61 ± 0.01 in control and BAPTA-loaded cells, respectively). When Ca^{2+} entry was not allowed, treatment with TG resulted in a reduction in the Orai1–AC8 interaction, a response that was maintained when the rise in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ due to Ca^{2+} efflux from the stores was prevented by BAPTA loading (Figure 2a,b; $n = 6$). These findings suggest that Ca^{2+} store depletion itself plays an inhibitory role in the Orai1–AC8 association that was overcome by Ca^{2+} influx via Orai1 channels. Therefore, upon agonist stimulation, the Orai1–AC8 interaction is strongly dependent on Ca^{2+} influx through the channel.

Orai1 is phosphorylated by PKC at residues Ser-27 and Ser-30, an event that negatively regulates Orai1 function [20]. As both serine residues are located within the Orai1 AC8-binding region, we explored whether phosphorylation at Ser-27 and Ser-30 alters Orai1–AC8 interaction. To investigate this issue, cells were transfected with yellow fluorescent protein (YFP)-Orai1, the non-phosphorylatable Orai1S27A/S30A mutant, or the phosphomimetic Orai1S27D/S30D mutant, or they were mock-treated, and the Orai1–AC8 interaction was analyzed by co-immunoprecipitation from cell lysates. Figure 3, bottom panel, depicts that expression of YFP-Orai1 produced a band of the predicted size (approximately 60 kDa). Furthermore, expression of the Orai1S27A/S30A and Orai1S27D/S30D mutants yielded several bands, one at the size of the native Orai1 and other small size bands which might be attributed to Orai1 without post-translational modifications. As shown in Figure 3, our results indicated that AC8 was able to co-immunoprecipitate with YFP-Orai1, as well as with the Orai1S27A/S30A and Orai1S27D/S30D mutants. Therefore, these findings indicate that phosphorylation of Orai1 at Ser-27 and Ser-30 is unlikely to interfere with Orai1 binding to AC8.

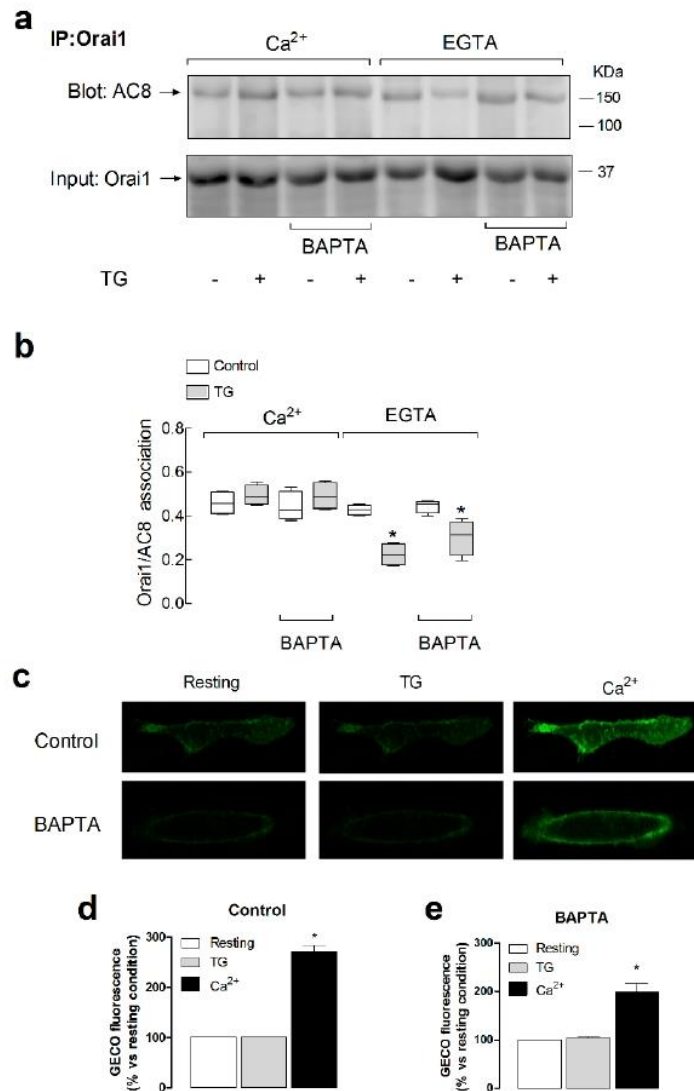


Figure 2. Role of Ca²⁺ mobilization in the Orai1–AC8 interaction. **(a)** MDA-MB-231 cells were loaded with dimethyl BAPTA or left untreated, as indicated, and then suspended in a medium containing 1 mM Ca²⁺ or in a Ca²⁺-free medium (100 μM EGTA added). Cells were treated with 1 μM TG or the vehicle, as indicated, and lysed 1 min later. Whole-cell lysates were immunoprecipitated (IP) with anti-Orai1 antibody. Immunoprecipitates were subjected to 10% SDS-PAGE and subsequent Western blotting with specific anti-AC8 antibody, as indicated. Membranes were reprobed with the antibody used for immunoprecipitation for protein loading control. The panels show results from one experiment representative of five others. Molecular masses indicated on the right were determined using molecular-mass markers run in the same gel. **(b)** The box plot represents the quantification of AC8–Orai1 interaction in resting and TG-treated cells. Results are normalized to the Orai1 expression; * *p* < 0.05 compared to the corresponding control (untreated cells). **(c)** Cells were transfected with G-GECO1.2-Orai1. Forty-eight hours later, cells were suspended in a Ca²⁺-free medium and stimulated with TG (1 μM) for 2 min, followed by addition of CaCl₂ (final concentration 1 mM) to the medium to initiate Ca²⁺ entry. Images are representative of six independent experiments. **(d–e)** Bar graphs represent the quantification of the G-GECO (green genetically encoded Ca²⁺ indicator for optical imaging) fluorescence in cells loaded with dimethyl BAPTA (BAPTA) or left untreated (control), as indicated. Fluorescence was analyzed at rest, 30 s after the addition of 1 μM TG and 30 s after the subsequent addition of CaCl₂ (final concentration 1 mM).

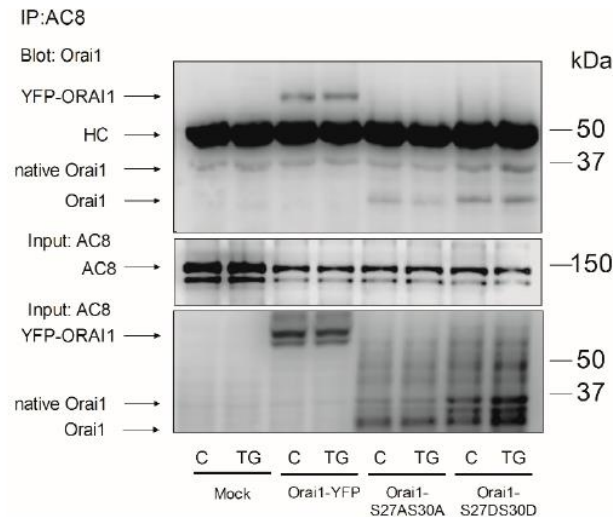


Figure 3. Role of Orai1 phosphorylation at Ser-27 and Ser-30 in the Orai1–AC8 interaction. MDA-MB-231 cells were transfected with pEYFP-Orai1, or the Orai1S27A/S30A and Orai1S27D/S30D mutants, or they were mock-treated, as indicated. Cells were then treated with 1 μ M TG or the vehicle (C) and lysed 1 min later. Whole-cell lysates were immunoprecipitated (IP) with anti-AC8 antibody. Immunoprecipitates were subjected to 10% SDS-PAGE and subsequent Western blotting with specific anti-Orai1 antibody, as indicated. Membranes were reprobed with the anti-AC8 antibody for protein loading control. Alternatively, the cell lysates were subjected to 10% SDS-PAGE and subsequent Western blotting with anti-Orai1 antibody. The panels show results from one experiment representative of five others. Molecular masses indicated on the right were determined using molecular-mass markers run in the same gel. HC: heavy chain of the antibody used for immunoprecipitation; native Orai1: post-translationally modified Orai1; Orai1: Orai1 without post-translational modifications.

2.3. Role of AC8 in the Activation of Store-Operated Ca^{2+} Entry in Breast Cancer MDA-MB-231 Cells

SOCE in MDA-MB-231 cells was reported to be entirely dependent on Orai1 function [3,6]. Hence, we explored the functional role of the interaction between Orai1 and AC8 in these cells. To assess the role of AC8 in SOCE, MDA-MB-231 cells were transfected with two different commercial small interfering RNAs (siRNAs) for AC8 or scramble plasmids to analyze their effect on TG-evoked Ca^{2+} mobilization. As shown in Figure 4a,b, transfection with both plasmids attenuated the AC8 expression by about 50% in 48 h. As depicted in Figure 4c, in cells transfected with scramble plasmids suspended in a Ca^{2+} -free medium, treatment with the SERCA inhibitor TG (1 μ M) resulted in a transient increase in the fura-2 fluorescence ratio due to Ca^{2+} release from the intracellular Ca^{2+} stores. Cell stimulation with TG in a medium containing 1 mM Ca^{2+} resulted in a greater and sustained rise in the fura-2 fluorescence ratio as a result of Ca^{2+} release from the intracellular stores and entry through plasma membrane channels (Figure 4d). Cell transfection with the siAC8 plasmids was without significant effect on the resting fura-2 fluorescence ratio (in the absence of extracellular Ca^{2+} , the resting ratios were 0.27 ± 0.01 , 0.26 ± 0.01 and 0.28 ± 0.01 in cells transfected with scramble plasmid, siAC8#1 and siAC8#2, respectively, while, in the presence of 1 mM extracellular Ca^{2+} , the resting ratios were 0.30 ± 0.02 , 0.32 ± 0.01 and 0.33 ± 0.02 in cells transfected with scramble plasmid, siAC8#1 and siAC8#2, respectively). Furthermore, transfection with the siAC8 plasmids did not modify TG-induced Ca^{2+} release (Figure 4e,g,i). The initial peak fura-2 fluorescence ratios were 0.10 ± 0.01 , 0.10 ± 0.01 , and 0.09 ± 0.02 in cells transfected with scramble plasmid, siAC8#1, or siAC8#2, respectively, thus indicating that AC8 does not have a significant effect on the ability of MDA-MB-231 cells to accumulate Ca^{2+} in the intracellular stores or on the Ca^{2+} leakage rate from the stores. By contrast, attenuation of AC8 expression by transfection of the siAC8 plasmids reduced TG-evoked Ca^{2+} mobilization in the presence of 1 mM extracellular Ca^{2+} (Figure 4f,h,i); the initial slopes of the increase in fura-2 fluorescence

ratio were 0.0065 ± 0.0004 , 0.0036 ± 0.0003 , and 0.0040 ± 0.0002 in cells transfected with scramble plasmid, siAC8#1, or siAC8#2, respectively, while the initial peak fura-2 fluorescence ratios were 0.93 ± 0.02 , 0.64 ± 0.03 , and 0.65 ± 0.02 , in cells transfected with scramble plasmid, siAC8#1, or siAC8#2, respectively). As TG-evoked Ca^{2+} release was unaffected by attenuation of the AC8 expression, this effect should be attributed to a reduction in TG-induced Ca^{2+} influx. If we consider the area under the curve (AUC) or the entry of Ca^{2+} stimulated by TG, corrected by subtraction of the response to TG in the absence of external Ca^{2+} , transfection of the siAC8#1 and siAC8#2 plasmids significantly reduced SOCE by $40 \pm 2\%$ and $31 \pm 2\%$, respectively (Figure 4j; $p < 0.05$).

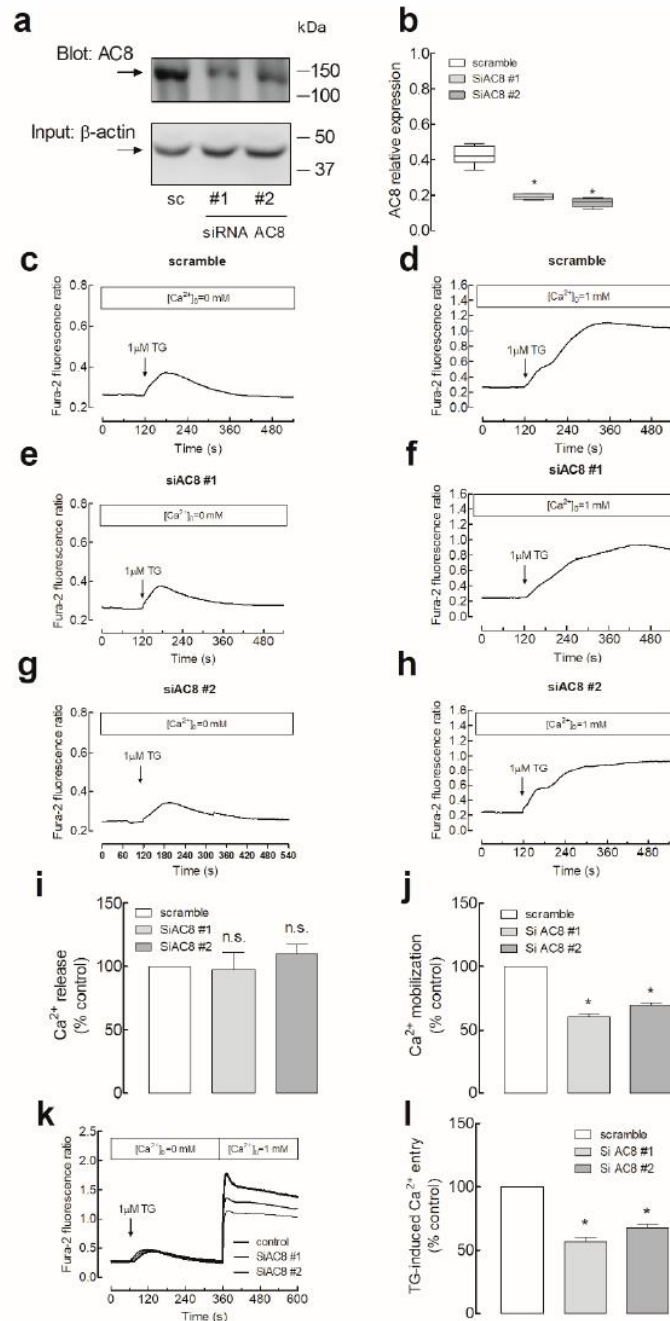


Figure 4. AC8 is required for full store-operated Ca^{2+} entry activation in MDA-MB-231 breast cancer cells. (a–b) MDA-MB-231 cells were transfected with two different small interfering RNA (siRNA) AC8

plasmids (siAC8#1 and siAC8#2) or a scramble plasmid (sc), as indicated. Forty-eight hours after transfection, cells were lysed and subjected to Western blotting with anti-AC8 antibody, followed by reprobing with anti- β -actin antibody for protein loading control (a). Molecular masses indicated on the right were determined using molecular-mass markers run in the same gel. (b) The box plot represents AC8 expression under the different experimental procedures normalized to the β -actin content. (c–j) MDA-MB-231 cells were transfected with siAC8#1, siAC8#2, or scramble plasmids, as indicated. Forty-eight hours after transfection, fura-2-loaded cells were perfused with a Ca^{2+} -free medium (100 μM EGTA added) or with a medium containing 1 mM CaCl_2 , as indicated, and then stimulated with TG (1 μM). (i and j) Bar graphs represent TG-induced Ca^{2+} release (i) and mobilization (j) in MDA-MB-231 cells transfected with the indicated plasmids. Data are expressed as the AUC of means \pm SEM (standard error of the mean) of 40 cells/day/3–5 days and presented as a percentage of control (cells transfected with scramble plasmid). (k and l) MDA-MB-231 cells were transfected with siAC8#1, siAC8#2, or scramble plasmids, as indicated. Forty-eight hours after transfection, fura-2-loaded cells were perfused with a Ca^{2+} -free medium (100 μM EGTA added) and then stimulated with 1 μM TG, followed by addition of CaCl_2 (final concentration 1 mM) to the medium to initiate Ca^{2+} influx. (l) Bar graphs represent TG-induced Ca^{2+} entry under the different experimental conditions. Data are expressed as the AUC of means \pm SEM of 40 cells/day/3–5 days and presented as a percentage of control (cells transfected with scramble plasmid); * $p < 0.05$ as compared to scramble-treated cells.

Similar results were observed when we estimated TG-induced Ca^{2+} entry using the Ca^{2+} add-back protocol. As shown in Figure 4k, transfection of siAC8#1 or #2 plasmids significantly attenuated SOCE (the initial peak fura-2 fluorescence ratios upon addition of Ca^{2+} to TG-treated cells were 1.68 ± 0.35 , 0.90 ± 0.05 , and 1.09 ± 0.04 in cells transfected with scramble plasmid, siAC8#1, or siAC8#2, respectively, and the initial slopes of the increase in fura-2 fluorescence ratio were 0.0448 ± 0.0091 , 0.0213 ± 0.0022 , and 0.0207 ± 0.0029 in cells transfected with scramble plasmid, siAC8#1, or siAC8#2, respectively).

In an attempt to ascertain more specifically the role of AC8 in Ca^{2+} influx through Orai1, we analyzed the entry of Ca^{2+} in cells expressing Orai1 and the Orai1-activating small fragment (OASF; amino acids 233–474) of STIM1. MDA-MB-231 cells were transfected with expression plasmids for pEYFP-Orai1 and pEYFP-OASF in combination with the siAC8 or scramble plasmids. Expression of Orai1, OASF, or both in the absence or presence of the siAC8 plasmids did not significantly alter the resting fura-2 fluorescence ratio (resting ratios were 0.30 ± 0.01 , 0.32 ± 0.01 , 0.30 ± 0.01 , 0.32 ± 0.01 , 0.30 ± 0.01 , and 0.31 ± 0.01 in cells transfected with scramble plasmid, Orai1, OASF, Orai1 + OASF, Orai1 + OASF + siAC8#1, and Orai1 + OASF + siAC8#2, respectively). As shown in Figure 5, expression of Orai1 alone had a negligible effect, if any, on the fura-2 fluorescence ratio, as previously reported [25]. On the other hand, OASF expression significantly enhanced Ca^{2+} influx in these cells, which expressed a significant amount of endogenous Orai1 (Figure 5c). Co-expression of Orai1 and OASF resulted in a robust activation of Ca^{2+} entry independently of Ca^{2+} store depletion as compared to mock-treated cells, which did not display a significant constitutive Ca^{2+} entry. Ca^{2+} entry induced by co-expression of Orai1 and OASF was impaired by AC8 silencing (Figure 5e,f,g; $p < 0.05$), thus suggesting that AC8 directly modulates Ca^{2+} entry through Orai1 in MDA-MB-231 cells. The initial peak fura-2 fluorescence ratios were 0.09 ± 0.01 , 0.10 ± 0.01 , 0.28 ± 0.02 , 0.84 ± 0.07 , 0.13 ± 0.01 , and 0.13 ± 0.01 in cells transfected with scramble plasmid, Orai1, OASF, Orai1 + OASF, Orai1 + OASF + siAC8#1, and Orai1 + OASF + siAC8#2, respectively.

The role of AC8 in Orai1 channel function in MDA-MB-231 cells was further explored by testing the effect of AC8 overexpression on Ca^{2+} influx in cells expressing exogenous Orai1 and OASF. Cell transfection with AC8 plasmid was without significant effect on the resting fura-2 fluorescence ratio (in the absence of extracellular Ca^{2+} , the resting ratios were 0.34 ± 0.01 , 0.36 ± 0.01 , 0.32 ± 0.01 , and 0.32 ± 0.01 in cells transfected with Orai1 + OASF, Orai1 + OASF + AC8, empty vector (mock), and AC8 overexpression plasmid alone, respectively; Figure 6). As shown in Figure 6a, YFP-AC8 was efficiently expressed in MDA-MB-231 cells. Interestingly, Ca^{2+} entry induced by co-expression of Orai1 and OASF,

estimated as the AUC, was significantly enhanced by 30% upon AC8 overexpression (Figure 6b,c; $p < 0.05$). The initial peak fura-2 fluorescence ratios were 0.84 ± 0.02 , 1.01 ± 0.03 , 0.89 ± 0.04 , and 1.11 ± 0.05 in cells transfected with Orai1 + OASF, Orai1 + OASF + AC8, empty vector (mock), and AC8 overexpression plasmid alone, respectively, whereby the two latter ones occurred upon stimulation with TG (see Figure 6d,e). Furthermore, the initial slope of the increase in fura-2 fluorescence ratio upon stimulation with TG in the presence of 1 mM extracellular Ca^{2+} was also enhanced by AC8 overexpression from 0.0062 ± 0.0003 to 0.0080 ± 0.0003 in mock-treated and AC8-transfected cells, respectively (Figure 6d,e). These findings further suggest that AC8 plays a positive role in Orai1 channel function in MDA-MB-231 cells. Accordingly, Ca^{2+} mobilization evoked by TG in the presence of 1 mM extracellular Ca^{2+} was enhanced.

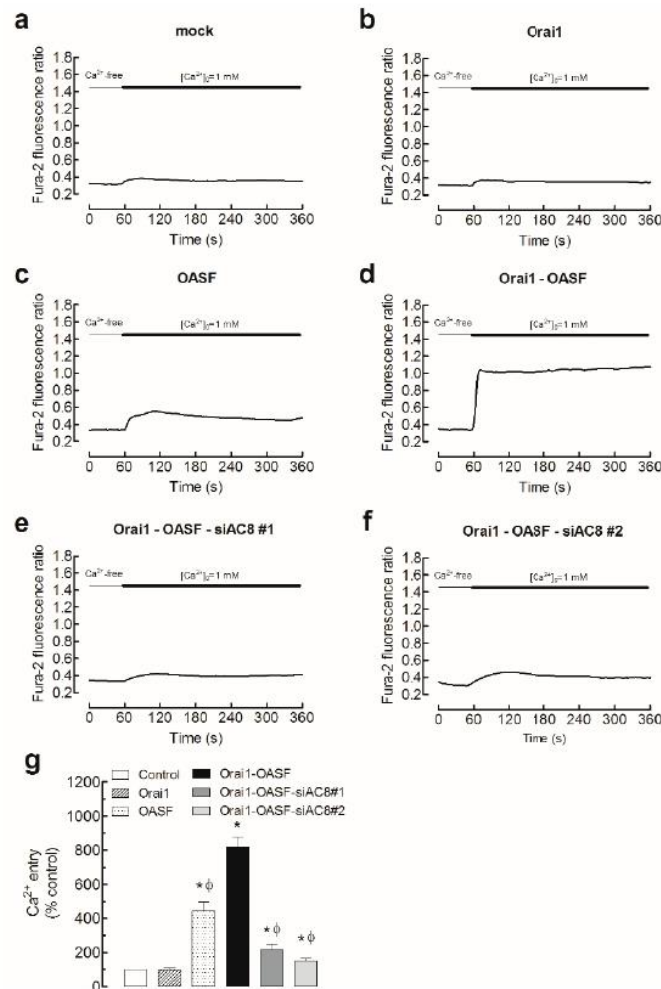


Figure 5. AC8 silencing attenuates Ca^{2+} influx mediated by Orai1-activating small fragment (Orai1-OASF) in MDA-MB-231 breast cancer cells. MDA-MB-231 cells were transfected with Orai1 (b), OASF (c), both transfection plasmids (d–f), or empty vector (mock, a), as indicated. Cells were also transfected with siAC8#1 (e), siAC8#2 (f), or scramble plasmid (d). Forty-eight hours after transfection, fura-2-loaded cells were perfused with a Ca^{2+} -free medium (100 μM EGTA added), followed by reintroduction of external Ca^{2+} (final concentration 1 mM) to initiate Ca^{2+} entry. (g) Bar graphs represent Ca^{2+} entry in MDA-MB-231 cells transfected with the indicated plasmids. Data are expressed as means \pm SEM of 40 cells/day/3–5 days and presented as a percentage of control cells; * $p < 0.05$ as compared to control, ϕ $p < 0.05$ as compared to cells transfected with Orai1 and OASF expression plasmids and scramble RNA.

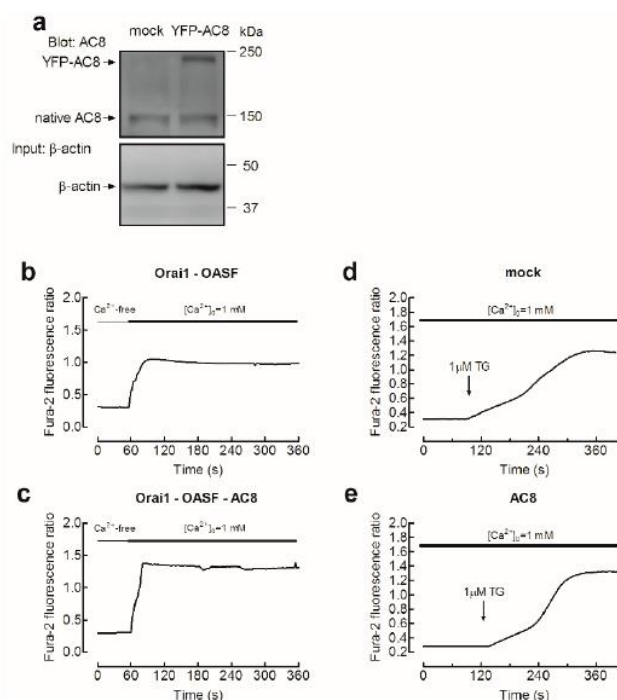


Figure 6. AC8 overexpression enhances store-operated Ca^{2+} influx in MDA-MB-231 breast cancer cells. (a) MDA-MB-231 cells were transfected with YFP-AC8 transfection plasmid or empty vector (mock), as indicated. Forty-eight hours after transfection, cells were lysed and subjected to Western blotting with anti-AC8 antibody, followed by reprobing with anti- β -actin antibody for protein loading control. Molecular masses indicated on the right were determined using molecular-mass markers run in the same gel. (b,c) Cells were transfected with Orai1 and OASF plasmids, as well as either with YFP-AC8 plasmid (c) or empty vector (b), as indicated. Forty-eight hours after transfection, fura-2-loaded cells were perfused with a Ca^{2+} -free medium (100 μ M EGTA added), followed by reintroduction of external Ca^{2+} (final concentration 1 mM) to initiate Ca^{2+} entry. (d,e) Cells were transfected with YFP-AC8 expression plasmid (e) or empty vector (mock, b), as indicated. Forty-eight hours after transfection, fura-2-loaded cells were perfused with a medium containing 1 mM $CaCl_2$, as indicated, and then stimulated with TG (1 μ M). Traces are representative of 40 cells/day/3–5 days.

2.4. AC8 Prevents Phosphorylation of Orai1 at Ser-27 and -30

We further explored the mechanism involved in the regulation of Orai1 channel function by AC8. A recent study reported that Ca^{2+} entry via Orai1 results in the activation of AC8, which, in turn, generates cAMP and activates PKA. The latter phosphorylates Orai1 at Ser-34, leading to Ca^{2+} -dependent inactivation of the channel [21]. Furthermore, Orai1 phosphorylation at Ser-27 and -30 is associated with suppression of Orai1 channel function [20]. As phosphorylation of Ser-27, -30, and -34 is associated with Orai1 inactivation, and as these residues are located within the Orai1 AC8-binding sequence, we further evaluated whether interaction with AC8 prevents phosphorylation of Orai1 at serine residues. To investigate this issue, we assessed the phosphoserine content of the AC8-associated and AC8-independent Orai1 subsets in MDA-MB-231 cells. Resting cells and cells stimulated with TG were used to elucidate the involvement of Ca^{2+} store depletion in Orai1 Ser-27 and Ser-30 phosphorylation. To analyze Orai1 phosphorylation in the AC8-associated and independent Orai1 subsets, cell lysates were immunoprecipitated with anti-AC8 antibody, and the supernatants (AC8-independent Orai1 fraction), as well as the proteins eluted from the pellet (AC8-bound Orai1), were immunoprecipitated again with anti-Orai1 antibody, followed by Western blotting with anti-phosphoserine antibody. Our results showed a detectable phosphorylation of the AC8-independent Orai1 fraction at serine residues in resting cells, which was maintained upon treatment

and subsequent Western blotting with specific anti-phosphoserine antibody, as indicated. Membranes were reprobed with anti-Orai1 and anti-AC8 antibodies for protein loading control. The panels show results from one experiment representative of five others. Molecular masses indicated on the right were determined using molecular-mass markers run in the same gel; * nonspecific bands. (b) MDA-MB-231 cells were transfected with YFP-AC8 (AC8) transfection plasmid, siAC8#1, siAC8#2 or empty vector (Mock), as indicated. Forty-eight hours after transfection, cells were lysed. Whole-cell lysates were immunoprecipitated (IP) with anti-Orai1 antibody. Immunoprecipitates were subjected to 10% SDS-PAGE and subsequent Western blotting with specific anti-phosphoserine antibody, as indicated. Membranes were reprobed with the anti-Orai1 antibody for protein loading control and anti-AC8. The panels show results from one experiment representative of four others. Molecular masses indicated on the right were determined using molecular-mass markers run in the same gel. The box plot represents the Orai1 phosphoserine content relative to the Orai1 expression.

2.5. AC8 Plays a Relevant Role in MDA-MB-231 Cell Migration

Ca²⁺ influx via Orai1 channels was reported to play a relevant role in the development of a number of cancer hallmarks, including cell migration [3,26–28]. Next, we assessed the relevance of AC8 in the ability of these cell lines to migrate. AC8 is a point of convergence between Ca²⁺ and cAMP; therefore, we firstly explored the effect of increasing cAMP levels in MDA-MB-231 cell migration using the well-established wound healing assay. Cells were seeded, scratched, and cultured in medium supplemented with 1% serum to prevent further cell growth. Migration of cells was quantitated as described in Section 4. As shown in Figure 8, MDA-MB-231 cells reduced the wound size during the first 48 h, and cell migration was enhanced by stimulation of MDA-MB-231 cells with the cholinergic agonist carbachol (CCh; 10 µM). Cell treatment with the cell permeant cAMP analogue and PKA activator [29], 8-bromo-cAMP (8-Br-cAMP; 300 µM), enhanced the ability of MDA-MB-231 cells to migrate to a similar extent as CCh, so that stimulation with CCh in the presence of 8-Br-cAMP did not increase the effect of 8-Br-cAMP alone (Figure 8; *n* = 6). To further explore the role of PKA in MDA-MB-231 cell migration, cells were pretreated for 30 min with the PKA inhibitor KT-5720 (1 µM) before they were scratched. Consistent with the results obtained with 8-Br-cAMP, treatment with KT-5720 significantly attenuated migration of CCh-stimulated and untreated MDA-MB-231s (Figure 8; *p* < 0.05; *n* = 6). Similar results were observed when we tested the effect of 8-Br-cAMP and KT-5720 on MCF7 cell migration (Figure S2, Supplementary Materials). Altogether, these findings indicate that the cAMP–PKA pathway plays an important role in luminal MCF7 and triple-negative MDA-MB-231 breast cancer cell migration.

Next, we more specifically explored the relevance of AC8 in the ability of MDA-MB-231 cells to migrate. MDA-MB-231 cells were transfected with siAC8#1 and siAC8#2 or scramble plasmids, and cell migration was evaluated. As shown in Figure 9, MDA-MB-231 cells transfected with scramble plasmid significantly reduced the wound size during the first 48 h. AC8 expression attenuation significantly attenuated MDA-MB-231 cell migration as compared to cells transfected with scramble plasmid (Figure 9; *p* < 0.05; *n* = 6). Similarly, transfection of siAC8#1 and siAC8#2 plasmids significantly attenuated cell migration stimulated by CCh. These findings indicate that AC8 plays an important role in MDA-MB-231 cell migration. As depicted in Figure S3 (Supplementary Materials), attenuation of AC8 expression in MCF7 by transfection of siAC8#1 and siAC8#2 plasmids significantly reduced migration whether in non-stimulated or CCh-stimulated cells (*n* = 6). By contrast, AC8 expression silencing did not affect the ability of non-tumoral breast epithelial MCF10A cells to migrate (Figure S4, Supplementary Materials; *n* = 6), which is consistent with the low expression of TRPC6 (canonical transient receptor potential channel-6) in this cell line (see Figure 1c). These findings indicate that AC8 plays an important role in cell migration specifically in breast cancer cells.

Phosphorylation and activation of the focal adhesion kinase (FAK) was shown to play an important role in cell migration and invasion [30]. FAK is a 125-kDa tyrosine kinase associated with focal adhesions [31], and phosphorylation at Tyr-397 is generally accepted as the initial step in FAK

activation [32]. We previously found that Orai1 is involved in FAK phosphorylation in cancer cells [27]; therefore, we investigated the role of AC8 in FAK phosphorylation in MDA-MB-231 cells. As illustrated in Figure 10, AC8 expression attenuation by transfection of siAC8 plasmids significantly inhibited FAK phosphorylation at Tyr-397 as compared to cells transfected with scramble plasmid. These observations indicate that AC8 is required for full tyrosine phosphorylation and activation of FAK, which might underlie its role in MDA-MB-231 cell migration.

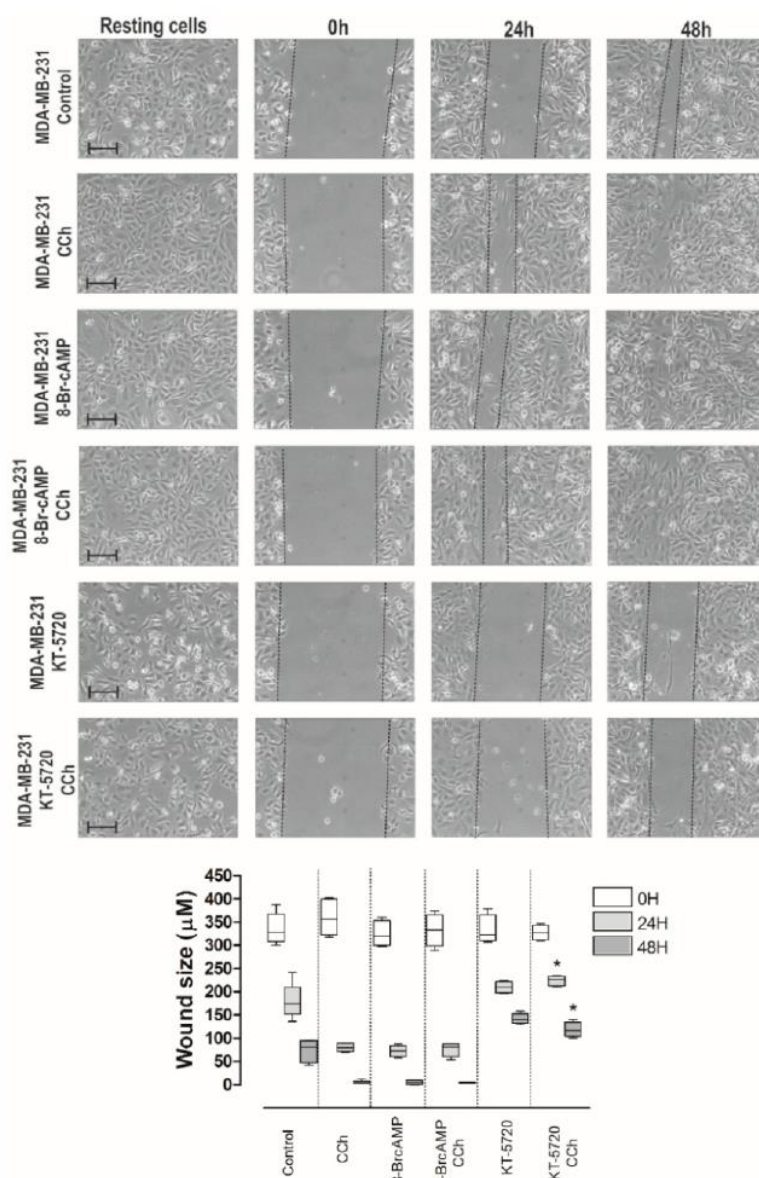


Figure 8. Role of the cAMP–PKA pathway in MDA-MB-231 cell migration. MDA-MB-231 cells were stimulated with 10 μ M carbachol (CCh) or the vehicle in the absence or presence of 8-bromo-cAMP (8-Br-cAMP; 300 μ M) or KT-5720 (1 μ M), and subjected to a wound healing assay as described in Section 4. Images were acquired at 0, 24, and 48 h from the beginning of the assay. The dotted lines define the areas lacking cells. The bars represent 100 μ m. The box plot represents the wound size, in micrometers, at the different conditions ($n = 6$); * $p < 0.05$ compared to the corresponding time in CCh-treated cells.

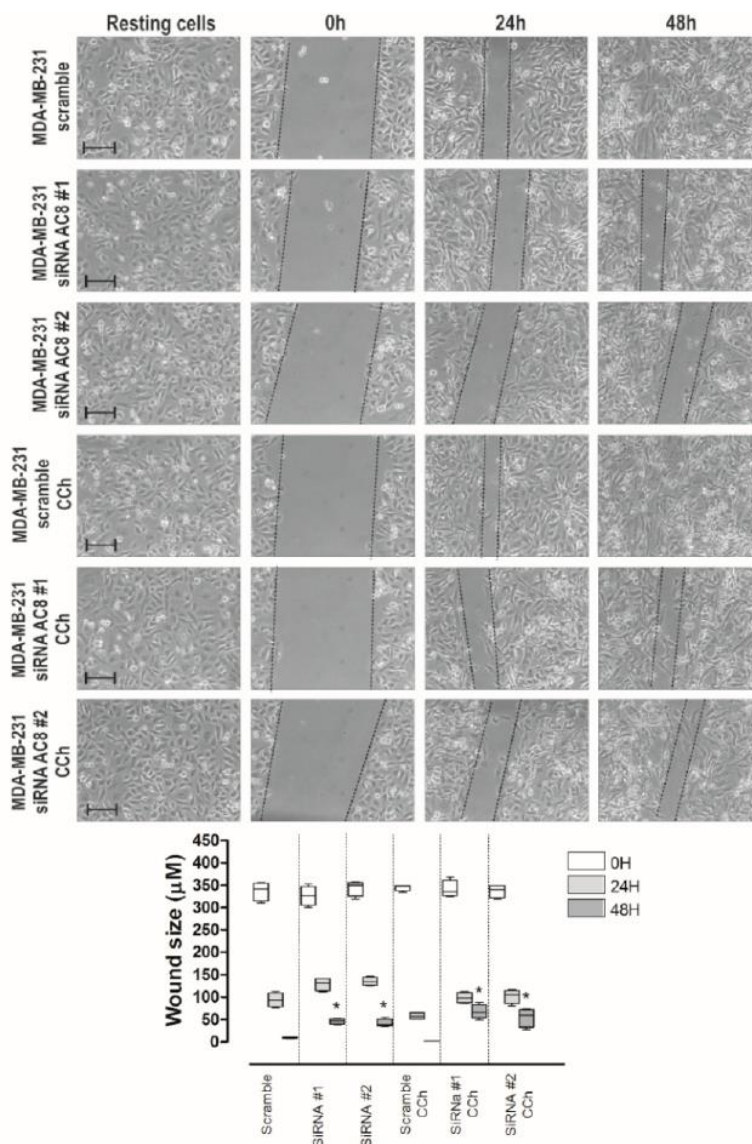


Figure 9. Role of AC8 in MDA-MB-231 cell migration. MDA-MB-231 cells were transfected with siAC8#1, siAC8#2, or scramble plasmid, as indicated. Forty-eight hours after transfection, cells were stimulated with 10 µM CCh or the vehicle and subjected to a wound healing assay as described in Section 4. Images were acquired at 0, 24, and 48 h from the beginning of the assay. The dotted lines define the areas lacking cells. The bars represent 100 µm. The box plot represents the wound size, in micrometers, at the different conditions ($n = 6$); * $p < 0.05$ compared to the corresponding time in cells transfected with scramble plasmid.

2.6. AC8 Is Required for TNBC Cell Proliferation

We further explored the role of AC8 in cell proliferation in TNBC cells. Western blot analysis of whole-cell lysates from MCF10A and MCF7, as well as the TNBC cell lines MDA-MB-231, BT20, and Hs578T, with a specific anti-AC8 antibody revealed that this protein is highly expressed in MCF7 and TNBC cells (Figure 11a). Next, we explored the role of AC8 in MDA-MB-231 and Hs578T cells. As shown in Figure 4a and 11c, cell transfection with siAC8#1 and siAC8#2 significantly attenuated AC8 expression in MDA-MB-231 and Hs578T cells, respectively ($p < 0.05$; $n = 4$). Silencing AC8 protein expression significantly attenuated MDA-MB-231 and Hs578T cell proliferation at all times investigated

as compared to cells transfected with scramble plasmid (Figure 11b,c; $p < 0.05$; $n = 4$). Therefore, our observations reveal that AC8 plays an important role in TNBC cell proliferation.

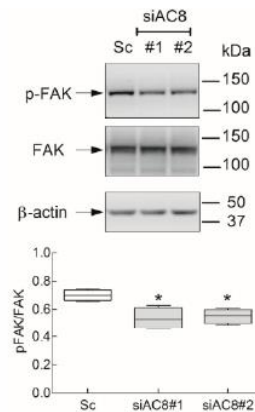


Figure 10. Role of AC8 in focal adhesion kinase (FAK) tyrosine phosphorylation in MDA-MB-231 cells. MDA-MB-231 cells were transfected with siAC8#1, siAC8#2, or scramble plasmid (Sc), as indicated. Forty-eight hours later, cells were lysed and subjected to 10% SDS-PAGE and Western blotting with anti-phospho-FAK (Y³⁹⁷) or anti-FAK specific antibodies. Membranes were reprobed with anti-β-actin antibody for protein loading control. Blots are representative of five separate experiments. The box plot represents FAK tyrosine phosphorylation presented as the phospho-FAK/total FAK ratio.

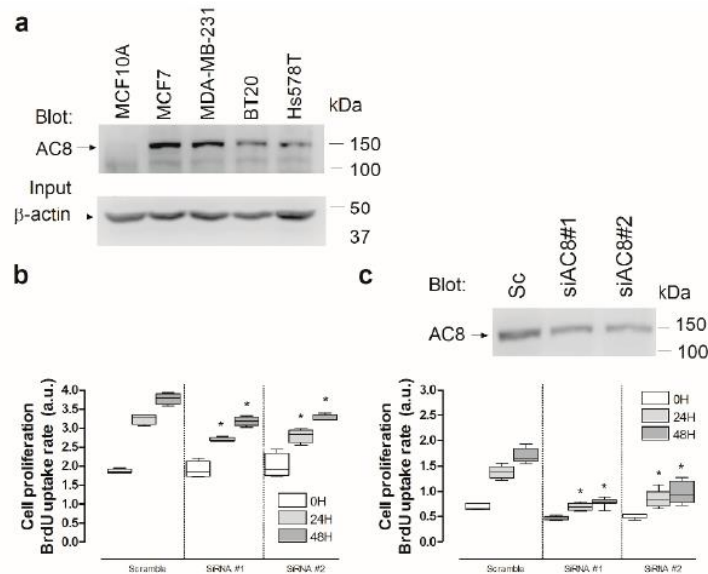


Figure 11. Role of AC8 in triple-negative breast cancer (TNBC) cell proliferation. (a) Non-tumoral breast epithelial MCF10A, luminal MCF7 breast cancer, and TNBC cells (MDA-MB-231, BT20, and Hs578T) were lysed and subjected to Western blotting with anti-AC8 antibody, followed by reprobing with anti-β-actin antibody for protein loading control. (b,c) MDA-MB-231 (b) and Hs578T (c) cells were transfected with siAC8#1, siAC8#2, or scramble plasmid (Sc), as indicated. Forty-eight hours later, cell proliferation was assessed for a further 24 and 48 h using the bromodeoxyuridine (BrdU) cell proliferation assay kit, as described in Section 4. The box plot represents cell proliferation 0, 24, and 48 h after cell transfection, presented as BrdU uptake rate; * $p < 0.05$ compared to the corresponding control (cells transfected with scramble plasmid). (c, top panel) Hs578T cells were lysed and subjected to 10% SDS-PAGE and Western blotting with anti-AC8 antibody. Blots are representative of three separate experiments.

3. Discussion

Orai1 was reported to play a major role in Ca^{2+} influx in the TNBC cell line MDA-MB-231. SOCE, a major mechanism for Ca^{2+} entry in this cell type, was found to be strongly dependent on Orai1 [6], whose plasma membrane expression is modulated by TRPC6 channels [3]. Furthermore, Orai1 is involved in store-independent Ca^{2+} influx through a functional interaction with Kv10.1 potassium channels that mediate serum-induced migration [9]. Orai1 Ca^{2+} channels play an important functional role in breast cancer cells supporting a number of cancer hallmarks such as migration, proliferation, or survival [33–35].

The Orai1 N-terminal intracellular region contains several phosphorylation sites. Ser-27 and -30 are the main phosphorylation sites targeted by PKC β 1 [20], while Ser-34 was found to be a target of protein kinase G (PKG) [36] and, more recently, Zhang and coworkers revealed that Ser-34 is also a PKA phosphorylation site [21]. Phosphorylation of Orai1 at any of these serine residues was demonstrated to result in Orai1 channel inactivation and reduction of Ca^{2+} influx. These three serines are located in the Orai1 AC8-binding sequence (amino acids 26–34). Here, we show that AC8 binding to Orai1 attenuates Orai1 serine phosphorylation in MDA-MB-231 cells, leading to enhanced Ca^{2+} entry through the channel. This statement is based on different observations. First of all, we found that AC8 and the Orai1 α and Orai1 β variants are overexpressed in breast cancer MDA-MB-231 and MCF7 cells as compared to non-tumoral breast epithelial cells. Secondly, Orai1 α , but not Orai1 β lacking the N-terminal 63 amino acids, constitutively interacts with AC8. Thirdly, while the subset of Orai1 not associated with AC8 is phosphorylated in serine residues both under resting conditions and upon stimulation with the SERCA inhibitor TG, the AC8-associated Orai1 subset is not serine-phosphorylated, thus suggesting that AC8 interaction might interfere with Orai1 phosphorylation at Ser-27, -30, and -34. Fourthly, AC8 overexpression impairs Orai1 serine phosphorylation. Lastly, AC8 expression silencing significantly reduces TG-induced Ca^{2+} entry, as well as Ca^{2+} influx mediated by co-expression of Orai1 with the STIM1 OASF region in these cells; conversely, AC8 overexpression leads to enhanced Ca^{2+} influx in cells co-expressing Orai1 and OASF, as well as TG-evoked Ca^{2+} influx.

A recent report by Zhang and coworkers showed an elegant functional interaction between Orai1 and AC8, where AC8 activation mediates an Orai1 inactivation mechanism driven by local cAMP and PKA activation that, in turn, phosphorylates Orai1 at Ser-34 [21]. Here, we show that binding of AC8 to Orai1, at the sequence between amino acids 26 and 34, impairs phosphorylation of Orai1 at Ser-27, Ser-30, and Ser-34, the Orai1 phosphorylation sites characterized at present [20,21,36]. Therefore, according to previous results [21], Ca^{2+} influx through the Orai1 subset associated with AC8 should be involved in the inactivation of the AC8-independent Orai1 channels. In naïve cells, with a normal AC8 expression, AC8 is expected to promote inactivation of a large subset of Orai1 channels; however, in breast cancer MDA-MB-231 cells, which predominantly overexpress AC8 over Orai1, the AC8/Orai1 stoichiometry is shifted in favor of AC8 and, subsequently, the subset of AC8-independent Orai1 is expected to be reduced, and the AC8-induced Orai1 inactivation is, thus, impaired (Figure 12).

We further explored the functional relevance of the AC8–Orai1 interaction in MDA-MB-231 cells. In breast cancer cells, Orai1 was reported to play an important role in migration [37,38] and the present study provides evidence for a role of AC8 supporting breast cancer cell migration. Silencing AC8 expression attenuates migration of resting and agonist stimulated MDA-MB-231 cells, while the same experimental maneuver was without effect in the non-tumoral breast epithelial MCF10A cell line, an observation that is likely attributed to the low AC8 expression in this cell line. The role of AC8 in cell migration is not specific to TNBC cells, as similar results were observed in the luminal breast cancer MCF7 cell line, which exhibits some common features with the MDA-MB-231 cell line, such as AC8 and Orai1 overexpression. While the role of AC8 in cell migration might be attributed to impairment of Orai1 inactivation and, thus, the support of Ca^{2+} influx, we cannot rule out the possibility that cAMP generation by AC8 also plays a role in breast cancer cell migration, as PKA activation in MDA-MB-231 and MCF7 cells by the cAMP analogue 8-bromo-cAMP per se enhances cell migration and, conversely, pharmacological PKA inhibition attenuates it.

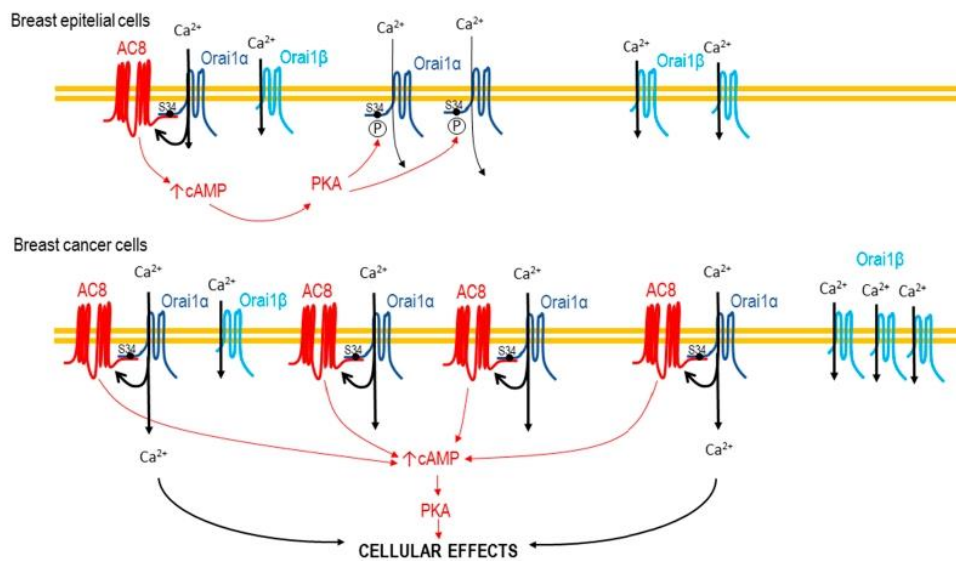


Figure 12. Cartoon summarizing the impairment of phosphorylation-dependent Orai1 inactivation by AC8 overexpression. In non-tumoral breast epithelial cells, Ca^{2+} influx via Orai1 activates AC8, which, in turn, results in the activation of PKA, leading to inactivation of a large subset of AC8-independent Orai1 channels. In breast cancer MDA-MB-231 cells, the greater AC8 overexpression modifies the AC8/Orai1 stoichiometry, thus preventing phosphorylation-dependent Orai1 inactivation.

Finally, we investigated the mechanism underlying the role of AC8 in MDA-MB-231 cell migration. Focal adhesion turnover is essential for cell migration, and the cytosolic tyrosine kinase FAK plays a central role in the dynamics of focal adhesions [39]. Hence, we assessed whether the role of AC8 in cell migration might be attributed to the regulation of FAK phosphorylation at Tyr-397, which is used as an indicator of FAK activation [40,41]. Our results indicate that FAK phosphorylation at Tyr-397 is strongly dependent on AC8 expression, thus suggesting that FAK activation might underlie the participation of AC8 in MDA-MB-231 cell migration.

We further observed that AC8 plays a relevant role in TNBC cell proliferation, another cellular function regulated by SOCE in breast cancer cells [3].

4. Materials and Methods

4.1. Reagents

Fura-2 acetoxyethyl ester (fura-2/AM) was from Molecular Probes (Leiden, The Netherlands). TG, rabbit polyclonal anti-Orai1 antibody (catalog number O8264, epitope: amino acids 288–301 of human Orai1), rabbit polyclonal anti- β -actin antibody (catalog number A2066, epitope: amino acids 365–375 of human β -actin), KT5720, 8-bromoadenosine 3'-5'-cyclic monophosphate sodium, BAPTA (1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane- N,N,N',N' -tetraacetic acid tetrakis(acetoxyethyl ester)), EGTA (ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)- N,N,N',N' -tetraacetic acid), HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid), EDTA (ethylenedinitrilotetraacetic acid) and bovine serum albumin (BSA) were from Sigma (St Louis, MO, USA). Rabbit monoclonal anti-FAK antibody (catalog number ab40794, epitope: within amino acids 700–800 of human FAK) and rabbit monoclonal anti-FAK (phospho Y-397) antibody (catalog number ab81298) were from Abcam (Cambridge, UK). Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin G (IgG) antibody and goat anti-rabbit IgG antibody were from Jackson laboratories (West Grove, PA, USA). Clean-Blot™ IP Detection Reagent, carbamylcholine chloride (carbachol), rabbit polyclonal anti-adenylylate cyclase 8 antibody (catalog number PA5-72589, epitope: amino acids 946–972 of human adenylylate cyclase 8), SuperSignal® West Dura extended duration substrate reagent, Silencer® Adenylyl

cyclase 8 pre-designed siRNAs (Ids#: 119586 and 119587), and Silencer® Select Negative Control siRNA were from ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA). PNGase F from *Elizabethkingia miricola* was from Promega Corporation (Madison, WI, USA) DharmaFECT kb transfection reagent was from Dharmacon Inc (Lafayette, CO, USA). Protein A agarose was from Merck-Millipore (Burlington, MA, USA). Plasmids used were kindly provided by Christoph Romanin (YFP-Orai1 and YFP-OASF; University of Linz, Linz, Austria), Michelle Halls (YFP-adenylyl cyclase 8; Monash University, Australia), and Agustin Guerrero (Flag-Orai1-S27A/S30A and Flag-Orai1-S27D/S30D; CINVESTAV, Mexico). G-GECO1.2-Orai1 was a gift from Michael Cahalan (Addgene plasmid #73562; <http://n2t.net/addgene:73562>; Research Resource Identifier: Addgene_73562). Fura-FFP18/AM was from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). All other reagents were of analytical grade.

4.2. Cell Culture and Transfection

The MCF10A cell line was provided by Dr. Potier-Cartreau (Université François Rabelais Tours, France). MCF7 and MDA-MB-231 cell lines were obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Hs578T cells were provided by Dr. Benitez (CNIO, Madrid, Spain). Cells were cultured up to 20–25 passages at 37 °C with 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)-F12 (MCF10A) or DMEM (MCF7 and MDA-MB-231), supplemented with 10% (*v/v*) horse or fetal bovine serum, respectively, and 100 U/mL penicillin and streptomycin, as described previously [3]. For Western blotting and immunoprecipitation assays, cells (2×10^6) were plated in 75-cm² flasks and cultured for 48–72 h, while, for calcium imaging, wound healing assay, and confocal determination of G-GECO1.2 fluorescence assays, cells (2×10^5 to 2.5×10^5) were seeded in a 35-mm six-well multidish.

MDA-MB-231 cells were transfected with expression plasmids for YFP-Orai1, YFP-AC8, YFP-OASF, Flag-Orai1-S27A/S30A, and Flag-Orai1-S27D/S30D or scramble plasmid using DharmaFECT kb transfection reagent. Plasmids were used at 1 µg/mL. AC8 siRNAs and negative control siRNA were also transfected into cell using DharmaFECT kb transfection reagent. siRNAs were used for silencing experiments at 1 µg/mL.

4.3. Measurement of Cytosolic Free-Calcium Concentration ($[Ca^{2+}]_c$)

Cells were loaded with fura-2 by incubation with 2 µM fura 2/AM for 30 min at 37 °C as described previously [42]. Coverslips with cultured cells were mounted on a perfusion chamber and placed on the stage of an epifluorescence inverted microscope (Nikon Eclipse Ti2, Amsterdam, The Netherlands) with an image acquisition and analysis system for videomicroscopy (NIS-Elements Imaging Software, Nikon, Amsterdam, The Netherlands). Cells were continuously superfused at room temperature with HEPES-buffered saline (HBS) containing (in mM) 125 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 5 glucose, and 25 HEPES, pH 7.4, supplemented with 0.1% (*w/v*) BSA. Cells were examined at 40× magnification (Nikon CFI S FLUOR 40× Oil, Amsterdam, The Netherlands) and were alternatively excited with light from a xenon lamp passed through a high-speed monochromator Optoscan ELE 450 (Cairn Research; Faversham, UK) at 340/380 nm. Fluorescence emission at 505 nm was detected using a cooled digital sCMOS camera Zyla 4.2 (Andor; Belfast, UK) and recorded using NIS-Elements AR software (Nikon; Tokyo, Japan). Fluorescence ratio (F₃₄₀/F₃₈₀) was calculated pixel by pixel, and the data were presented as $\Delta F_{340}/F_{380}$, as previously described [13,43,44]. TG-evoked Ca²⁺ release and Ca²⁺ mobilization, as well as constitutive Ca²⁺ influx in cells co-expressing YFP-Orai1 and YFP-OASF, were estimated as the area under the curve (AUC) measured as the integral of the rise in fura-2 fluorescence ratio for 2.5 min after the addition of TG in the absence or presence of extracellular Ca²⁺, respectively, taking a sample every second. To compare the rate of increase in fura-2 fluorescence between different treatments we used the constant of the exponential increase. Traces were fitted to the equation: $y = A(1 - e^{-K_1 T}) e^{-K_2 T}$, where K₁ is the constant of the exponential increase.

4.4. Measurement of Near-Plasma-Membrane Free-Calcium Concentration

Cells were incubated with 5 μ M fura-FFP18/AM for 2 h at 37 °C as described previously [45]. Coverslips with cultured cells were mounted on a perfusion chamber and placed on the stage of an epifluorescence inverted microscope (Nikon Eclipse Ti2, Amsterdam, The Netherlands) with an image acquisition and analysis system for videomicroscopy (NIS-Elements Imaging Software, Nikon). Cells were continuously superfused with HBS supplemented with 0.1% (*w/v*) BSA at room temperature and were examined at 40 \times magnification (Nikon CFI SFLUOR40 \times Oil, Amsterdam, The Netherlands). Cells were alternatively excited with light from a xenon lamp passed through a high-speed monochromator Optoscan ELE 450 (Cairn Research; Faversham, UK) at 335 and 364 nm, and fluorescence emission, at 490 and 502 nm, respectively, was detected using a cooled digital sCMOS camera Zyla 4.2 (Andor; Belfast, UK) and recorded using NIS-Elements AR software (Nikon, Tokyo, Japan). Fluorescence ratio (F₃₃₅/F₃₆₄) was calculated pixel by pixel, and the data were presented as $\Delta F_{335}/F_{364}$. TG-evoked Ca²⁺ entry was measured as the integral of the rise in fura-FFP18 fluorescence ratio for 3 min after the addition of extracellular Ca²⁺ taking a sample every second (AUC). To compare the rate of increase in fura-FFP18 fluorescence between different treatments, traces were fitted to the equation mentioned in Section 4.3.

4.5. Immunoprecipitation and Western Blotting

The immunoprecipitation and Western blotting were performed as described previously [46]. Briefly, 500- μ L aliquots of cell suspension (4×10^6 cell/mL) were lysed with an equal volume of ice-cold 2 \times NP-40 buffer, pH 8, containing 274 mM NaCl, 40 mM Tris, 4 mM EDTA, 20% glycerol, 2% nonidet P-40, 2 mM Na₃VO₄, and complete EDTA-free protease inhibitor tablets. Aliquots of cell lysates (1 mL) were immunoprecipitated by incubation with 2 μ g of anti-Orai1 or anti-AC8 antibody and 25 μ L of protein A agarose overnight at 4 °C on a rocking platform. The soft elution of proteins bound to the protein A agarose was performed according to the protocol described by Antrobus and Borner [47]. The immunoprecipitates were resolved by 10% SDS-PAGE, and separated proteins were electrophoretically transferred onto nitrocellulose membranes for subsequent probing. Blots were incubated overnight with 10% (*w/v*) BSA in Tris-buffered saline with 0.1% Tween-20 (TBST) to block residual protein binding sites. Immunodetection of Orai1 and β -actin was achieved by incubation for 1 h with anti-Orai1 antibody diluted 1:500 in TBST or 1 h with anti- β -actin antibody diluted 1:2000 in TBST, respectively. AC8, p-FAK, and FAK were achieved by incubation overnight with anti-AC8, anti-p-FAK (phospho Y-397) and anti-FAK antibody diluted 1:500 in TBST, respectively. The primary antibody was removed, and blots were washed six times for 5 min each with TBST. To detect the primary antibody, blots were incubated for 1 h with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG antibody, horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody diluted 1:10000 in TBST, or Clean-Blot™ IP Detection Reagent diluted 1:250 in TBST, and then exposed to enhanced chemiluminescence reagents for 5 min. The density of bands was measured using a C-DiGit Chemiluminescent Western Blot Scanner (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). Data were normalized to the amount of protein recovered by the antibody used for the immunoprecipitation.

4.6. Wound Healing Assay

The wound healing assay was performed as described previously [3]. MDA-MB-231 cells were seeded in a 35-mm six-well multidish to obtain confluence after 24 h. Next, cells were cultured in medium supplemented with 1% serum, and a wound was created using a sterile 200- μ L plastic pipette tip. Photographs were taken immediately or at the times indicated using an inverted microscope Nikon Eclipse TS100 (Tokyo, Japan). Migration of cells was quantitated using Fiji ImageJ (NIH; Bethesda, MD, USA).

4.7. Confocal Determination of G-GECO1.2 Fluorescence

G-GECO1.2-Orai1 transfected MDA-MB-231 cells were seeded on coverslips and mounted on a perfusion chamber and placed on the stage of an epifluorescence inverted microscope Nikon Eclipse Ti (Tokio, Japan) with an image acquisition and analysis system for videomicroscopy NIS-Elements Imaging Software (Nikon, Amsterdam, The Netherlands). Cells were continuously superfused with HBS supplemented with 0.1% (*w/v*) BSA at room temperature. Cells were examined at 60× magnification and excited using a confocal laser-scanning system (Melles-Griot, IDEX Health & Science, Wallingford, CT, USA) at 488 nm. Fluorescence emission at 515 nm was detected and recorded using NIS-Elements AR software (Nikon). GECO fluorescence was determined (a) before the addition of TG (resting) in the absence of extracellular Ca^{2+} (100 μM EGTA added), (b) 30 s after the addition of 1 μM TG in the absence of extracellular Ca^{2+} , and (c) 30 s after the addition of 1 mM CaCl_2 to the extracellular medium. Images were analyzed using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA).

4.8. Determination of Cell Proliferation

To determine cell proliferation, cells were seeded at a concentration of 5×10^3 /well into 96-well plates and, after 0, 24, and 48 h, cell proliferation was assessed using a specific cell proliferation assay kit based on the measurement of BrdU incorporation during DNA synthesis according to the manufacturer's instructions (BioVision, Milpitas, CA, USA). Absorbance in samples was measured using a plate reader (Epoch, Biotek, Swindon, UK) at 450 nm, presented as arbitrary units.

4.9. Statistical Analysis

Analysis of statistical significance was performed using the Kruskal–Wallis test combined with Dunn's post hoc test (or one-way analysis of variance combined with Tukey post hoc test for the analysis of Ca^{2+} determinations) (GraphPad Prism Windows 5.04, San Diego, CA, USA). For comparison between two groups, the Mann–Whitney U test was used. A *p*-value <0.05 was considered to be statistically significant.

5. Conclusions

In conclusion, our results provide strong evidence for the impairment of phosphorylation-dependent Orai1 inactivation by AC8 overexpression in MDA-MB-231 cells, a mechanism that enhances Ca^{2+} influx, breast cancer cell migration (by supporting FAK activation), and cell proliferation. These findings suggest that AC8 might be a good candidate for the development of anti-tumoral strategies in breast cancer.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/11/11/1624/s1>: Figure S1: Ca^{2+} mobilization near the plasma membrane in MDA-MB-231 breast cancer cells; Figure S2: Role of the cAMP–PKA pathway in MCF7 cell migration; Figure S3: Role of AC8 in MCF7 cell migration; Figure S4: Role of AC8 in MCF10A cell migration.

Author Contributions: Conceptualization, J.J.L., T.S., and J.A.R.; funding acquisition, G.M.S., T.S., and J.A.R.; investigation, J.S.-C., J.J.L., I.J., S.R., P.J.C., D.F., T.S., and J.A.R.; supervision, J.A.R.; writing—original draft, J.A.R.; writing—review and editing, S.R., G.M.S., and T.S. All authors reviewed and approved the manuscript.

Funding: This work was supported by MINECO (Grants BFU2016-74932-C2-1-P and BFU2016-74932-C2-2-P) and Junta de Extremadura-FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional Grants IB16046 and GR18061). J.J.L. and I.J. are supported by a contract from Junta de Extremadura (TA18011 and TA18054, respectively). J.S.-C. is supported by a contract from Ministry of Science, Innovation, and Universities, Spain.

Acknowledgments: We are grateful to Agustin Guerrero (Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute, Mexico), Christoph Romanin (University of Linz, Austria), and Michelle Halls (Monash University, Australia) for providing plasmids. We are also grateful to Javier Benitez (Spanish National Cancer Research (CNIO), Spain) for providing the Hs578T cells. The BT-20 human breast carcinoma cell line was generously provided by Abelardo López-Rivas and Carmen Palacios (Cell Death and Signaling Research Group, CABIMER Seville, Spain). We thank Sandra Alvarado for technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Ramadan, W.S.; Vazhappilly, C.G.; Saleh, E.M.; Menon, V.; AlAzawi, A.M.; El-Serafi, A.T.; Mansour, W.; El-Awady, R. Interplay between Epigenetics, Expression of Estrogen Receptor- α , HER2/ERBB2 and Sensitivity of Triple Negative Breast Cancer Cells to Hormonal Therapy. *Cancers (Basel)* **2018**, *11*, 13.
2. Chakraborty, S.; Ghosh, S.; Banerjee, B.; Santra, A.; Adhikary, A.; Misra, A.K.; Sen, P.C. 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. *Front. Pharmacol.* **2016**, *7*, 114.
3. Jardin, I.; Diez-Bello, R.; Lopez, J.J.; Redondo, P.C.; Salido, G.M.; Smani, T.; Rosado, J.A. TRPC6 Channels Are Required for Proliferation, Migration and Invasion of Breast Cancer Cell Lines by Modulation of Orai1 and Orai3 Surface Exposure. *Cancers (Basel)* **2018**, *10*, 331.
4. Azimi, I.; Milevskiy, M.J.G.; Chalmers, S.B.; Yapa, K.; Robitaille, M.; Henry, C.; Baillie, G.J.; Thompson, E.W.; Roberts-Thomson, S.J.; Monteith, G.R. 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 (Basel)* **2019**, *11*, 208.
5. Wang, Y.; Qi, Y.X.; Qi, Z.; Tsang, S.Y. TRPC3 Regulates the Proliferation and Apoptosis Resistance of Triple Negative Breast Cancer Cells through the TRPC3/RASA4/MAPK Pathway. *Cancers (Basel)* **2019**, *11*, 558.
6. Motiani, R.K.; Abdullaev, I.F.; Trebak, M. 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. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 19173–19183.
7. Babaer, D.; Amara, S.; Ivy, M.; Zhao, Y.; Lammers, P.E.; Titze, J.M.; Tiriveedhi, V. High salt induces P-glycoprotein mediated treatment resistance in breast cancer cells through store operated calcium influx. *Oncotarget* **2018**, *9*, 25193–25205.
8. Gueder, N.; Allan, G.; Telliez, M.S.; Hague, E.; Fernandez, J.M.; Sanchez-Fernandez, E.M.; Ortiz-Mellet, C.; Ahidouch, A.; Ouadid-Ahidouch, H. sp(2)-Iminosugar α -glucosidase inhibitor 1-C-octyl-2-oxa-3-oxocastanospermine specifically affected breast cancer cell migration through Stim1, beta1-integrin, and FAK signaling pathways. *J. Cell Physiol.* **2017**, *232*, 3631–3640.
9. Hammadi, M.; Chopin, V.; Matifat, F.; Dhennin-Duthille, I.; Chasseraud, M.; Sevestre, H.; Ouadid-Ahidouch, H. Human ether a-gogo K(+) channel 1 (hEag1) regulates MDA-MB-231 breast cancer cell migration through Orai1-dependent calcium entry. *J. Cell Physiol.* **2012**, *227*, 3837–3846.
10. Derler, I.; Madl, J.; Schutz, G.; Romanin, C. Structure, regulation and biophysics of I(CRAC), STIM/Orai1. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2012**, *740*, 383–410.
11. Desai, P.N.; Zhang, X.; Wu, S.; Janoshazi, A.; Bolimuntha, S.; Putney, J.W.; Trebak, M. Multiple types of calcium channels arising from alternative translation initiation of the Orai1 message. *Sci. Signal.* **2015**, *8*, ra74.
12. Cai, X.; Zhou, Y.; Nwokonko, R.M.; Loktionova, N.A.; Wang, X.; Xin, P.; Trebak, M.; Wang, Y.; Gill, D.L. The Orai1 Store-operated Calcium Channel Functions as a Hexamer. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 25764–25775.
13. Albarran, L.; Lopez, J.J.; Jardin, I.; Sanchez-Collado, J.; Berna-Erro, A.; Smani, T.; Camello, P.J.; Salido, G.M.; Rosado, J.A. EFHB is a Novel Cytosolic Ca²⁺ Sensor That Modulates STIM1-SARAF Interaction. *Cell Physiol. Biochem.* **2018**, *51*, 1164–1178.
14. Jha, A.; Ahuja, M.; Maleth, J.; Moreno, C.M.; Yuan, J.P.; Kim, M.S.; Muallem, S. The STIM1 CTID domain determines access of SARAF to SOAR to regulate Orai1 channel function. *J. Cell Biol.* **2013**, *202*, 71–79.
15. Palty, R.; Raveh, A.; Kaminsky, I.; Meller, R.; Reuveny, E. SARAF inactivates the store operated calcium entry machinery to prevent excess calcium refilling. *Cell* **2012**, *149*, 425–438.
16. Zweifach, A.; Lewis, R.S. Rapid inactivation of depletion-activated calcium current (ICRAC) due to local calcium feedback. *J. Gen. Physiol.* **1995**, *105*, 209–226.
17. Zweifach, A.; Lewis, R.S. Slow calcium-dependent inactivation of depletion-activated calcium current. Store-dependent and -independent mechanisms. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 14445–14451.
18. Fukushima, M.; Tomita, T.; Janoshazi, A.; Putney, J.W. Alternative translation initiation gives rise to two isoforms of Orai1 with distinct plasma membrane mobilities. *J. Cell Sci.* **2012**, *125*, 4354–4361.
19. Willoughby, D.; Everett, K.L.; Halls, M.L.; Pacheco, J.; Skroblin, P.; Vaca, L.; Klussmann, E.; Cooper, D.M. Direct binding between Orai1 and AC8 mediates dynamic interplay between Ca²⁺ and cAMP signaling. *Sci. Signal.* **2012**, *5*, ra29.

20. Kawasaki, T.; Ueyama, T.; Lange, I.; Feske, S.; Saito, N. Protein kinase C-induced phosphorylation of Orai1 regulates the intracellular Ca²⁺ level via the store-operated Ca²⁺ channel. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 25720–25730.
21. Zhang, X.; Pathak, T.; Yoast, R.; Emrich, S.; Xin, P.; Nwokonko, R.M.; Johnson, M.; Wu, S.; Delierneux, C.; Gueguinou, M.; et al. A calcium/cAMP signaling loop at the ORAI1 mouth drives channel inactivation to shape NFAT induction. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1971.
22. Peretti, M.; Badaoui, M.; Girault, A.; Van Gulick, L.; Mabile, M.P.; Tebbakha, R.; Sevestre, H.; Morjani, H.; Ouadid-Ahidouch, H. Original association of ion transporters mediates the ECM-induced breast cancer cell survival: Kv10.1-Orai1-SPCA2 partnership. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1175.
23. Trebak, M.; Putney, J.W., Jr. ORAI Calcium Channels. *Physiology (Bethesda)* **2017**, *32*, 332–342.
24. Dynes, J.L.; Amcheslavsky, A.; Cahalan, M.D. Genetically targeted single-channel optical recording reveals multiple Orai1 gating states and oscillations in calcium influx. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 440–445.
25. Soboloff, J.; Spassova, M.A.; Tang, X.D.; Hewavitharana, T.; Xu, W.; Gill, D.L. Orai1 and STIM1 reconstitute store-operated calcium channel function. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 20661–20665.
26. Kim, J.H.; Lkhagvadorj, S.; Lee, M.R.; Hwang, K.H.; Chung, H.C.; Jung, J.H.; Cha, S.K.; Eom, M. Orai1 and STIM1 are critical for cell migration and proliferation of clear cell renal cell carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *448*, 76–82.
27. Diez-Bello, R.; Jardin, I.; Salido, G.M.; Rosado, J.A. Orai1 and Orai2 mediate store-operated calcium entry that regulates HL60 cell migration and FAK phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* **2017**, *1864*, 1064–1070.
28. Bastian-Eugenio, C.E.; Bohorquez-Hernandez, A.; Pacheco, J.; Sampieri, A.; Asanov, A.; Ocelotl-Oviedo, J.P.; Guerrero, A.; Darszon, A.; Vaca, L. Heterologous calcium-dependent inactivation of Orai1 by neighboring TRPV1 channels modulates cell migration and wound healing. *Commun. Biol.* **2019**, *2*, 88.
29. Rowan, B.G.; Garrison, N.; Weigel, N.L.; O'Malley, B.W. 8-Bromo-cyclic AMP induces phosphorylation of two sites in SRC-1 that facilitate ligand-independent activation of the chicken progesterone receptor and are critical for functional cooperation between SRC-1 and CREB binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 8720–8730.
30. Ho, B.; Olson, G.; Figel, S.; Gelman, I.; Cance, W.G.; Golubovskaya, V.M. Nanog increases focal adhesion kinase (FAK) promoter activity and expression and directly binds to FAK protein to be phosphorylated. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 18656–18673.
31. Rosado, J.A.; Salido, G.M.; Jensen, R.T.; Garcia, L.J. Are tyrosine phosphorylation of p125(FAK) and paxillin or the small GTP binding protein, rho, needed for CCK-stimulated pancreatic amylase secretion? *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1404*, 412–426.
32. Parsons, J.T. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 1409–1416.
33. Badaoui, M.; Mimsy-Julienne, C.; Saby, C.; Van Gulick, L.; Peretti, M.; Jeannesson, P.; Morjani, H.; Ouadid-Ahidouch, H. Collagen type 1 promotes survival of human breast cancer cells by overexpressing Kv10.1 potassium and Orai1 calcium channels through DDR1-dependent pathway. *Oncotarget* **2018**, *9*, 24653–24671.
34. Cantonero, C.; Sanchez-Collado, J.; Gonzalez-Nunez, M.A.; Salido, G.M.; Lopez, J.J.; Jardin, I.; Rosado, J.A. Store-independent Orai1-mediated Ca(2+) entry and cancer. *Cell Calcium* **2019**, *80*, 1–7.
35. Jardin, I.; Lopez, J.J.; Salido, G.M.; Rosado, J.A. Store-Operated Ca(2+) Entry in Breast Cancer Cells: Remodeling and Functional Role. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*.
36. Wang, Y.; Li, Z.C.; Zhang, P.; Poon, E.; Kong, C.W.; Boheler, K.R.; Huang, Y.; Li, R.A.; Yao, X. Nitric Oxide-cGMP-PKG Pathway Acts on Orai1 to Inhibit the Hypertrophy of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Stem Cells* **2015**, *33*, 2973–2984.
37. Yang, S.; Zhang, J.J.; Huang, X.Y. Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis. *Cancer Cell* **2009**, *15*, 124–134.
38. 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.; et al. ORAI1-mediated calcium influx in lactation and in breast cancer. *Mol. Cancer Ther.* **2011**, *10*, 448–460.
39. Wagner, S.; Storbeck, C.J.; Roovers, K.; Char, Z.Y.; Kolodziej, P.; McKay, M.; Sabourin, L.A. FAK/src-family dependent activation of the Ste20-like kinase SLK is required for microtubule-dependent focal adhesion turnover and cell migration. *PLoS One* **2008**, *3*, e1868.

40. Garcia, L.J.; Rosado, J.A.; Tsuda, T.; Jensen, R.T. CCK causes rapid tyrosine phosphorylation of p125FAK focal adhesion kinase and paxillin in rat pancreatic acini. *Biochim Biophys Acta* **1997**, *1358*, 189–199.
41. Golubovskaya, V.M.; Figel, S.; Ho, B.T.; Johnson, C.P.; Yemma, M.; Huang, G.; Zheng, M.; Nyberg, C.; Magis, A.; Ostrov, D.A.; et al. A small molecule focal adhesion kinase (FAK) inhibitor, targeting Y397 site: 1-(2-hydroxyethyl)-3, 5, 7-triaza-1-azoniatricyclo [3.3.1.1(3,7)]decane; bromide effectively inhibits FAK autophosphorylation activity and decreases cancer cell viability, clonogenicity and tumor growth in vivo. *Carcinogenesis* **2012**, *33*, 1004–1013. [[PubMed](#)]
42. Lopez, E.; Frischauf, I.; Jardin, I.; Derler, I.; Muik, M.; Cantonero, C.; Salido, G.M.; Smani, T.; Rosado, J.A.; Redondo, P.C. STIM1 phosphorylation at Y(316) modulates its interaction with SARAF and the activation of SOCE and ICRAC. *J. Cell Sci.* **2019**, *132*.
43. Albarran, L.; Lopez, J.J.; Gomez, L.J.; Salido, G.M.; Rosado, J.A. SARAF modulates TRPC1, but not TRPC6, channel function in a STIM1-independent manner. *Biochem. J.* **2016**, *473*, 3581–3595.
44. Lopez, J.J.; Albarran, L.; Jardin, I.; Sanchez-Collado, J.; Redondo, P.C.; Bermejo, N.; Bobe, R.; Smani, T.; Rosado, J.A. Filamin A Modulates Store-Operated Ca(2+) Entry by Regulating STIM1 (Stromal Interaction Molecule 1)-Orai1 Association in Human Platelets. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* **2018**, *38*, 386–397. [[PubMed](#)]
45. Golovina, V.A. Visualization of localized store-operated calcium entry in mouse astrocytes. Close proximity to the endoplasmic reticulum. *J. Physiol.* **2005**, *564*, 737–749.
46. Zbidi, H.; Jardin, I.; Woodard, G.E.; Lopez, J.J.; Berna-Erro, A.; Salido, G.M.; Rosado, J.A. STIM1 and STIM2 Are Located in the Acidic Ca²⁺ Stores and Associates with Orai1 upon Depletion of the Acidic Stores in Human Platelets. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 12257–12270.
47. Antrobus, R.; Borner, G.H. Improved elution conditions for native co-immunoprecipitation. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e18218.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Adenylyl cyclase type 8 overexpression impairs phosphorylation-dependent Orai1 inactivation and promotes migration in MDA-MB-231 breast cancer cells

Jose Sanchez-Collado, Jose J. Lopez, Isaac Jardin, Pedro J. Camello, Debora Falcon, Sergio Regodon, Gines M. Salido, Tarik Smani and Juan A. Rosado

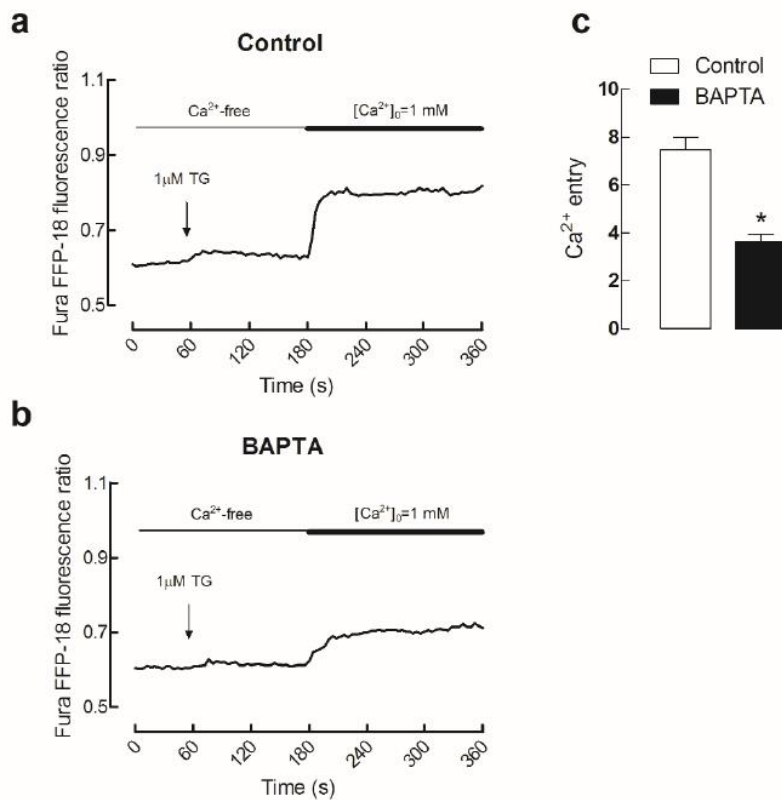


Figure S1. Ca²⁺ mobilization near the plasma membrane in MDA-MB-231 breast cancer cells. MDA-MB-231 cells were loaded with dimethyl-BAPTA (**b**) or left untreated (**a**). Cells, loaded with fura FFP-18, were perfused with a Ca²⁺-free medium (100 μM EGTA added) and stimulated with 1 μM TG followed by reintroduction of external Ca²⁺ (final concentration 1 mM) to initiate Ca²⁺ entry. Traces are representative of 40 cells/day/3–5 days. (**c**) Bar graphs represent Ca²⁺ mobilization near the plasma membrane upon reintroduction of external Ca²⁺ in BAPTA-loaded or untreated (Control) cells, estimated as described in Material and Methods.

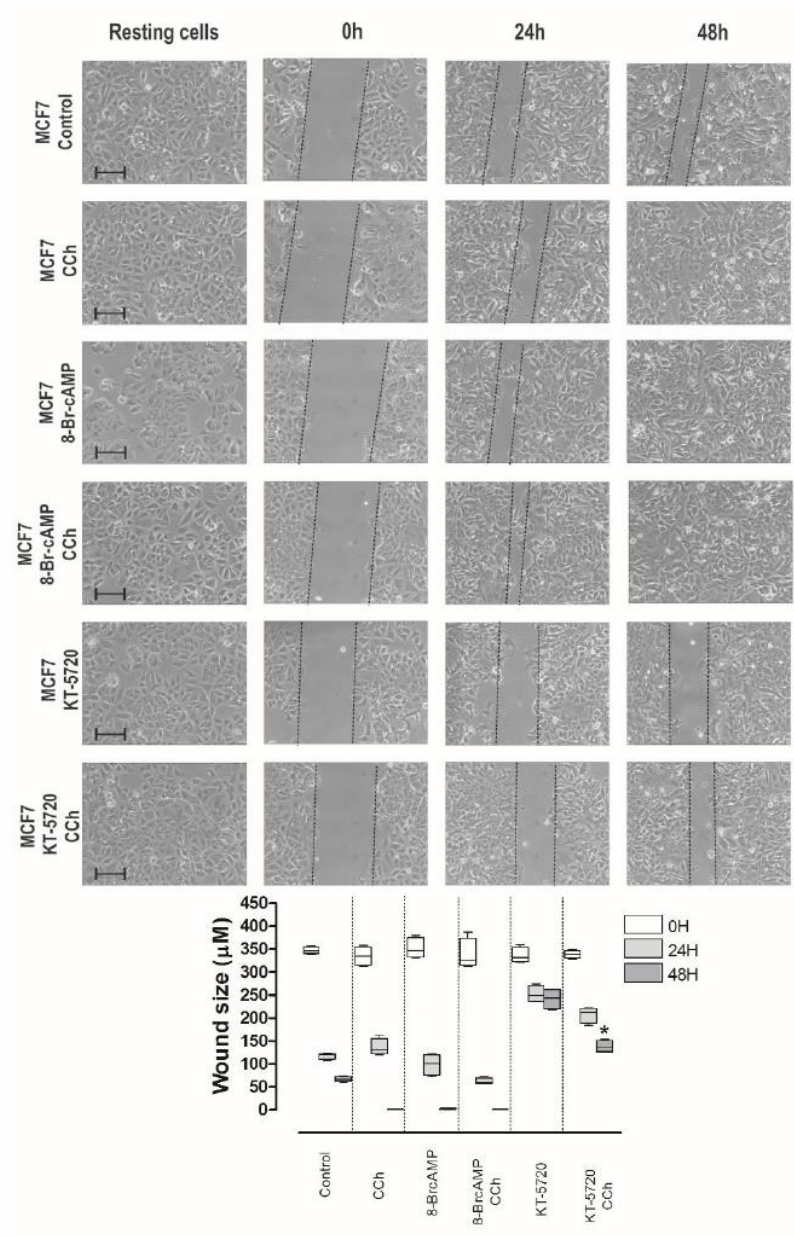


Figure S2. Role of the cAMP-PKA pathway in MCF7 cell migration. MCF7 cells were stimulated with 10 μM CCh or the vehicle in the absence or presence of 8-Br-cAMP (300 μM) or KT-5720 (1 μM), and subjected to wound healing assay as described in Methods. Images were acquired at 0, 24 and 48 h from the beginning of the assay. The dotted lines define the areas lacking cells. The bars represent 100 μm . The box plot represents the wound size, in micrometers, at the different conditions ($n = 6$). * $p < 0.05$ compared to the corresponding time in CCh-treated cells.

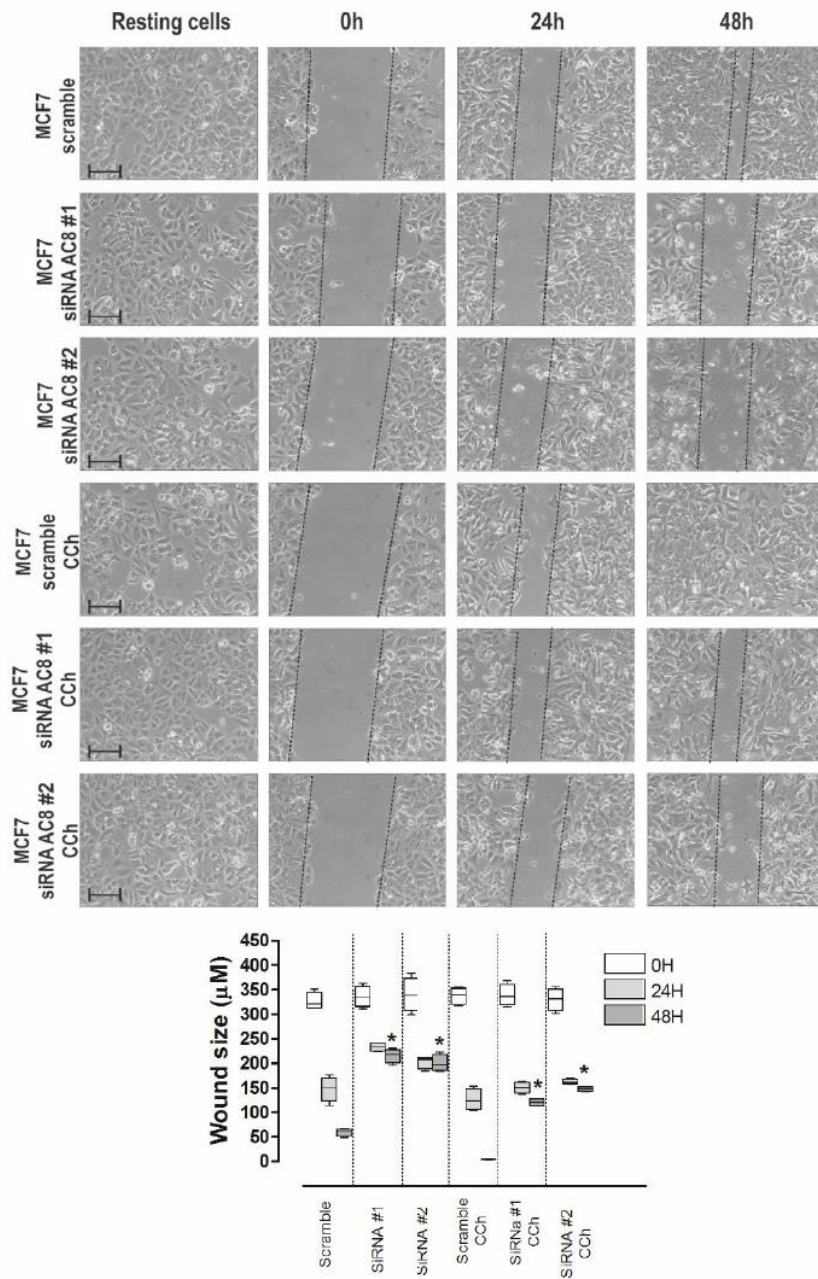


Figure S3. Role of AC8 in MCF7 cell migration. MCF7 cells were transfected with siAC8#1, siAC8#2 or scramble plasmid, as indicated. Forty-eight hours after transfection cells were stimulated with 10 μ M CCh or the vehicle and subjected to wound healing assay as described in Methods. Images were acquired at 0, 24 and 48 h from the beginning of the assay. The dotted lines define the areas lacking cells. The bars represent 100 μ m. The box plot represents the wound size, in micrometers, at the different conditions (n = 6). * $p < 0.05$ compared to the corresponding time in cells transfected with scramble plasmid.

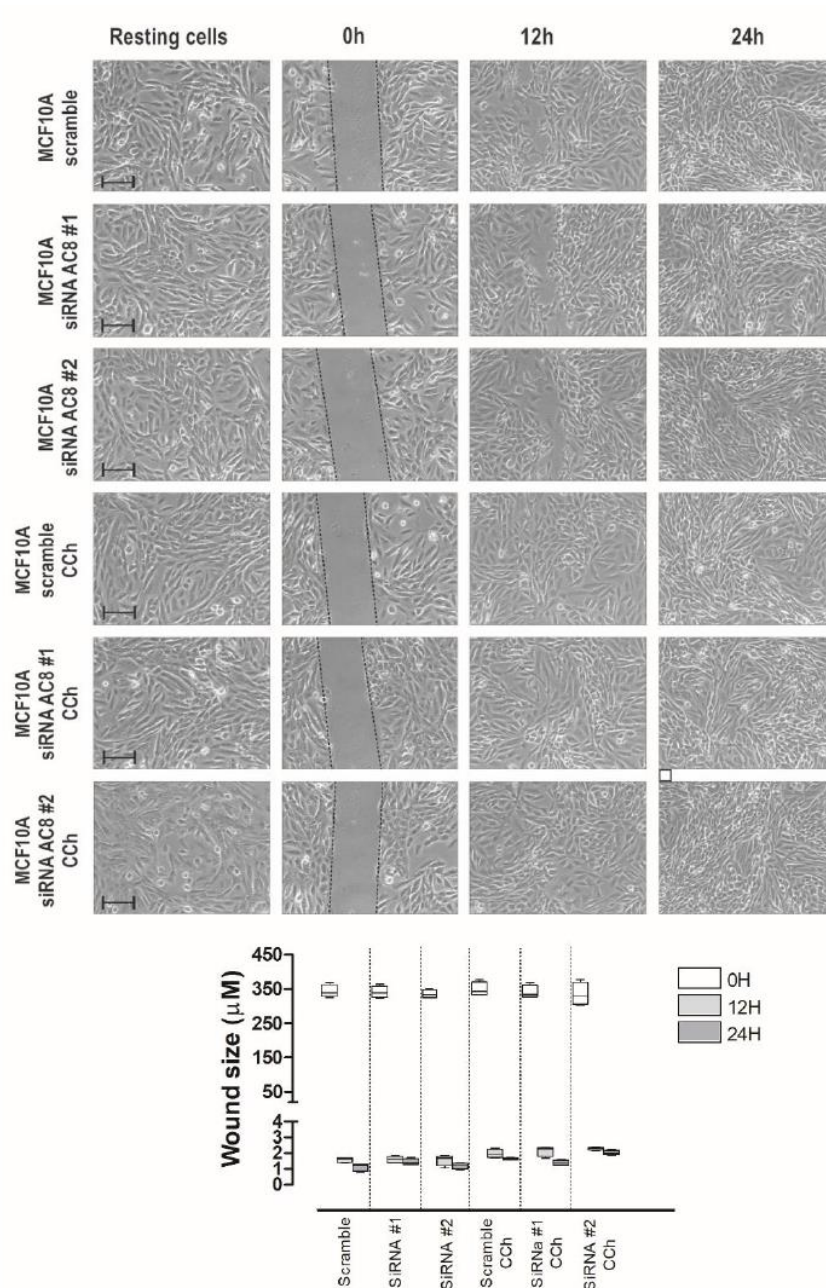


Figure S4. Role of AC8 in MCF10A cell migration. MCF10A cells were transfected with siAC8#1, siAC8#2 or scramble plasmid, as indicated. Forty-eight hours after transfection cells were stimulated with 10 μ M CCh or the vehicle and subjected to wound healing assay as described in Methods. Images were acquired at 0, 12 and 24 h from the beginning of the assay. The dotted lines define the areas lacking cells. The bars represent 100 μ m. The box plot represents the wound size, in micrometers, at the different conditions (n = 6).

Research Article

Functional role of TRPC6 and STIM2 in cytosolic and endoplasmic reticulum Ca^{2+} content in resting estrogen receptor-positive breast cancer cells

Jose Sanchez-Collado*, Jose J. Lopez*, Lucia Gonzalez-Gutierrez, Carlos Cantonero, Isaac Jardin, Ginés M. Salido and  Juan A. Rosado

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

Correspondence: Juan A. Rosado (jarosado@unex.es)

TRPC6 forms non-selective cation channels activated by a variety of stimuli that are involved in a wide number of cellular functions. In estrogen receptor-positive (ER+) breast cancer cells, the store-operated Ca^{2+} entry has been reported to be dependent on STIM1, STIM2 and Orai3, with TRPC6 playing a key role in the activation of store-operated Ca^{2+} entry as well as in proliferation, migration and viability of breast cancer cells. We have used a combination of biotinylation, Ca^{2+} imaging as well as protein knockdown and overexpression of a dominant-negative TRPC6 mutant (TRPC6dn) to show that TRPC6 and STIM2 are required for the maintenance of cytosolic and endoplasmic reticulum Ca^{2+} content under resting conditions in ER+ breast cancer MCF7 cells. These cells exhibit a greater plasma membrane expression of TRPC6 under resting conditions than non-tumoral breast epithelial cells. Attenuation of STIM2, TRPC6 and Orai3, alone or in combination, results in impairment of resting cytosolic and endoplasmic reticulum Ca^{2+} homeostasis. Similar results were observed when cells were transfected with expression plasmid for TRPC6dn. TRPC6 co-immunoprecipitates with STIM2 in resting MCF7 cells, a process that is impaired by rises in cytosolic Ca^{2+} concentration. Impairment of TRPC6 function leads to abnormal Ca^{2+} homeostasis and endoplasmic reticulum stress, thus, suggesting that TRPC6 might be a potential target for the development of anti-tumoral therapies.

Introduction

Ca^{2+} signaling plays a pivotal role in a wide variety of physiological functions, such as proliferation, exocytosis and gene transcription. In non-excitabile cells, store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) is the main mechanism for Ca^{2+} influx that leads to the rise of cytosolic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_c$), triggering Ca^{2+} -dependent signaling pathways [1]. SOCE is mediated by a Ca^{2+} signaling toolkit whose major components are different members of Orai, canonical transient receptor potential channel (TRPC) and stromal interaction molecule (STIM) protein families. Orai1, predominantly, and also TRPC1 are widely considered as the two main Ca^{2+} channels that mediate SOCE [2], although the other two Orai family members, Orai2 and Orai3, can also conduct SOCE but showing less efficacy than Orai1 [3]. TRPC6, a non-selective cation channel can also mediate and regulate SOCE at the same time that maintains the basal $[\text{Ca}^{2+}]_c$ stable in different types of cells [2,4]. On the other hand, STIM family comprises two EF-hand Ca^{2+} -binding related proteins, STIM1 and STIM2, that act as endoplasmic reticulum Ca^{2+} sensors activating Ca^{2+} channels after store depletion. While the function of STIM1 as a modulator of SOC channels and Ca^{2+} homeostasis has been widely demonstrated, the role of STIM2 in the control of intracellular Ca^{2+} homeostasis is less known. It has been reported that STIM2 is responsible for the maintenance of intracellular Ca^{2+} homeostasis in resting conditions, since, in comparison with STIM1, STIM2 EF-hand exhibits lower affinity for Ca^{2+} . This feature allows

*These authors contributed equally to this work.

Received: 14 July 2020

Revised: 7 August 2020

Accepted: 14 August 2020

Accepted Manuscript online:

14 August 2020

Version of Record published:

4 September 2020

STIM2 to detect tiny changes in endoplasmic reticulum Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$), leading a subsequent activation of weak and prolonged SOC currents in order to refill depleted stores and correct small changes in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ [5,6]. In addition, STIM2 promotes the recruitment and activation of STIM1 after mild stimulation to ensure the triggering of downstream Ca^{2+} signal pathways [7].

Most cancer cells, including breast cancer cells, undergo a remodeling of this Ca^{2+} signaling toolkit which leads the activation of different hallmarks of cancer, including metastasis, proliferation, invasion or migration [8–11]. Hence, in triple negative breast cancer cells, such as the MDA-MB-231 cell line, SOCE is mainly mediated by STIM1 and Orai1, while in estrogen receptor-positive (ER+) cancer cells, such as the MCF7 cell line, SOCE is mostly dependent on STIM1, STIM2 and Orai3 [12]. TRPC6 is up-regulated in both breast cancer cell types and promotes the insertion of Orai1 and Orai3 in the plasma membrane in MDA-MB-231 and MCF7 cells, respectively [13].

Here, we show that, in ER+ breast cancer cells, TRPC6, STIM2 and Orai3 are involved in the maintenance of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ and in the modulation of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$ in resting conditions. The proposed mechanism suggests that STIM2 is able to detect small changes in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$, promoting its association with TRPC6 and the subsequent activation of this channel. This interaction leads to Ca^{2+} refilling of the endoplasmic reticulum, and the impairment of TRPC6 function promotes the development of endoplasmic reticulum stress and caspase-3 activation.

Materials and methods

Materials

Fura-2 acetoxymethyl ester (fura-2/AM) and rabbit anti-STIM2 antibody were purchased from Invitrogen (Madrid, Spain). Thapsigargin (TG), Nonidet P-40, sodium dodecyl sulfate (SDS), anti-actin polyclonal antibody, bovine serum albumin, calcium chloride, N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), glucose, HEPES, mouse anti-Orai3 antibody and Trizma® base were purchased from Sigma–Aldrich (Germany). Complete EDTA-free protease inhibitor tablets were purchased from Roche Pharma AG (Germany). Polyclonal rabbit anti-TRPC6 antibody was purchased from Alomone Labs (Jerusalem, Israel). Polyclonal rabbit anti-phospho-eIF2 α (Ser⁵¹) antibody (catalog # 9721S) was from Cell Signaling (Boston, MA, U.S.A.). Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit and anti-mouse IgG antibody was purchased from Jackson ImmunoResearch (PA, U.S.A.). Enhanced chemiluminescence detection reagents were from Pierce (Cheshire, U.K.). Western blot nitrocellulose membranes were from Bio-Rad Laboratories (Ca, U.S.A.). DharmaFECT kb transfection reagent was from Dharmacon Inc (Lafayette, CO, U.S.A.). Protein A agarose was from Merck-Millipore (Burlington, MA, U.S.A.). Ez-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin and streptavidin-conjugated agarose beads, Clean-Blot™ IP Detection Reagent and SuperSignal® West Dura extended duration substrate reagent and Live/Dead® viability/cytotoxicity kit were purchased from ThermoFisher Scientific Inc (Waltham, MA, U.S.A.). pCMV R-CEPIA1er was a gift from Masamitsu Iino (Addgene plasmid # 58216; <http://n2t.net/addgene:58216>; RRID: Addgene_58216). All other reagents were of analytical grade.

Cell culture and transfection

MCF10A, MCF7, T47D, MDA-MB-468, BT20 and MDA-MB-231 cell lines were obtained from the American Type Culture Collection. Cells were cultured up to 20–25 passages at 37°C with 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)-F12 (for MCF10A) or DMEM (for MCF7, T47D, MDA-MB-468, BT20 and MDA-MB-231), supplemented with 5% and 10% (v/v) horse or fetal bovine serum, respectively, and 100 U/ml penicillin and streptomycin, as described previously [14]. For Western blotting and immunoprecipitation assays, cells (2×10^6) were plated in 75 cm² flasks and cultured for 48–72 h, while, for Ca^{2+} imaging and determination of R-CEPIA1er fluorescence assays, cells (2×10^5 to 2.5×10^5) were seeded in a 35 mm six-well multidish.

MCF7 cells were transfected with expression plasmids for the pore-dead dominant-negative TRPC6 (TRPC6dn) mutant using DharmaFECT kb transfection reagent. Plasmids were used at 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. TRPC6 shRNA, STIM2 and Orai3 siRNAs and negative control RNAi were also transfected into cell using DharmaFECT kb transfection reagent as described previously [13,15]. siRNAs were used for silencing experiments at 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Determination of cytosolic and ER free calcium concentration

Cells were loaded with fura-2 by incubation with 2 μM fura 2/AM for 30 min at 37°C as described previously [16] or transfected with pCMV R-CEPIA1er and used 48 h after transfection. Coverslips with MCF7 cells were

mounted on a perfusion chamber and placed on the stage of an epifluorescence inverted microscope (Nikon Eclipse Ti2, Amsterdam, The Netherlands) with an image acquisition and analysis system for videomicroscopy (NIS-Elements Imaging Software, Nikon, Amsterdam, The Netherlands). Cells were continuously superfused at room temperature with HEPES-buffered saline (HBS) containing (in mM) 125 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 5 glucose, and 25 HEPES, pH 7.4, supplemented with 0.1% (w/v) BSA. Cells were examined at 40× magnification (100× in case of R-CEPIA1er) (Nikon CFI S FLUOR, Amsterdam, The Netherlands) and were excited with light from a xenon lamp passed through a high-speed monochromator Optoscan ELE 450 (Cairn Research; Faversham, U.K.) either alternatively at 340/380 nm (for fura-2) or at 562 nm (for R-CEPIA1er). Fluorescence emission at 505 nm (fura-2) or 641 nm (R-CEPIA1er) was detected using a cooled digital sCMOS camera Zyla 4.2 (Andor; Belfast, U.K.) and recorded using NIS-Elements AR software (Nikon; Tokyo, Japan). Fluorescence ratio (F₃₄₀/F₃₈₀) was calculated pixel by pixel, and the data were presented as $\Delta F_{340}/F_{380}$, as previously described [14,17]. TG-evoked Ca²⁺ release and entry were estimated as the area under the curve (AUC) measured as the integral of the rise in fura-2 fluorescence ratio for 2.5 min after the addition of TG or CaCl₂, respectively, taking a sample every second. To compare the rate of increase in fura-2 fluorescence between different treatments we used the constant of the exponential increase. Traces were fitted to the equation

$$y = A(1 - e^{-K_1T}) \cdot e^{-K_2T},$$

where K₁ is the constant of the exponential increase. To compare the rate of decay of R-CEPIA1er fluorescence between different treatments traces were fitted to the equation

$$y = AK + B,$$

where K is the slope.

Biotinylation of membrane proteins

MCF7 cells grown in 75 cm² tissue culture dishes were washed three times with HBS (without added serum or protein). Three ml of Sörcen's buffer (pH 7.0) (16 mM Na₂HPO₄ and 114 mM NaH₂PO₄) and containing 2.5 mg EZ-Link sulfo-NHS-LC-biotin were added, and cells were incubated at 4°C for 1 h. The biotinylation reaction was terminated by addition of Tris-base to a final concentration of 33 mM. Following biotinylation, cells were washed twice in Sörcen's buffer, disrupted using Nonidet P-40 buffer and sonicated. Cell lysates were centrifuged (16000g for 5 min at 4°C) and the samples were incubated with 25 µl streptavidin beads overnight at 4°C and resuspended in Laemmli's buffer for subsequent analysis by Western blotting.

Immunoprecipitation and Western blotting

The immunoprecipitation and Western blotting were performed as described previously [18]. Briefly, 500 µl aliquots of cell suspension (2 × 10⁶ cell/ml) were lysed with an equal volume of ice-cold 2× Nonidet P-40 buffer, pH 8, containing 274 mM NaCl, 40 mM Tris, 4 mM EDTA, 20% glycerol, 2% Nonidet P-40, 2 mM Na₃VO₄, and complete EDTA-free protease inhibitor tablets. Aliquots of cell lysates (1 ml) were immunoprecipitated by incubation with 2 µg of anti-TRPC6 antibody and 25 µl of protein A agarose overnight at 4°C on a rocking platform. The immunoprecipitates were resolved by 8% or 10% SDS-PAGE (it should be noted that when 8% SDS-PAGE was used TRPC6 appears as a double band). Separated proteins were electrophoretically transferred onto nitrocellulose membranes for subsequent probing. Blots were incubated overnight with 10% (w/v) BSA in Tris-buffered saline with 0.1% Tween-20 (TBST) to block residual protein binding sites. Immunodetection of STIM2, TRPC6 and β-actin was achieved by incubation for 2 h with anti-STIM2 diluted 1 : 500 in TBST, overnight with anti-TRPC6 antibody diluted 1 : 500 in TBST or 1 h with anti-β-actin antibody diluted 1 : 2000 in TBST, respectively. Phospho-eIF2α was detected by incubation for 2 h with anti-phospho-eIF2α antibody diluted 1 : 1000 in TBST. The primary antibody was removed, and blots were washed six times for 5 min each with TBST. To detect the primary antibody, blots were incubated for 1 h with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody diluted 1 : 10 000 in TBST, or Clean-Blot™ IP Detection Reagent diluted 1 : 250 in TBST, and then exposed to enhanced chemiluminescent reagents for 5 min. The density of bands was measured using a C-DiGit Chemiluminescent Western Blot Scanner (LI-COR

Biosciences, Lincoln, NE, U.S.A.). Data were normalized to the amount of protein recovered by the antibody used for the immunoprecipitation.

Caspase-3 activity assay

To determinate caspase-3 activity, 2×10^6 MCF7 resting cells or treated with 200 μ M TPEN for 30 min and MCF7 transfected with TRPC6 shRNA or TRPC6dn were lysed using ice-cold Nonidet P-40 buffer supplemented with 5 mM DTT, and then lysates were sonicated. Later, 250 μ l of cell lysates were mixed with 2 ml of Nonidet P-40 (supplemented with 5 mM DTT and 8.25 mM of caspase-3 substrate Z-DEVD-AFC) and were incubated at 37°C for 2 h. as described previously [19]. Substrate cleaving was measured with a fluorescence spectrophotometer with excitation wavelength of 400 nm and emission at 505 nm. The activity of caspase-3 was calculated from the cleavage of its specific fluorogenic substrate following the manufacturer's instructions.

Cell viability

Cell viability was estimated using Live/Dead® viability/cytotoxicity kit. Briefly, cells were incubated for 45 min with 2 μ M calcein-AM and 30 min with 4 μ M propidium iodide following the manufacturer's instructions. Cultured cells were placed on the stage of an EVOS FL auto 2 cell imaging system (ThermoFisher Scientific, Madrid, Spain). Samples were excited at 430 nm and 555 nm for calcein and propidium iodide, respectively, and the resulting fluorescence was recorded at 542 nm (for viable cells) and 624 nm (for dead cells). Cell viability was quantitated using Fiji ImageJ (NIH, Bethesda, MD, U.S.A.).

Statistical analysis

Analysis of statistical significance was performed using Student's *t*-test. $P < 0.05$ was considered to be significant for a difference.

Results

Expression of STIM2, Orai3 and TRPC6 in breast cancer cells

Western blot analysis of STIM2, Orai3 and TRPC6 in whole cell lysates reveals that STIM2 is similarly expressed in the non-tumoral breast epithelial cell line MCF10A, the ER+ breast cancer MCF7 and T47D cell lines and the triple negative breast cancer (TNBC) cell lines MDA-MB-468, BT20 and MDA-MB-231 (Figure 1 and Table 1). In contrast, in agreement with previous studies [12,13], the ER+ cell lines exhibit the greatest Orai3 expression and TRPC6 expression is significantly higher in all the breast cancer cell lines investigated as compared with non-tumoral cells (Figure 1 and Table 1; $P < 0.05$; $n = 4$).

Plasma membrane expression of TRPC6 in non-stimulated breast cancer cells

We have further investigated the plasma membrane localization of TRPC6 in resting breast cancer cells by surface biotinylation. As shown in Figure 2, plasma membrane expression of TRPC6 was clearly detected in non-tumoral MCF10A breast epithelial cells as well as in ER+ cancer cells an TNBC except in MDA-MB-231 cells, where the surface exposure of TRPC6 is significantly lower than in non-epithelial cells and the other breast cancer cells investigated (Figure 2; $P < 0.05$; $n = 4$). The surface expression of TRPC6 in the other TNBC cell lines investigated, MD-MB-468 and BT20, was similar to that in non-tumoral cells. Interestingly, the ER+ breast cancer cell lines MCF7 and T47D exhibit a significantly greater TRPC6 surface expression than non-epithelial cells (Figure 2; $P < 0.05$; $n = 4$). Note that TRPC6 appears as a double band in the Western blot analysis (Figures 1, 2). Although speculative, the upper band might correspond to a post-translationally modified form of the channel. Interestingly, the lower band does not seem to be inserted into the plasma membrane, thus suggesting that the upper band might be a glycosylated form of TRPC6 [20].

We have previously reported that Ca^{2+} influx through TRPC6 plays an important role in the activation of SOCE in ER+ MCF7 and TNBC MDA-MB-231 cell lines by inducing translocation of Orai channels to the plasma membrane [13,21]. As the current data reveals that TRPC6 is scarcely expressed in the plasma membrane in resting MDA-MB-231 cells, we have investigated whether store depletion by treatment with the SERCA inhibitor TG enhances surface expression of TRPC6. As depicted in Supplementary Figure S1, treatment for 10 s with TG significantly increases the plasma membrane expression of TRPC6 both in MCF7 and in MDA-MB-231 cells, thus suggesting that store depletion induces rapid insertion of the channel into the plasma membrane and supports the functional role of TRPC6 in SOCE previously described [13,21].

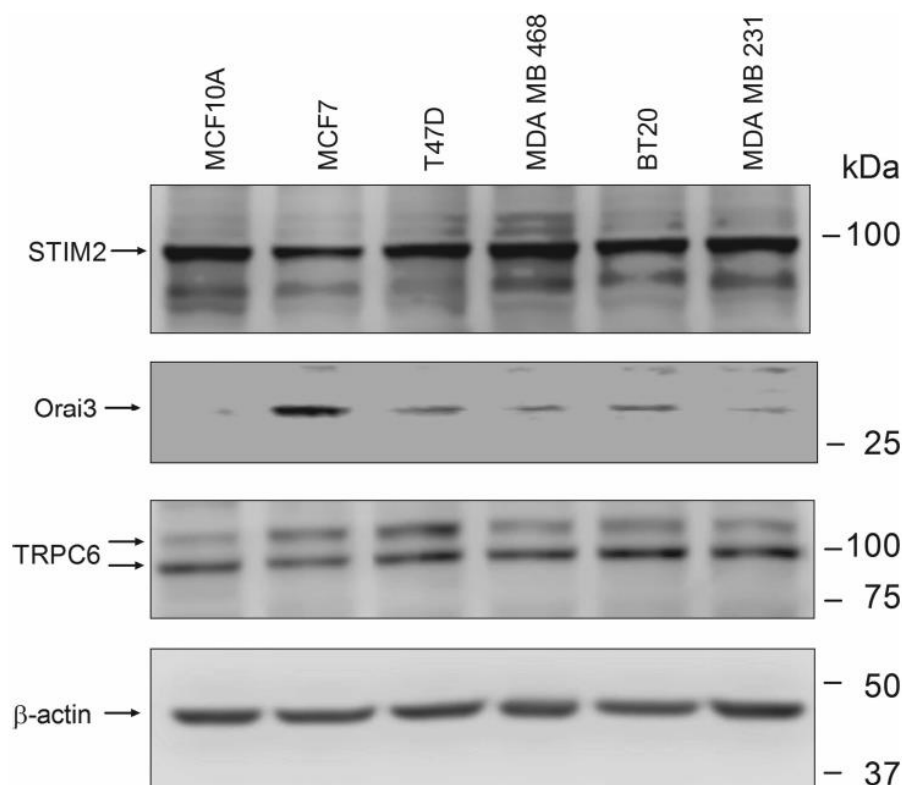


Figure 1. Expression of STIM2, Orai3 and TRPC6 in breast cancer and non-tumoral cell lines.

MCF10, MCF7, T47D, MDA-MB-468, BT20 and MDA-MB-231 cells were lysed and subjected to Western blotting using anti-STIM2, anti-Orai3, anti-TRPC6 or anti- β -actin antibodies followed by the appropriate secondary antibody coupled to peroxidase as described under Materials and Methods. Blots are representative of four independent experiments.

Table 1 Analysis of STIM2, Orai3 and TRPC6 expression in breast cancer cells

Cell line	Normalized protein expression		
	STIM2	Orai3	TRPC6
MCF10A	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0
MCF7	112.9 \pm 27.0	3549.1 \pm 354.6*	145.1 \pm 30.4*
T47D	114.5 \pm 11.8	1491.0 \pm 329.9*	155.6 \pm 15.7*
MDA-MB-468	91.0 \pm 15.0	1049.8 \pm 591.3*	148.5 \pm 22.7*
BT20	92.9 \pm 15.4	917.5 \pm 325.8*	124.6 \pm 18.0*
MDA-MB-231	89.8 \pm 9.0	426.1 \pm 263.1*	154.4 \pm 18.5*

MCF10, MCF7, T47D, MDA-MB-468, BT20 and MDA-MB-231 cells were lysed and subjected to Western blotting using anti-STIM2, anti-Orai3 and anti-TRPC6 antibodies followed by the appropriate secondary antibody coupled to peroxidase as described under Materials and Methods. Blots obtained from four independent experiments were analyzed using Image J software and densitometric ratios to corresponding actin were calculated. Densitometric values, presented as mean \pm SEM, were then normalized to those of the non-tumoral cell line MCF10A. * $P < 0.05$ compared with the expression of the corresponding protein in MCF10A cells.

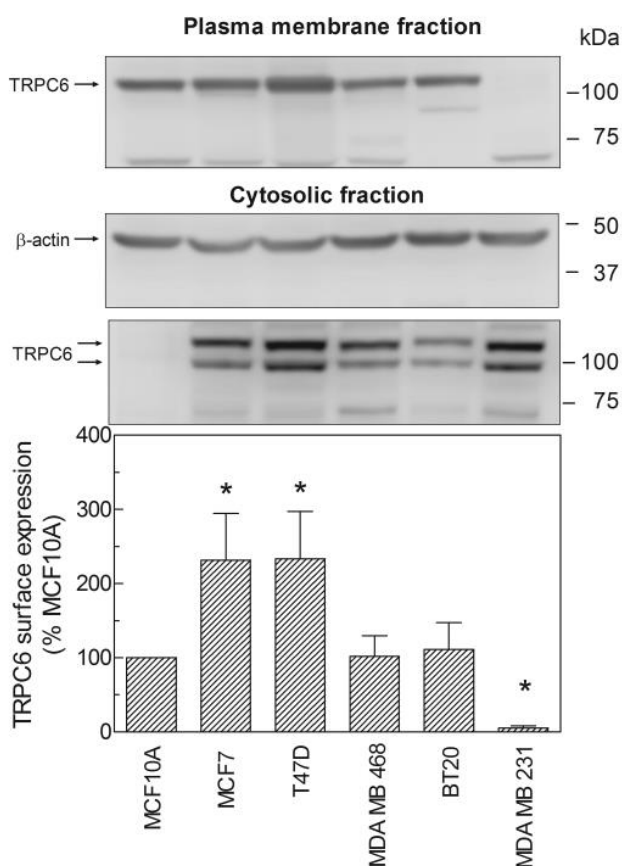


Figure 2. Surface expression of TRPC6 in breast cancer and non-tumoral cell lines.

Plasma membrane resident proteins of different breast cancer cell lines and the non-tumoral breast epithelial cell line MCF10A were labeled by biotinylation, as described under Material and Methods. The biotinylated fraction was separated in 10% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using anti-TRPC6 antibody, as indicated. Membranes were reprobed with anti- β -actin antibody, as control. Positions of molecular mass markers are shown on the right. These results are representative of four separate experiments. Bar graphs represent the quantification of TRPC6 surface expression. Results are recorded as arbitrary optical density units, expressed as mean \pm S.E.M. and presented as percentage of MCF10A cells. * $P < 0.05$ as compared with TRPC6 surface expression in MCF10A.

Role of TRPC6, STIM2 and Orai3 in resting cytosolic calcium concentration and TG induced calcium mobilization in MCF7 cells

As MCF7 cells exhibit a greater plasma membrane expression of TRPC6 under resting conditions, we have investigated the possible role of this channel in the maintenance of resting $[Ca^{2+}]_c$, as well as in the ability of the cells to accumulate Ca^{2+} into the endoplasmic reticulum. Mock-treated cells were perfused with a medium containing 1 mM Ca^{2+} and resting $[Ca^{2+}]_c$ was determined (Table 2). Cells were then perfused with a Ca^{2+} -free medium and treated with TG (1 μ M), which results in a transient increase in $[Ca^{2+}]_c$ due to Ca^{2+} release from the intracellular Ca^{2+} stores. Subsequent addition of $CaCl_2$ (1 mM) to the extracellular medium resulted in a further increase in $[Ca^{2+}]_c$ indicative of SOCE (Figure 3D). Cell transfection with shTRPC6 attenuated TRPC6 expression and significantly reduced both the resting $[Ca^{2+}]_c$, as well as TG-induced Ca^{2+} release and SOCE estimated as the area under the curve and the slope of the increase in $[Ca^{2+}]_c$ upon addition of TG or Ca^{2+} , respectively (Figure 3A and E and Table 2). To discard non-ionotropic effects of TRPC6 we repeated the experiments in cells expressing a pore-dead TRPC6dn mutant. As observed in Figure 3F and Table 2, overexpression of TRPC6dn significantly attenuated resting $[Ca^{2+}]_c$ and TG-induced Ca^{2+} release and entry. These findings strongly suggest that TRPC6 plays an important role in the maintenance of resting $[Ca^{2+}]_c$ as well as in the ability of

Table 2 Role of STIM2, Orai3 and TRPC6 in resting $[Ca^{2+}]_c$ and TG-evoked Ca^{2+} mobilization in MCF7 cells

Treatment	Resting fura-2 fluorescence ratio (a.u.)	TG-induced Ca^{2+} release (AUC)	K_1	TG-induced Ca^{2+} entry (AUC)	K_1
Control	0.68 ± 0.02	8.8 ± 0.4	0.0018 ± 0.0001	21.0 ± 1.0	0.0036 ± 0.0002
shTRPC6	0.59 ± 0.01*	6.4 ± 1.3*	0.0013 ± 0.0003*	16.3 ± 1.1*	0.0028 ± 0.0002*
TRPC6dn	0.56 ± 0.03*	5.8 ± 0.8*	0.0010 ± 0.0001*	8.7 ± 1.3*	0.0015 ± 0.0002*
siSTIM2	0.66 ± 0.03	7.2 ± 0.8*	0.0014 ± 0.0001*	15.9 ± 2.3*	0.0023 ± 0.0004*
shTRPC6/siSTIM2	0.50 ± 0.04*	5.5 ± 0.8*	0.0011 ± 0.0001*	13.5 ± 1.6*	0.0021 ± 0.0002*
TRPC6dn/siSTIM2	0.56 ± 0.05*	4.3 ± 1.2*	0.0006 ± 0.0002*	8.4 ± 1.9*	0.0012 ± 0.0003*
siOrai3	0.52 ± 0.04*	6.2 ± 1.1*	0.0010 ± 0.0002*	14.5 ± 2.3*	0.0025 ± 0.0005*
siSTIM2/siOrai3	0.49 ± 0.04*	6.4 ± 1.1*	0.0012 ± 0.0002*	11.3 ± 1.1*	0.0017 ± 0.0003*

MCF7 cells were transfected with siSTIM2, siOrai3, shTRPC6, TRPC6dn mutant expression plasmid, alone or in combination, as indicated, or empty vector. Forty-eight hours after transfection, fura-2-loaded cells were perfused with a medium containing 1 mM Ca^{2+} and resting $[Ca^{2+}]_c$ was estimated. Cells were then perfused with a Ca^{2+} -free medium (100 μ M EGTA added) and then stimulated with TG (1 μ M) followed by reintroduction of external Ca^{2+} (final concentration 1 mM) to initiate Ca^{2+} entry, following the protocol described for Figure 3. TG-evoked Ca^{2+} release and entry, as well as the constants of the exponential increase in fura-2 fluorescence ratio were estimated as described in Material and Methods. Data are mean ± SEM of 40 cells/day/3–5 days.

MCF7 cells to accumulate Ca^{2+} into the endoplasmic reticulum. Furthermore, these results support a role for TRPC6 in SOCE in these cells, in agreement with our previous studies [13]. STIM2 has been reported to play a role in the activation of SOCE upon small changes in $[Ca^{2+}]_{ER}$ [22,23]. Furthermore, SOCE in MCF7 cells has been found to be dependent on STIM2 [12]. Hence, we have explored its role in the maintenance of $[Ca^{2+}]_c$ and $[Ca^{2+}]_{ER}$ in MCF7 cells at resting conditions. Our results indicate that attenuation of STIM2 expression, by transfection with siSTIM2 (Figure 3B), slightly decreases the resting $[Ca^{2+}]_c$ and significantly reduced TG evoked Ca^{2+} efflux from the endoplasmic reticulum as well as SOCE (Figure 3G and Table 2). Simultaneous attenuation of STIM2 expression and either TRPC6 knockdown or expression of TRPC6dn further enhanced the inhibitory effect on MCF7 resting $[Ca^{2+}]_c$ as well as in TG-evoked Ca^{2+} release and entry (Figures 3H and I and Table 2).

Orai3 has also been reported to play an important role in SOCE in MCF7 cells. Therefore, we have further analyzed its role in the maintenance of resting cytosolic and endoplasmic reticulum Ca^{2+} levels. As depicted in Figure 3C, J and K and Table 2, Orai3 expression silencing, alone or in combination with STIM2 knockdown, significantly attenuated basal $[Ca^{2+}]_c$ and TG-induced Ca^{2+} release. In addition, as expected, this procedure significantly reduced SOCE. Altogether, these findings provide for the first time evidence for a role of TRPC6, STIM2 and Orai3 in the maintenance of $[Ca^{2+}]_c$ and $[Ca^{2+}]_{ER}$ in ER+ MCF7 cells under resting conditions.

Interaction of TRPC6 with STIM2 in resting MCF10A and MCF7 cells

We have further explored the possible interaction between TRPC6 and STIM1 in non-stimulated MCF10A and MCF7 by co-immunoprecipitation. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-TRPC6 antibody followed by Western blotting with anti-STIM2 antibody. As shown in Figure 4, a detectable interaction between TRPC6 and STIM2 was observed both in non-tumoral MCF10A and ER+ MCF7 cells under resting conditions. These findings support a role for both proteins in the maintenance of Ca^{2+} homeostasis in resting cells. We have further assessed whether the interaction between TRPC6 and STIM2 might be regulated by rises in $[Ca^{2+}]_c$. A mechanism involved in the restoration of cytosolic and endoplasmic reticulum Ca^{2+} levels would be expected to be impaired by rises in $[Ca^{2+}]_c$. To increase $[Ca^{2+}]_c$ MCF10A and MCF7 cells were treated with the Ca^{2+} ionophore, ionomycin (0.5 μ M), in the presence of 1 mM extracellular Ca^{2+} . As shown in Figure 4, $[Ca^{2+}]_c$ elevation in MCF10A did not alter TRPC6-STIM2 co-immunoprecipitation, thus suggesting that this interaction is constitutive. In contrast, the interaction between TRPC6 and STIM2 was significantly attenuated by the rise in $[Ca^{2+}]_c$ induced by ionomycin (Figure 4; $P < 0.05$; $n = 6$). These findings indicate that, unlike in non-tumoral breast epithelial cells, the interaction between TRPC6 and STIM2 in ER+ breast cancer MCF7 cells is regulated by changes in $[Ca^{2+}]_c$, which suggests that this mechanism might be a physiological modulator of Ca^{2+} homeostasis in resting conditions.

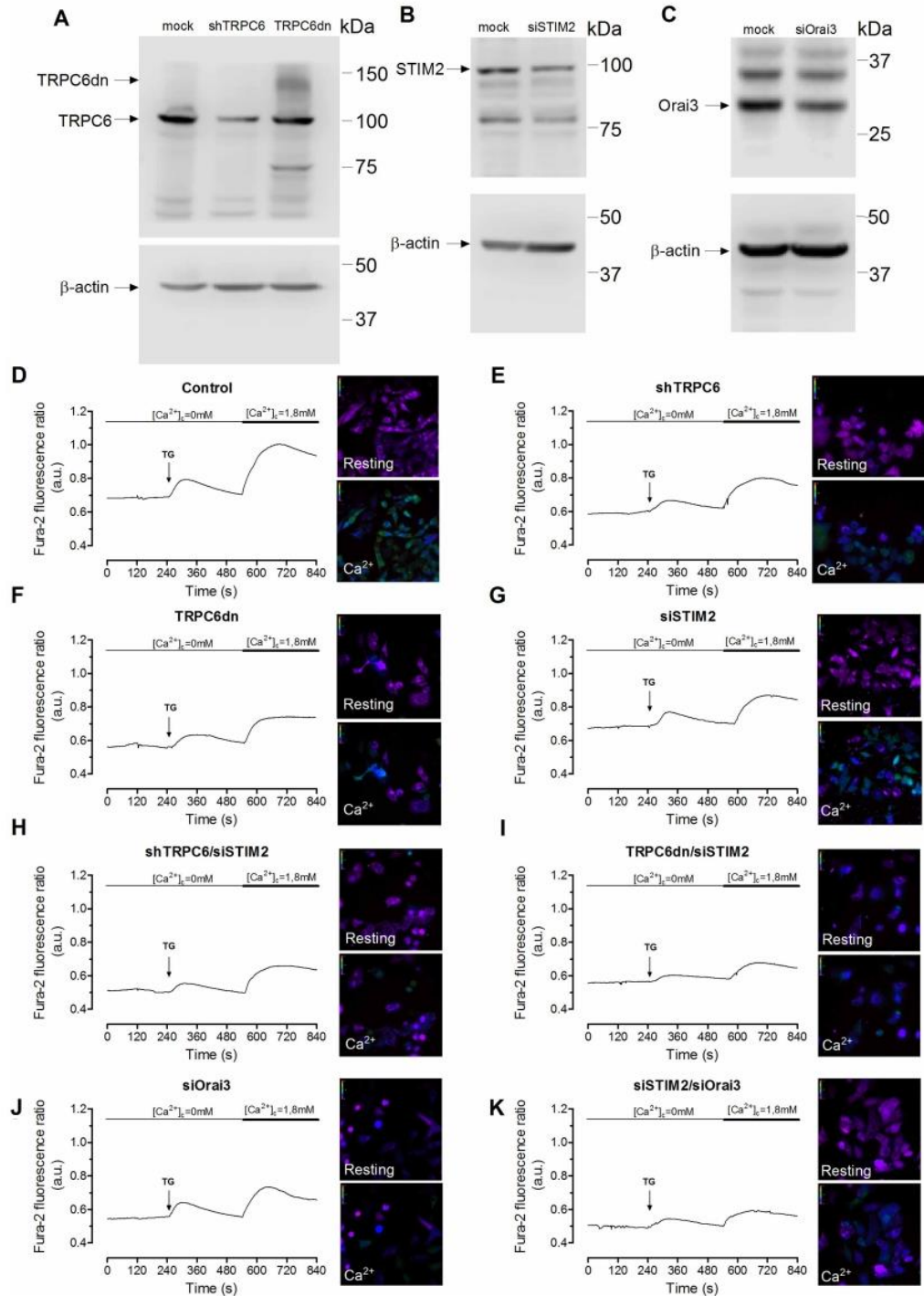


Figure 3. Role of STIM2, Orai3 and TRPC6 in resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and TG-evoked Ca^{2+} mobilization in MCF7 cells. Part 1 of 2 MCF7 cells were transfected with siSTIM2, siOrai3, shTRPC6, TRPC6dn mutant expression plasmid, alone or in combination, as indicated, or empty vector. After 48 h cells were lysed and subjected to Western blotting with anti-TRPC6 (A), anti-STIM2 (B) or anti-Orai3 antibody (C), followed by reprobing with anti- β -actin antibody for protein loading control. Molecular masses indicated on the right were determined using molecular-mass markers run in the same gel. (D–K) Forty-eight hours after transfection, fura-2-loaded cells were perfused with a Ca^{2+} -free medium (100 μM EGTA added) and then stimulated with TG (1 μM) followed by reintroduction of external Ca^{2+} (final concentration 1 mM) to initiate Ca^{2+} entry. Images of fura-2

Figure 3. Role of STIM2, Orai3 and TRPC6 in resting $[Ca^{2+}]_c$ and TG-evoked Ca^{2+} mobilization in MCF7 cells. Part 2 of 2 fluorescence ratio were taken 30 s before the addition of TG (Resting) and 2 min after the addition of Ca^{2+} to the extracellular medium (Ca^{2+}). Traces are representative of 40 cell/day/3–5 days.

Role of TRPC6 and STIM2 in ER calcium level in MCF7 cells

Next, we assessed the functional role of TRPC6 and STIM2 in the maintenance of $[Ca^{2+}]_{ER}$ in MCF7 cells co-transfected with pCMV R-CEPIA1er and either siSTIM2 or expression plasmid for TRPC6dn. Experiments were performed at resting conditions and after treatment with TG in combination with ionomycin (in order to increase the Ca^{2+} leakage rate). As shown in Figures 5A,B, attenuation of STIM2 expression as well as

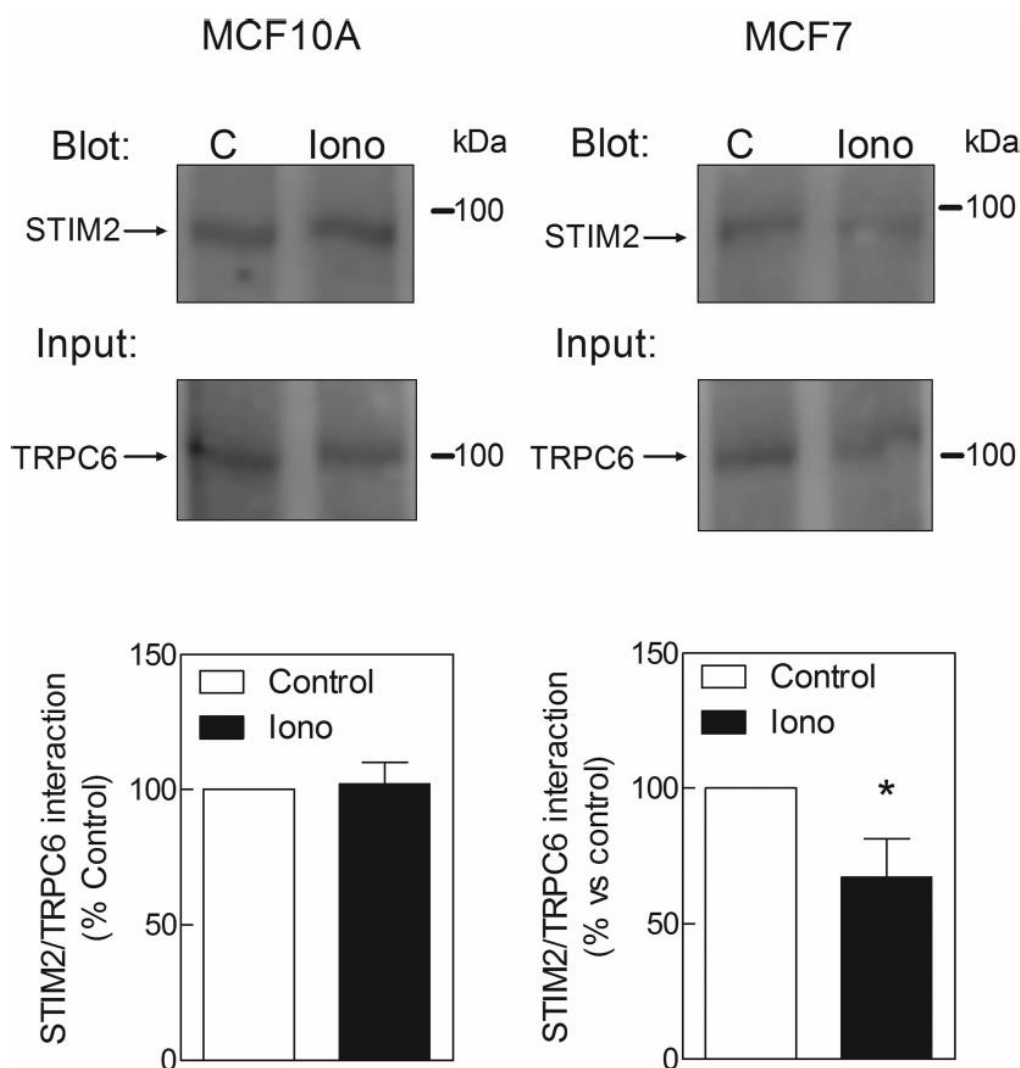


Figure 4. TRPC6 interaction with STIM2 in resting conditions is regulated by Ca^{2+} .

MCF7 cells were suspended in a medium containing 1 mM Ca^{2+} and then treated with 0.5 μ M ionomycin (Iono) for 3 min or left untreated and lysed. Samples were immunoprecipitated with anti-TRPC6 antibody, subjected to Western blotting using anti-STIM2 antibody and reprobbed with anti-TRPC6 antibody for protein loading control. Bar graph represents the quantification of TRPC6-STIM2 association under resting conditions or upon treatment with ionomycin. These results are representative of six independent experiments. Results are expressed as mean \pm S.E.M. and presented as percentage of control (resting cells).

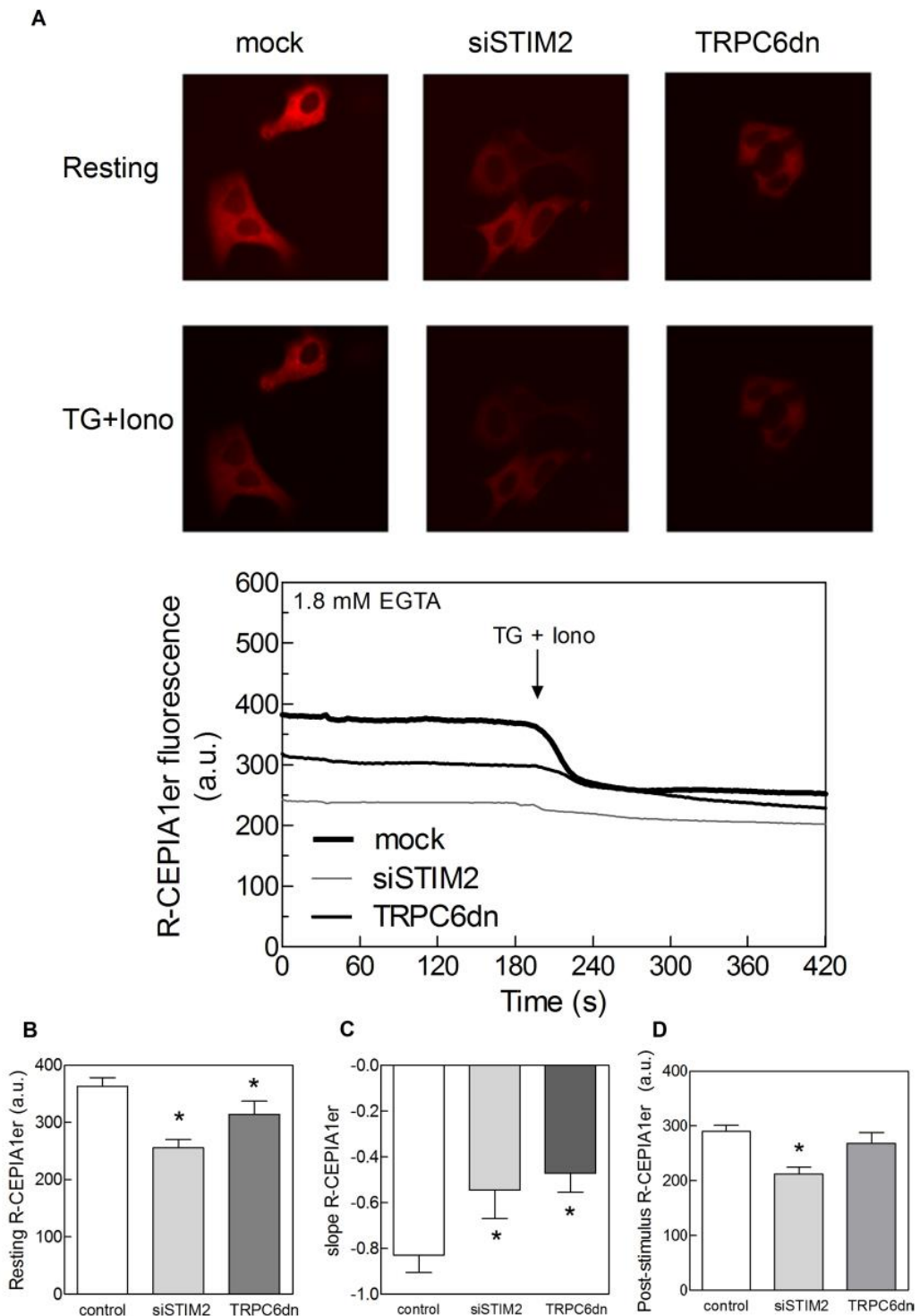


Figure 5. TRPC6 and STIM2 play a relevant role in endoplasmic reticulum Ca^{2+} homeostasis.

(A) MCF7 cells were transfected with siSTIM2, TRPC6dn mutant expression plasmid, as well as with pCMV R-CEPIA1er or empty vector. Forty-eight hours after transfection, cells were perfused with a Ca^{2+} -free medium (1.8 mM EGTA added) and then stimulated with TG (2 μM) in combination with ionomycin (2 μM) to deplete the ER Ca^{2+} store. Traces are representative of 40 cells/day/3–5 days. Bar graph represents the resting (B) and post-stimulus (D) R-CEPIA1er fluorescence, as well as the decay constant (C; slope) of the R-CEPIA1er fluorescence after treatment with TG + Iono.

overexpression of TRPC6dn significantly attenuated R-CEPIA1er fluorescence in resting cells ($P < 0.05$), which strongly suggests that both TRPC6 and STIM2 are required for the maintenance of resting $[Ca^{2+}]_{ER}$. Cell treatment with TG in combination with ionomycin significantly attenuated the R-CEPIA1er fluorescence, as expected, due to Ca^{2+} efflux from the endoplasmic reticulum, reaching a plateau that was significantly lower in cells transfected with siSTIM2 (Figures 5A,D) probably due to the low resting ER Ca^{2+} level in these cells. The slope of the decrease in R-CEPIA1er fluorescence was significantly reduced in cells transfected with siSTIM2 or expression plasmid for TRPC6dn (Figure 5; $P < 0.05$; $n = 40$ cells/day/3–5 days). This observation indicates that the concentration gradient, the predominant driving force for Ca^{2+} efflux from the ER, is reduced upon STIM2 silencing or expression of the TRPC6dn mutant. Altogether, these findings indicate that functional STIM2 and TRPC6 are required for the maintenance of $[Ca^{2+}]_{ER}$ at rest in MCF7 cells.

Impairment of TRPC6 function induces ER stress and caspase-3 activation in MCF7 cells

To further explore the role of TRPC6 in endoplasmic reticulum Ca^{2+} homeostasis we have assessed whether impairment of TRPC6 function results in the activation of endoplasmic reticulum stress. MCF7 cells were transfected with shTRPC6 or expression plasmid for TRPC6dn and endoplasmic reticulum stress was analyzed by determination of the phosphorylation of eIF2 α at Ser⁵¹, a cellular response to endoplasmic reticulum stress [24]. Our results indicate that cell treatment with N,N,N',N'-tetrakis-(2-pyridylmethyl)-ethylenediamine (TPEN), a well-known endoplasmic stress activator that induces *in situ* chelation of intraluminal Ca^{2+} [25], significantly enhances eIF2 α phosphorylation at Ser⁵¹ (Figure 6; $P < 0.05$; $n = 6$). Interestingly, as shown in Figure 6, both, silencing TRPC6 expression and overexpressing the TRPC6dn mutant significantly enhanced phosphorylation of eIF2 α ($P < 0.05$; $n = 6$), which strongly suggests that impairment of TRPC6 function leads to ER stress in MCF7 cells and confirms a relevant role for TRPC6 in endoplasmic reticulum Ca^{2+} homeostasis in these cells. ER stress has been reported to induce caspase-3 activation [26,27], a crucial mediator of apoptosis. Hence we have assessed whether impairment of TRPC6 function leads to activation of caspase-3 and found that both, silencing of TRPC6 expression and overexpression of the TRPC6dn mutant significantly enhanced caspase-3 activation to 317 ± 14 and $422 \pm 19\%$ of control cells ($P < 0.05$; $n = 6$; as an internal control, treatment with TPEN significantly enhanced caspase-3 activity to $229 \pm 4\%$ of control).

Next, we explored the effect of TRPC6 silencing and overexpression of the TRPC6dn mutant on cell viability by using the cell-permeant dye calcein and propidium iodide. Breast cancer MCF7 cells were transfected with shTRPC6, expression plasmid for TRPC6dn or empty vector and 48 h later calcein and propidium iodide fluorescences were assessed. As shown in Figure 7, our results indicate that $91.5 \pm 2.3\%$ of the mock-treated cells show calcein fluorescence. However, TRPC6 silencing or expression of TRPC6dn significantly attenuated calcein staining to 83.8 ± 1.1 and $70.3 \pm 5.9\%$, respectively (Figure 7; $P < 0.05$; $n = 12\ 400$ – $36\ 700$ cells). Conversely, propidium iodide staining in MCF7 cells was $8.4 \pm 2.3\%$ in mock-treated cells and 16.1 ± 1.1 and $29.6 \pm 5.9\%$, respectively, in cells transfected with shTRPC6 or expression plasmid for TRPC6dn (Figure 7; $P < 0.05$; $n = 12\ 400$ – $36\ 700$ cells). These findings indicate that impairment of TRPC6 function attenuates cell viability in MCF7 cells.

Discussion

TRPC6 forms non-selective cation channels that are engaged in molecular signalplexes that regulate a number of cellular functions [28]. TRPC6 channels are activated by a variety of chemical and mechanical stimuli, leading to rises in $[Ca^{2+}]_c$. Its activation by the second messenger diacylglycerol led to the classification of TRPC6 as a second messenger-operated channel, although a relevant role for TRPC6 in the activation of SOCE has been described. For instance, in the ER+ MCF7 and the TNBC MD-MB-231 cell lines we have reported that SOCE is strongly dependent on TRPC6 through a mechanism that involves the translocation of Orai channels, Orai3 for MCF7 or Orai1 for MDA-MB-231 cells, to the plasma membrane [13]. While both cell types overexpress TRPC6 at the protein level, only MCF7 cells exhibit an elevated expression of this channel in the plasma membrane at rest, suggesting that its role in Ca^{2+} homeostasis in resting cells is worth investigating. Here, we show that TRPC6 plays a relevant role in the maintenance of resting $[Ca^{2+}]_c$ and endoplasmic reticulum Ca^{2+} homeostasis in the ER+ MCF7 cell line as both attenuation of TRPC6 expression as well as expression of a pore-dead TRPC6 mutant (TRPC6dn) significantly attenuated the resting $[Ca^{2+}]_c$ and $[Ca^{2+}]_{ER}$. Our results indicate that the role of TRPC6 in Ca^{2+} influx in rest is regulated rather than constitutive. This

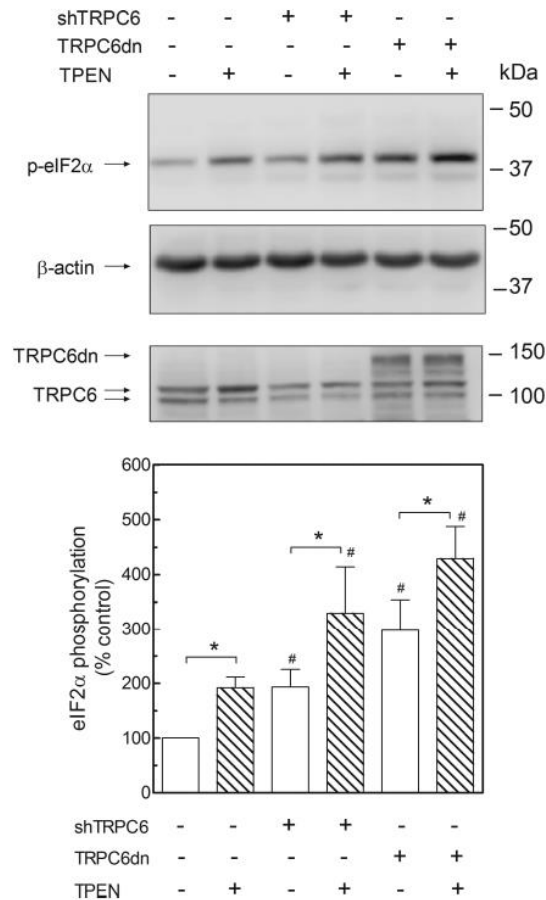


Figure 6. Impairment of TRPC6 function increases eIF2 α phosphorylation.

(A) MCF7 cells were transfected with TRPC6dn expression plasmid, shTRPC6 or scramble plasmids, as indicated. Forty-eight hours after transfection cells were treated in a Ca²⁺-free medium (100 μ M EGTA was added) with 200 μ M TPEN for 30 min and phosphorylation of eIF2 α was determined by Western blotting. Molecular masses indicated on the right were determined using molecular-mass markers run in the same gel. Values are presented as means \pm SEM of six separate experiments and expressed as percentage of control. Reprobing of the membranes with anti- β -actin antibody was used for protein loading control. * $P < 0.05$ compared with cells not treated with TPEN. # $P < 0.05$ compared with cells transfected with scramble plasmids and not treated with TPEN.

statement is based on the following observations: (1) overexpression of the TRPC6dn mutant attenuated the resting cytosolic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ levels, despite this manoeuvre is not expected to alter the plasma membrane expression and function of native channels, that, in the case of operating in a constitutive mode, would have maintained the necessary influx of Ca²⁺. (2) Our results indicate that STIM2, which is sensitive to small changes in [Ca²⁺]_{ER}, also plays a relevant role in maintaining the resting cytosolic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ content. (3) STIM2 co-immunoprecipitates with TRPC6 in MCF7 cells at resting conditions through a mechanism that is regulated by intracellular Ca²⁺, in contrast with the Ca²⁺-independent STIM2-TRPC6 interaction found in non-tumoral MCF10A cells.

As a result of the role of TRPC6 in the maintenance of [Ca²⁺]_{ER}, impairment of TRPC6 function either by attenuation of its expression or by expression of the TRPC6dn significantly enhanced phosphorylation of eIF2 α at Ser⁵¹, a cellular response to endoplasmic reticulum stress that represses protein synthesis [29]. TRPC6 has been found to be involved in the activation of endoplasmic reticulum stress induced by albumin overload in podocytes [30]. Furthermore, exacerbated activation of mechanosensors by TRPC6 in conditions of diabetes mellitus and hypertension results in impaired Ca²⁺ homeostasis and endoplasmic reticulum stress [31].

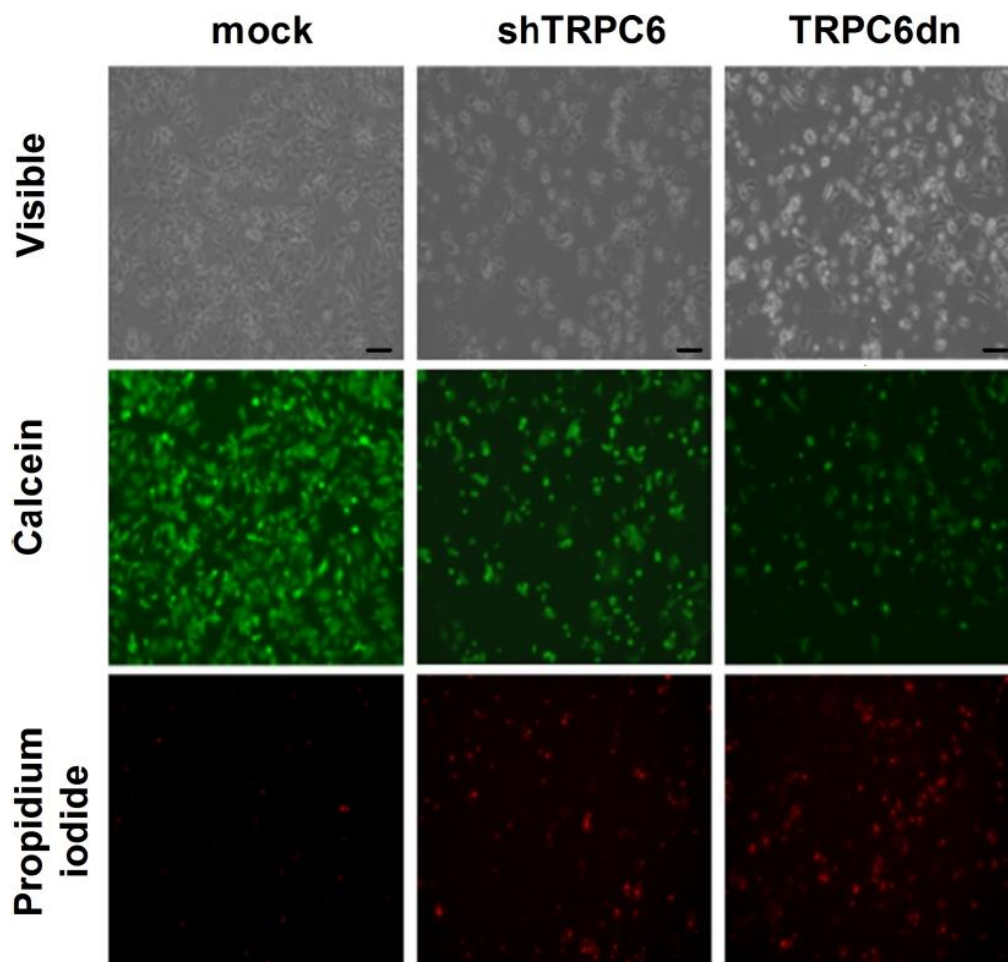


Figure 7. TRPC6 silencing and expression of the TRPC6dn mutant impair cell viability in MCF7 cells.

MCF7 cells were transfected with shTRPC6, expression plasmid for TRPC6dn or empty vector (Control). Forty-eight hours later cells were loaded with calcein and propidium iodide and cell staining was visualized using an EVOS FL auto 2 cell imaging system as described in Material and Methods. Bar represents 50 μ M.

However, to our knowledge, this is the first description of the involvement of TRPC6 function impairment in the induction of endoplasmic reticulum stress. This observation is especially relevant taking into account that it occurs in cancer cells, since we have previously found that TRPC6 plays an important functional role both in ER+ and triple negative breast cancer cells, while this channel plays a minor role, if any, in non-tumoral breast epithelial cells [13]. Our findings suggest that ER+ MCF7 breast cancer cell viability is strongly dependent on TRPC6 function, which, together with the fact that TRPC6 is a channel with a more restricted function than other Ca^{2+} permeable channels, such as Orai1, suggest that TRPC6 might be a potential target for the treatment of luminal breast cancer.

In addition to STIM2 and TRPC6, Orai3 has been reported to play a major role in SOCE in ER+ breast cancer cells [12,13]. Consistent with previous studies, our results confirm overexpression of Orai3 in MCF7 cells and its functional role in the activation of SOCE. Furthermore, we have found that Orai3, alone or in combination with STIM2, plays a relevant role in the maintenance of $[\text{Ca}^{2+}]_c$ as well as the ability of MCF7 cells to accumulate Ca^{2+} into the endoplasmic reticulum, thus indicating the important role of SOCE in these processes.

Altogether, our results provide evidence for a role for STIM2, TRPC6 and Orai3 in the maintenance of cytosolic and endoplasmic reticulum Ca^{2+} content under resting conditions in ER+ breast cancer MCF7 cells. Focusing on STIM2 and TRPC6, this mechanism, which is likely activated by STIM2 upon small changes in

$[Ca^{2+}]_{ER}$, involves the activation of TRPC6 probably by protein–protein interaction and is reversed by $[Ca^{2+}]_c$ rises. Impairment of the STIM2-TRPC6-mediated Ca^{2+} influx at rest leads to impairment of endoplasmic reticulum Ca^{2+} homeostasis and the development of endoplasmic reticulum stress and caspase-3 activation. Activation of endoplasmic reticulum stress in ER+ breast cancer MCF7 cells by impairment of TRPC6 function suggests that this channel might be a potential candidate for the development of anti-tumoral strategies.

Competing Interests

The authors declare that there are no competing interests associated with the manuscript.

Funding

This work was supported by MINECO (Grant BFU2016-74932-C2-1-P and PID2019-104084GB-C21) and Junta de Extremadura-Consejería de Economía e Infraestructura-FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional, Grants IB16046 and GR18061). J.J.L. and I.J. are supported by a contract from Junta de Extremadura (TA18011 and TA18054, respectively). J.S.-C. and C.C. are supported by a contract from Ministry of Science, Innovation, and Universities, Spain and Junta de Extremadura-Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

Author Contributions

J.S.-C., J.J.L., C.C., I.J. and L.G.-G. performed the experiments, G.M.S. participated in the redaction of the draft and discussion and J.A.R. designed the study, drafted the manuscript and discussed the results.

Abbreviations

$[Ca^{2+}]_c$, cytosolic free-calcium concentration; BSA, bovine serum albumin; ER+, estrogen receptor-positive; HBS, HEPES-buffered saline; PM, plasma membrane; TBST, tris-buffered saline with Tween 20; TG, thapsigargin.

References

- Berridge, M.J. (2012) Calcium signalling remodelling and disease. *Biochem. Soc. Trans.* **40**, 297–309 <https://doi.org/10.1042/BST20110766>
- Lopez, J.J., Jardin, I., Sanchez-Collado, J., Salido, G.M., Smani, T. and Rosado, J.A. (2020) TRPC channels in the SOCE scenario. *Cells* **9**, 126 <https://doi.org/10.3390/cells9010126>
- DeHaven, W.I., Smyth, J.T., Boyles, R.R. and Putney, Jr, J.W. (2007) Calcium inhibition and calcium potentiation of Orai1, Orai2, and Orai3 calcium release-activated calcium channels. *J. Biol. Chem.* **282**, 17548–17556 <https://doi.org/10.1074/jbc.M611374200>
- Albarran, L., Berna-Erro, A., Dionisio, N., Redondo, P.C., Lopez, E., Lopez, J.J. et al. (2014) TRPC6 participates in the regulation of cytosolic basal calcium concentration in murine resting platelets. *Biochim. Biophys. Acta* **1843**, 789–796 <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.01.014>
- Soboloff, J., Rothberg, B.S., Madesh, M. and Gill, D.L. (2012) STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 549–565 <https://doi.org/10.1038/nrm3414>
- Zhou, Y., Mancarella, S., Wang, Y., Yue, C., Ritchie, M., Gill, D.L. et al. (2009) The short N-terminal domains of STIM1 and STIM2 control the activation kinetics of Orai1 channels. *J. Biol. Chem.* **284**, 19164–19168 <https://doi.org/10.1074/jbc.C109.010900>
- Ong, H.L., de Souza, L.B., Zheng, C., Cheng, K.T., Liu, X., Goldsmith, C.M. et al. (2015) STIM2 enhances receptor-stimulated Ca^{2+} signaling by promoting recruitment of STIM1 to the endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions. *Sci. Signal.* **8**, ra3 <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005748>
- Stewart, T.A., Yapa, K.T. and Monteith, G.R. (2015) Altered calcium signaling in cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1848**, 2502–2511 <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2014.08.016>
- Villalobos, C., Sobradillo, D., Hernandez-Morales, M. and Nunez, L. (2016) Remodeling of calcium entry pathways in cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **898**, 449–466 https://doi.org/10.1007/978-3-319-26974-0_19
- Jardin, I., Lopez, J.J., Salido, G.M. and Rosado, J.A. (2018) Store-Operated Ca^{2+} entry in breast cancer cells: remodeling and functional role. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 4053 <https://doi.org/10.3390/ijms19124053>
- Roberts-Thomson, S.J., Chalmers, S.B. and Monteith, G.R. (2019) The calcium-Signaling toolkit in cancer: remodeling and targeting. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **11**, a035204 <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a035204>
- Motiani, R.K., Abdullaev, I.F. and 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. *J. Biol. Chem.* **285**, 19173–19183 <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.102582>
- Jardin, I., Diez-Bello, R., Lopez, J.J., Redondo, P.C., Salido, G.M., Smani, T. et al. (2018) TRPC6 channels are required for proliferation, migration and invasion of breast cancer cell lines by modulation of Orai1 and Orai3 surface exposure. *Cancers (Basel)* **10**, 331 <https://doi.org/10.3390/cancers10090331>
- Sanchez-Collado, J., Lopez, J.J., Jardin, I., Camello, P.J., Falcon, D., Regodon, S. et al. (2019) Adenylyl cyclase type 8 overexpression impairs phosphorylation-dependent Orai1 inactivation and promotes migration in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancers (Basel)* **11**, E1624 <https://doi.org/10.3390/cancers11111624>
- Cantonero, C., Sanchez-Collado, J., Lopez, J.J., Salido, G.M., Rosado, J.A. and Redondo, P.C. (2020) Arachidonic acid attenuates cell proliferation, migration and viability by a mechanism independent on calcium entry. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 3315 <https://doi.org/10.3390/ijms21093315>

- 16 Lopez, E., Frischauf, I., Jardin, I., Derler, I., Muik, M., Cantonero, C. et al. (2019) STIM1 phosphorylation at Y(316) modulates its interaction with SARAF and the activation of SOCE and I CRAC. *J. Cell Sci.* **132**, jcs226019 <https://doi.org/10.1242/jcs.226019>
- 17 Albarran, L., Lopez, J.J., Gomez, L.J., Salido, G.M. and Rosado, J.A. (2016) SARAF modulates TRPC1, but not TRPC6, channel function in a STIM1-independent manner. *Biochem. J.* **473**, 3581–3595 <https://doi.org/10.1042/BCJ20160348>
- 18 Zbidi, H., Jardin, I., Woodard, G.E., Lopez, J.J., Berna-Erro, A., Salido, G.M. et al. (2011) STIM1 and STIM2 are located in the acidic Ca²⁺ stores and associates with Orai1 upon depletion of the acidic stores in human platelets. *J. Biol. Chem.* **286**, 12257–12270 <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.190694>
- 19 Rosado, J.A., Lopez, J.J., Gomez-Arteta, E., Redondo, P.C., Salido, G.M. and Pariente, J.A. (2006) Early caspase-3 activation independent of apoptosis is required for cellular function. *J. Cell Physiol.* **209**, 142–152 <https://doi.org/10.1002/jcp.20715>
- 20 Dietrich, A., Mederos y Schnitzler, M., Emmel, J., Kalwa, H., Hofmann, T. and Gudermann, T. (2003) N-linked protein glycosylation is a major determinant for basal TRPC3 and TRPC6 channel activity. *J. Biol. Chem.* **278**, 47842–47852 <https://doi.org/10.1074/jbc.M302983200>
- 21 Diez-Bello, R., Jardin, I., Lopez, J.J., El Haouari, M., Ortega-Vidal, J., Altarejos, J. et al. (2019) (-)Oleocanthal inhibits proliferation and migration by modulating Ca(2+) entry through TRPC6 in breast cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1866**, 474–485 <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.10.010>
- 22 Brandman, O., Liou, J., Park, W.S. and Meyer, T. (2007) STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ levels. *Cell* **131**, 1327–1339 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.039>
- 23 Berna-Erro, A., Jardin, I., Salido, G.M. and Rosado, J.A. (2017) Role of STIM2 in cell function and physiopathology. *J. Physiol.* **595**, 3111–3128 <https://doi.org/10.1113/JP273889>
- 24 Lee, Y.Y., Cevallos, R.C. and Jan, E. (2009) An upstream open reading frame regulates translation of GADD34 during cellular stresses that induce eIF2alpha phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **284**, 6661–6673 <https://doi.org/10.1074/jbc.M806735200>
- 25 Alexandru, N., Jardin, I., Popov, D., Simionescu, M., Garcia-Estan, J., Salido, G.M. et al. (2008) Effect of homocysteine on calcium mobilization and platelet function in type 2 diabetes mellitus. *J. Cell Mol. Med.* **12**, 2015–2026 <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00200.x>
- 26 Shiraiishi, H., Okamoto, H., Yoshimura, A. and Yoshida, H. (2006) ER stress-induced apoptosis and caspase-12 activation occurs downstream of mitochondrial apoptosis involving Apaf-1. *J. Cell Sci.* **119**, 3958–3966 <https://doi.org/10.1242/jcs.03160>
- 27 Lopez, J.J., Redondo, P.C., Salido, G.M., Pariente, J.A. and 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. *J. Thromb. Haemost.* **7**, 992–999 <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03431.x>
- 28 Bouron, A., Chauvet, S., Dwyer, S. and Rosado, J.A. (2016) Second messenger-Operated calcium entry through TRPC6. *Adv. Exp. Med. Biol.* **898**, 201–249 https://doi.org/10.1007/978-3-319-26974-0_10
- 29 Lewerenz, J. and Maher, P. (2009) Basal levels of eIF2[alpha] phosphorylation determine cellular antioxidant status by regulating ATF4 and xCT expression. *J. Biol. Chem.* **284**, 1106–1115 <https://doi.org/10.1074/jbc.M807325200>
- 30 Chen, S., He, F.F., Wang, H., Fang, Z., Shao, N., Tian, X.J. et al. (2011) Calcium entry via TRPC6 mediates albumin overload-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in podocytes. *Cell Calcium* **50**, 523–529 <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.08.008>
- 31 Wang, Z., do Carmo, J.M., da Silva, A.A., Fu, Y. and Hall, J.E. (2020) Mechanisms of synergistic interactions of diabetes and hypertension in chronic kidney disease: Role of mitochondrial dysfunction and ER stress. *Curr. Hypertens Rep.* **22**, 15 <https://doi.org/10.1007/s11906-020-1016-x>

Discusión

6 Discusión:

La ECC es un mecanismo ubicuo de transducción intracelular, que es controlado por el estado de relleno de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} . Las proteínas STIM y Orai son los componentes fundamentales de la ECC, aunque los canales TRPC1 también han sido propuestos como mediadores de corrientes capacitativas menos selectivas para el Ca^{2+} en algunos modelos celulares. STIM1 y STIM2 desarrollan una función protectora y velan por el mantenimiento de la $[\text{Ca}^{2+}]$ reticular, tanto en estado basal como tras la activación celular [196], [350]. Con el vaciamiento de los depósitos reticulares, las moléculas STIM sufren un proceso de activación que desencadena un cambio conformacional en su estructura, consecutivamente se produce la translocación de las moléculas de STIM activadas a las zonas de aproximación entre la membrana plasmática y el RE y su interacción con las proteínas Orai, provocando la apertura de los canales capacitativos [150]. Los canales Orai nativos han sido recientemente descritos como un heterohexámero constituido por la combinación de los tres miembros de la familia Orai (Orai1, Orai2 y Orai3) [218]. Las características de la corriente capacitativa mediada por estos canales son ajustadas en función de los requerimientos de los diferentes tipos celulares y de los procesos activados. Gran parte de esta variabilidad se logra a través de la expresión de isoformas de las proteínas implicadas: hasta la fecha se han descrito variantes de las proteínas STIM1, STIM2 y Orai1, que son generadas gracias a procesos de splicing alternativo, en el caso de la familia STIM, o a través de un inicio alternativo de la traducción, en el caso de Orai1. La corriente de Ca^{2+} desarrollada por los canales Orai interviene en la señalización de un amplio abanico de eventos celulares, dentro de las cuales podemos destacar la agregación y secreción plaquetaria, o los procesos de migración, contracción, proliferación y diferenciación celular. La corriente I_{CRAC} mediada por los canales Orai se caracteriza por su perfil oscilatorio y una gran selectividad para el Ca^{2+} , siendo también los mecanismos de inhibición de la misma una de sus señas de identidad. Dentro de estos mecanismos es posible diferenciar entre la inhibición rápida (FCDI), que actúa pocos milisegundos después de la apertura del canal, y los procesos de inhibición lenta (SCDI), descritos décimas de segundo después de la activación de la corriente. Aunque no existe un consenso claro sobre el mecanismo responsable de la FCDI, algunos dominios de Orai1, o proteínas como CaM, STIM1 y más

recientemente AC8, han sido propuestos como los elementos responsables de este mecanismo de inhibición [169], [171]. Posteriormente dos sistemas inhibitorios de la corriente I_{CRAC} serían mediados tanto por SARAF como por calmodulina, ambos desarrollados de forma independiente [177], [178]. Además de los mecanismos involucrados en los sistemas inhibitorios, la maquinaria celular responsable de la ECC requiere de algunas proteínas auxiliares, tales como CRACR2A, STIMATE o EFHB. CRACR2A es una proteína citoplasmática que interacciona tanto con STIM1 como con Orai1, siendo capaz de promover o inhibir el complejo molecular responsable de la ECC en función de la $[Ca^{2+}]$ citosólica [186]. STIMATE es una proteína localizada en la membrana del retículo, donde interacciona con STIM1 promoviendo su activación y cambio conformacional, así como su translocación a las zonas de aproximación entre membrana y retículo [187]. Por último, EFHB es una proteína citoplasmática capaz de asociarse a STIM1 tras el vaciamiento de los depósitos intracelulares, interacción que elimina el bloqueo impuesto por SARAF y promueve la activación de la ECC en función de la $[Ca^{2+}]$ citosólica [181].

Durante el desarrollo de la presente tesis doctoral hemos estudiado la función de la proteína filamina A dentro del mecanismo de ECC. Si bien este objetivo no fue desarrollado en células de cáncer, el objetivo de este trabajo es fundamentalmente mecanístico, y por tanto, los resultados que se desprenden del mismo están siendo la base de las actuales líneas experimentales desarrolladas en células de cáncer de mama. Con el objetivo de describir nuevas proteínas implicadas en la regulación de la actividad de STIM1 y el mecanismo de ECC en plaquetas, se realizó un ensayo de coinmunoprecipitación tras el tratamiento con TG. Los resultados de la espectrometría de masas, aplicada de forma consecutiva a la inmunoprecipitación, permitieron identificar la asociación de STIM1 y la filamina A tras la activación de la ECC, asociación que se mostró dependiente del aumento en la $[Ca^{2+}]$ citosólica. La filamina A es una proteína asociada al citoesqueleto, formada por 2647 aminoácidos y con una masa molecular de 280 kDa. En estado nativo, la filamina A presenta una estructura cuaternaria en forma de V, formada por la asociación de dos unidades a través del extremo carboxilo. En el extremo amino de cada unidad destaca una secuencia de unión a actina, formada a su vez por dos regiones homólogas a calponina. Seguidamente, se localiza una región compuesta por 24 dominios, de 96 aminoácidos cada uno, que semejan la estructura de las inmunoglobulinas. Dentro de esta región

encontraremos dos secuencias en forma de bisagra, las cuales albergan sitios de corte para calpaína y permiten dividir la región en dos segmentos, siendo el primer segmento formado por los 15 primeros dominios y el segundo por los últimos 9. Mientras que dentro del primer segmento se han identificado escasos sitios de interacción, la filamina A establece interacciones con multitud agentes a través del segundo segmento [379]. Esta variedad de interacciones permite a esta proteína desarrollar una función organizadora del citoesqueleto, estableciendo uniones cruzadas y paralelas de los filamentos de actina. Además, también se ha descrito como la filamina A interviene en la organización de los complejos macromoleculares responsables de los procesos de señalización, función que es desarrollada en gran parte gracias a su capacidad para asociar estos complejos al citoesqueleto de actina [380]. Recientemente, se ha descrito la relación entre las mutaciones de la filamina A y el desarrollo de varias enfermedades raras, las cuales se agrupan bajo el término de filaminopatías. Estas enfermedades se caracterizan por la disfunción neuronal, displasia esquelética, malformaciones cardiovasculares, malrotación y obstrucción intestinal y la alteración de la función plaquetaria [381]. La fosforilación de la filamina A por la PKA en el residuo S2152 ha sido señalada como un evento capaz de promover la actividad biológica de esta proteína, efecto que es mediado al inducir un cambio conformacional en la misma y eliminar su bloqueo autoinhibitorio [382]. Nuestros resultados indican que el aumento de la $[Ca^{2+}]$ citosólica respalda la asociación entre STIM1 y la filamina A al promover la fosforilación de la segunda por la PKA.

Con el uso de los compuestos KT-5720 y brefeldina A, agentes capaces de inhibir y promover la fosforilación de la filamina A, respectivamente, observamos cómo esta modificación y la consiguiente asociación de filamina A con STIM1 modulan de forma negativa la ECC. Este efecto se confirmó gracias a la atenuación de la expresión de la filamina A utilizando tecnología de ARN interferente. En las 24 horas posteriores a la transfección de las plaquetas, la expresión de la filamina A se inhibió de forma significativa, modificación que se asoció a un aumento en la entrada de Ca^{2+} inducida por TG.

Tras la obtención de este resultado, analizamos la función de la filamina A en la ECC utilizando células de melanoma M2, carentes de la expresión de esta proteína, y su clon A7, en el que la expresión de la filamina A se recuperó mediante la transfección estable de un

plásmido de sobreexpresión. Tras el tratamiento con TG, se observó una mayor ECC en las células M2, confirmando el papel de la filamina A como regulador negativo de la ECC. Sin embargo, las células A7 también mostraron una disminución en la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares, efecto que se justifica al demostrar la menor capacidad de las células A7 para recaptar Ca^{2+} tras la estimulación con endotelina. Estos resultados sugieren que la filamina A regula de forma negativa también la actividad de SERCA, efecto que consideramos específico de las líneas de melanoma, y que sería difícilmente detectable en plaquetas debido a la escasa liberación de Ca^{2+} observada en las mismas.

La utilización de estas líneas de melanoma nos ha permitido confirmar también la importancia de la fosforilación de la filamina A para la regulación de la ECC. La transfección de las células M2 con un plásmido control, el plásmido de sobreexpresión de la filamina A o un mutante fosfonulo de la misma (S2152A), nos permitió observar como la ECC se veía únicamente inhibida al expresar la proteína fosforilable. Resultado que refuerza la relevancia de esta fosforilación en la actividad biológica de la filamina y su papel en la regulación de la ECC.

Una vez corroborada la asociación entre filamina A y STIM1, y el papel de la primera como regulador de la ECC, se profundizó en la localización de los dominios de interacción entre ambas proteínas. Dentro de la secuencia de STIM1, el dominio rico en lisina, localizado en el extremo C terminal, ha sido descrito como el segmento encargado de mediar la interacción con los canales TRPC1 y con los fosfolípidos de membrana [125]. Para determinar si el extremo carboxilo de STIM1 está implicado en la interacción con la filamina A, las células M2 se transfectaron con el plásmido de sobreexpresión de la filamina A y con el plásmido de sobreexpresión de STIM1, o de forma alternativa, con una versión de esta proteína carente del extremo carboxilo. Los resultados de los experimentos de coimmunoprecipitación señalan que solo el STIM1 completo es capaz de interaccionar con la filamina A, proponiendo el extremo C terminal de STIM1 como el segmento encargado de mediar la interacción. De forma paralela, se identificó el dominio de la filamina que es utilizado para interaccionar con STIM1. El extremo C terminal de la filamina A ha sido descrito como el dominio responsable de mediar la interacción de esta proteína con multitud de moléculas, muchas de ellas inmersas en los mecanismos de comunicación. Dentro del inmenso tamaño

del extremo C terminal de la filamina A, el dominio de repetición 24 es un área de vital importancia, ya que mediará la dimerización de la molécula y albergará multitud de sitios de interacción para otras proteínas reguladoras [383]. Para investigar el papel del dominio de repetición 24 de la filamina A en la interacción con STIM1, introdujimos en plaquetas un anticuerpo capaz de unirse al mismo y bloquear su actividad. Posteriormente, analizamos la interacción filamina A – STIM1, observándose como la transfección del citado anticuerpo inhibía de forma notable la interacción entre ambas proteínas. En conjunto, los ensayos de co-inmunoprecipitación indican que la interacción entre STIM1 y la filamina A requiere de los extremos carboxilos de ambas proteínas y permite a la filamina A modular de forma negativa la ECC. Esta hipótesis fue respaldada al confirmar el aumento de la capacidad de agregación en aquellas plaquetas transfectadas con el anticuerpo dirigido hacia el extremo carboxilo de la filamina A.

Por último, nos propusimos profundizar en el mecanismo de regulación de la ECC desarrollado por la filamina A. Para ello, analizamos la posibilidad de que esta proteína sea responsable de mediar la asociación de STIM1 al citoesqueleto. Existen multitud de indicios sobre el papel del citoesqueleto en la ECC, pero no así un consenso sobre su influencia en este proceso. En plaquetas, nuestro grupo ha descrito como el citoesqueleto desempeña tanto funciones inhibitorias, impidiendo la activación constitutiva de la ECC, como promotoras, al apoyar la activación de este mecanismo por los depósitos ácidos [384], [385]. Paralelamente, otros autores han descrito como la localización de STIM1 en las células HEK-293 es determinada por la actividad del citoesqueleto, apoyando con esta función la activación de la ECC [386]. En nuestros experimentos, la inhibición de la expresión de la filamina A aumentó la localización de STIM1 en la fracción citoesquelética, reduciendo su presencia en la fracción citosólica y de membrana. Para desvelar si esta alteración modifica algún evento en la activación de la ECC, analizamos la interacción STIM1-Orai1 bajo las mismas condiciones de inhibición, observándose un aumento en la asociación de estas proteínas en las plaquetas donde se silenció la expresión de la filamina A. Este resultado justifica el aumento de la ECC descrito en ausencia de la filamina A tanto en plaquetas como en células de melanoma.

En conjunto, estos resultados ponen de manifiesto el papel de la filamina A en la regulación negativa de la ECC y la función plaquetaria, efectos que son mediados gracias al control por parte de la filamina A de la asociación entre STIM1 y el citoesqueleto, y la posterior interacción del primero con Orai1. Además, nuestros resultados ofrecen una valiosa perspectiva para continuar con el tratamiento de las enfermedades asociadas a mutaciones de la filamina A, y más concretamente, en su afección a la función plaquetaria. Queda aún sin concretar, si la filamina A interfiere en la capacidad de STIM1 para activar los canales TRPC1 y el desarrollo de las corrientes I_{SOC} , influencia más que probable debido a que el dominio rico en lisina de STIM1, región responsable de la interacción con TRPC1, se encuentra dentro de la región de interacción con la filamina A. Asimismo, la funcionalidad de la filamina A en las células de cáncer está aún por determinar. Se ha observado la sobreexpresión de esta proteína en multitud de neoplasias, incluido en carcinomas hepáticos, melanomas y cánceres de mama, colon y próstata. Los primeros estudios que abordaron la funcionalidad de la filamina A en la fisiopatología del cáncer describieron la capacidad de esta proteína para apoyar la progresión de las células malignas, aunque, posteriormente se ha demostrado que la influencia de la filamina A sobre el desarrollo del cáncer es dependiente de su localización celular y los patrones de asociación que establece esta proteína en cada subtipo de cáncer [387]. En cáncer de mama, se ha desquitado que la filamina A es capaz de promover la quimiorresistencia y los procesos migratorios de las células MDA-MB-231 [388], [389]. Además, el estudio de las muestras extraídas del tejido tumoral mamario ha permitido corroborar la sobreexpresión de esta proteína y su correlación con la progresión del tumor, sugiriendo la capacidad de la filamina A para controlar la expresión del gen *BRCA1* [390]. La implicación de la ECC y la filamina A en la fisiopatología del cáncer de mama respalda el estudio de estos factores como posibles dianas terapéuticas contra esta neoplasia; además, tras los avances desarrollados por la primera publicación de esta tesis doctoral, se hace más que necesario investigar si la filamina A conserva la capacidad de modular la ECC en las células de cáncer de mama.

Dentro de la maquinaria celular implicada en la ECC, Zhang y colaboradores han descrito el papel de la AC8 en los sistemas de inhibición de la corriente mediada por Orai1. Inicialmente, la interacción entre AC8 y Orai1 había sido descrita como parte del mecanismo de activación de la ciclasa, el cual depende de la entrada de Ca^{2+} a través de Orai1. Ambas

proteínas interaccionan de forma directa a través del extremo N terminal involucrando, en el caso de Orai1, el segmento comprendido entre los residuos 16 y 34. Sin embargo, el grupo anteriormente mencionado propone un mecanismo de feedback negativo sobre la actividad de Orai1, que es mediado tras la producción de AMP_c por la AC8 y la consecutiva activación de la PKA en el microdominio del poro. Este evento permite a la cinasa fosforilar a Orai1 en el residuo S34 e inhibir la corriente de Ca²⁺. Debido a que en la isoforma corta de Orai1 (Orai1 β) están ausentes tanto el segmento de interacción con la AC8 como el residuo susceptible de fosforilación, este circuito de retroalimentación solo interesa a la isoforma larga de Orai1, Orai1 α . Las corrientes de Ca²⁺ mediadas por Orai1, tanto capacitativas como las independientes de los depósitos intracelulares, han sido involucradas en la señalización de los procesos de migración, proliferación y evasión de la muerte celular en las células de cáncer de mama triple negativo. Nuestro grupo de investigación ha contribuido de forma notable en la descripción de la funcionalidad de Orai1 en las células de cáncer de mama, cuya expresión en la membrana plasmática es modulada por la actividad del canal TRPC6.

Por todo ello y analizando nuestros resultados preliminares, los cuales indicaban la sobreexpresión de la AC8 en las líneas de cáncer de mama, en el siguiente estudio de esta tesis doctoral nos propusimos analizar el papel de la AC8 en el mecanismo de ECC, y su implicación en los eventos característicos de las células de cáncer de mama. Los resultados iniciales describieron la sobreexpresión de Orai1 en las células MCF7 y MDA-MB-231, resultados que confirman los datos publicados por McAndrew y colaboradores en 2011 [329]. Tras la incubación de los extractos proteicos con una enzima con capacidad amidasa, pudimos confirmar que ambas isoformas de Orai1 (α y β) están sobreexpresadas en ambas líneas celulares. Además, también se corroboró la interacción constitutiva de AC8 con Orai1 α , siendo la primera vez que se observa esta interacción a través de Western blotting en proteínas nativas. Posteriormente, analizamos los mecanismos regulatorios de la interacción entre AC8 y Orai1 a través de un ensayo de coinmunoprecipitación. Nuestros resultados indican que, en presencia de Ca²⁺ extracelular, la interacción entre estas proteínas no está alterada. Sin embargo, esta unión demostró ser inhibida por el vaciamiento de los depósitos en ausencia de Ca²⁺ extracelular, influencia negativa que, en estado fisiológico, es anulada por el efecto de la entrada de Ca²⁺ a través de Orai1. Poco después de la identificación de Orai1, Kawasaki *et al.* describieron un mecanismo inhibitorio

de la corriente I_{CRAC} basado en la fosforilación por PKC de los residuos S27 y S30 de Orai1 α . Debido a que estos residuos, así como la S34 diana de la PKA, se localizan en el sitio de unión a AC8 de Orai1 α , nos propusimos analizar la influencia de la fosforilación de Orai1 α sobre la interacción de ambas proteínas. Tras la transfección de las células de cáncer de mama MDA-MB-231 con el plásmido de sobreexpresión de Orai1 α , un mutante no fosforilable del mismo, o el mutante fosfomimético, no se observó ninguna diferencia en la capacidad de Orai1 para asociarse a la AC8, siendo esta invariable tanto en control como tras el tratamiento con TG. Este resultado excluye el estado de fosforilación de Orai1 como un evento capaz de influenciar su asociación con la AC8.

Debido a que la ECC, en las células MDA-MB-231, depende de la actividad de Orai1, analizamos la funcionalidad de AC8 en este mecanismo de señalización. La atenuación de la expresión de AC8 resultó en la inhibición de la entrada de Ca^{2+} en las células de cáncer de mama triple negativo, resultado que fue confirmado tanto mediante el procedimiento clásico usando TG, como con la co-expresión de Orai1 con el péptido OASF de STIM1, que activa el canal Orai1 de forma constitutiva. Por el contrario, la sobreexpresión de AC8 aumentó la entrada de Ca^{2+} tanto en las células que sobreexpresaban OASF-Orai1 como en aquellas tratadas con TG. En su conjunto, nuestros resultados indican que AC8 facilita la ECC en las células de cáncer de mama triple negativo, rol que se opone a los datos descritos por Zhang y colaboradores, los cuales describen a esta ciclasa como la proteína clave de un mecanismo inhibitorio de Orai1.

Debido a esta discrepancia, nos propusimos analizar el estado de fosforilación de Orai1 en residuos de serina en las células MDA-MB-231. Tras realizar varios ensayos de inmunoprecipitación, comprobamos que los canales Orai1 asociados a AC8 no se fosforilaron en residuos de serina. Paralelamente, observamos que tanto la inhibición como el aumento de la expresión de la AC8 tienen un efecto sobre la fosforilación de Orai1 en estos residuos, favoreciendo o bloqueando esta modificación, respectivamente. En conjunto, estos resultados proponen la interacción de la AC8 con Orai1 como un evento capaz de interferir en la fosforilación de los residuos de serina de Orai1 α y, consecuentemente, en los mecanismos de inhibición de la corriente asociados a estas modificaciones.

Esta dualidad en el papel de la AC8 puede ser justificada debido su la relación estequiométrica con los canales Orai1 α . En células con una expresión normal de AC8, la expresión de Orai1 α predomina en comparación con la de la ciclasa, relación que favorece que multitud de canales Orai1 α no interaccionen con AC8, permitiendo que el extremo amino terminal sea accesible para las cinasas que mediaran los mecanismos inhibitorios. En las células de cáncer de mama MDA-MB-231, aunque tanto AC8 como Orai1 α se encuentran sobrepresados, nuestros resultados muestran que la estequiometría se torna en favor de AC8. Este cambio determina la reducción del pool de Orai1 α libre de AC8 y el bloqueo de los mecanismos de inactivación dependientes de la fosforilación del extremo amino de Orai1 α .

Las señales de Ca²⁺ generadas por Orai1 han sido descritas como un evento de vital importancia en los procesos celulares distintivos del cáncer de mama, siendo la migración celular un claro ejemplo. Para continuar con el estudio de la relación entre AC8 y Orai1, nos propusimos analizar su implicación en la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231. Nuestros resultados demuestran que el silenciamiento de la expresión de la AC8 inhibe la capacidad migratoria de estas células tras un periodo de cuarenta y ocho horas. Esta inhibición se mantiene incluso tras la estimulación con carbacol, agonista de los receptores colinérgicos con capacidad para promover la migración en esta línea celular. Se ha demostrado que la proteína cinasa de adhesión focal (FAK) participa en la activación de la migración en las células tumorales, además de estar implicada en otros mecanismos tumorales como la proliferación y la evasión de la muerte celular. El mecanismo de activación de la FAK mejor caracterizado es mediado a través de su dimerización, autofosforilación del residuo Y397 y la unión del dímero a algún miembro de la familia de cinasas Src [391]. Nuestros resultados demuestran que el silenciamiento de la AC8 inhibe la fosforilación de la FAK en el residuo Y397, poniendo de manifiesto que la activación de la FAK y la migración de las células MDA-MB-231 depende de la expresión de la AC8, ya que previamente nuestro equipo de investigación demostró que tanto la migración celular como la activación de la FAK era dependiente de la activación de los canales Orai en la línea celular promieloblástica HL-60, [393].

Por último, analizamos si la sobreexpresión de la AC8 es un evento común en las células de cáncer de mama caracterizadas como triple negativo. Para ello, analizamos la expresión de esta proteína en las células MDA-MB-231, BT20 y Hs578T; observándose una sobreexpresión de la AC8 en todos los modelos celulares de cáncer de mama triple negativo. En consecuencia, analizamos el papel de la AC8 en la capacidad proliferativa de las células MDA-MB-231 y Hs578T. Como resultado, la capacidad proliferativa de estas células se vio inhibida tras atenuar la expresión de la AC8, confirmando el papel de esta enzima en el desarrollo de los procesos tumorales de las células de cáncer de mama triple negativo.

En conjunto, en las células de cáncer de mama triple negativo AC8 se comporta como una proteína reguladora de la actividad de Orai1, la ECC y los procesos celulares dependientes de la misma. Esta función está mediada gracias a la sobreexpresión de esta ciclasa, el cambio en su relación estequiométrica con los canales Orai1 y el bloqueo de los mecanismos inhibitorios de las corrientes mediadas por Orai1 α .

En los años posteriores a la identificación de las proteínas Orai1 y STIM1 como componentes esenciales de la ECC, la comunidad científica sobrestimó la importancia de estos agentes en relación con el resto de miembros de su familia de proteínas. Actualmente, los modelos de ECC incluyen la participación de STIM2, Orai2 y Orai3 en las señales nativas de Ca²⁺, ya que estudios recientes han demostrado la capacidad de estas isoformas para articular la ECC mediante la formación de complejos homoméricos o heteroméricos entre los miembros de las dos familias. Dentro de las primeras publicaciones, son especialmente relevantes los estudios que identificaron a Orai2 y Orai3 como las proteínas predominantes en la ECC en las células de leucemia mieloide aguda y de cáncer de mama ER+, respectivamente [221], [392]. Estos estudios permitieron confirmar el remodelado de los componentes de la ECC en las células de cáncer y su implicación tanto en la tumorigénesis como en la activación de las funciones características de la célula tumoral. Además de las proteínas de las familias STIM y Orai, algunos miembros de familia de proteínas TRP, especialmente los de las subfamilias TRPC, TRPM y TRPV, han sido involucrados en la progresión de diferentes tipos de cáncer. En concreto, TRPC6 ha sido descrito como un canal relevante en la proliferación de los carcinomas gástrico, prostático, y esofágico de células

escamosas. Igualmente, el análisis de las biopsias de cáncer de mama ha confirmado la sobreexpresión de TRPC6 [393]. Aunque el papel de TRPC6 en la fisiopatología del cáncer de mama no es conocido en su totalidad, nuestro grupo ha identificado este canal como una proteína clave para la proliferación, migración e invasión de las células de cáncer de mama triple negativo y ER+. Esta influencia es mediada a través de la modulación de la ECC, siendo la actividad de TRPC6 determinante para la translocación a la membrana plasmática de los canales Orai1 y Orai3 [330]. En algunos modelos celulares, se ha implicado a TRPC6 en el mantenimiento de las $[Ca^{2+}]$ citosólica y reticular en estado basal [299]. Esta misma función también se ha atribuido a STIM2, ya que esta proteína mantiene la $[Ca^{2+}]$ de los depósitos intracelulares activando entradas de Ca^{2+} caracterizadas por su baja conductividad [195]. En la última publicación incluida en la presente tesis, nos propusimos analizar el rol de TRPC6 en el mantenimiento de la concentración basal de Ca^{2+} en diferentes tipos de células de cáncer de mama.

Nuestros resultados iniciales confirman la sobreexpresión de TRPC6 en las células de cáncer de mama ER+ y triple negativo en comparación con las células epiteliales de mama. De acuerdo con los resultados publicados por Motiani *et al.* las células de cáncer de mama ER+ muestran una clara sobreexpresión de Orai3 [221]. Por el contrario, STIM2 se expresa de forma similar en células epiteliales y en las células de cáncer de mama representativas de los diferentes subtipos. Tras analizar la expresión de membrana de TRPC6 durante el reposo, observamos una clara diferencia entre las líneas de cáncer de mama ER+ y triple negativo. Mientras que en ambos subtipos celulares se identificó la sobreexpresión de TRPC6 en comparación con las células epiteliales de mama, únicamente las células de cáncer de mama ER+ presentaron un incremento en la expresión de membrana de TRPC6 con respecto a las líneas no tumorales. Esta diferencia es revertida tras el tratamiento con TG, evento que promueve la expresión de membrana de TRPC6 en ambos subtipos. Estos resultados confirman el papel de TRPC6 en la maquinaria celular responsable de la ECC en las líneas de cáncer de mama, pero también proponen a TRPC6 como un canal involucrado en el mantenimiento de la homeostasis del Ca^{2+} basal en las células de cáncer de mama ER+.

Para confirmar el papel de TRPC6 en el mantenimiento de la $[Ca^{2+}]$ citosólica y reticular durante el reposo, las células MCF7 fueron transfectadas con el plásmido de silenciamiento de TRPC6, el dominante negativo del TRPC6 (TRPC6dn) o el correspondiente control de transfección. Tanto la inhibición del canal como la expresión del canal no funcional provocaron una disminución de la $[Ca^{2+}]$ citosólica en reposo. Además, también se observó una inhibición tanto en la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares como en la ECC. Resultados similares se obtuvieron tras la inhibición de la expresión de STIM2. Adicionalmente, tanto la inhibición de la expresión de ambas proteínas, como la combinación del siSTIM2 y el TRPC6dn resultó en un efecto sumatorio, reduciendo aún más la $[Ca^{2+}]$ basal e inhibiendo en mayor grado la liberación y entrada de Ca^{2+} tras el tratamiento con TG. En conjunto, estos resultados proponen el papel de STIM2 y TRPC6 en el mantenimiento de la $[Ca^{2+}]$ citosólica y reticular durante el reposo. Este resultado fue confirmado con el uso de la sonda reticular de Ca^{2+} R-CEPIA1er, observándose que la señal previa al tratamiento con TG e ionomicina y la pendiente de la caída de la fluorescencia fueron inhibidas al alterar la función de STIM2 y TRPC6, evidencias que apoyan el rol de ambas proteínas en el mantenimiento de la $[Ca^{2+}]$ reticular en las células MCF7.

Con el objetivo de evaluar si la interacción entre STIM2 y TRPC6 es necesaria para el papel regulador de la homeostasis del Ca^{2+} , llevamos a cabo un ensayo de coimmunoprecipitación en las células MCF7 y MCF10A. Los resultados observados sugieren que TRPC6 y STIM2 interactúan en reposo con el objetivo de mantener la $[Ca^{2+}]$ citosólica y reticular. En las células MCF7, esta asociación es inhibida por la entrada de Ca^{2+} tras el tratamiento con TG, proponiendo al eje STIM2-TRPC6 como un modulador de la homeostasis del Ca^{2+} durante el reposo. Este mecanismo se presenta de forma singular en las células de cáncer de mama ER+, y no sería extensible a las células epiteliales de mama, donde esta asociación se ve inalterada por los aumentos en la $[Ca^{2+}]$ citosólica.

Además de constituir el mayor almacén intracelular de Ca^{2+} , el RE desarrolla una función esencial para la célula al asegurar el correcto plegado de las proteínas que transitan la vía secretora. Esta función permite únicamente la salida del retículo de proteínas plegadas correctamente, almacenando o degradando aquellas que no satisfacen los controles de calidad [394]. Este proceso es especialmente sensible a las alteraciones del microambiente

reticular, siendo la $[Ca^{2+}]$ reticular una de las variables con mayor influencia sobre el mismo. Por consiguiente, tras la alteración de la homeostasis del Ca^{2+} se desencadena un estado de estrés reticular donde se produce un gran acúmulo de proteínas mal plegadas en el interior del retículo [395]. En respuesta a esta situación, el retículo inicia un mecanismo adaptativo conocido como UPR (del inglés “*Unfolded Protein Response*”), el cual inhibirá la síntesis de proteínas, a excepción de las chaperonas implicadas en los procesos de plegado de proteínas, promoverá la degradación de las proteínas mal plegadas del interior reticular, y aumentará la capacidad de este orgánulo para procesar las proteínas sintetizadas [394]. Si la UPR no consiguiera paliar esta situación, la alteración de la homeostasis reticular y el acumulo de proteínas mal plegadas inician una cascada proapoptótica. El desarrollo de las señales apoptóticas continuará con la consecución de hitos como la pérdida de la integridad de la membrana reticular y la sobrecarga de Ca^{2+} citosólica, siendo las etapas finales del mecanismo de apoptosis dirigido por la actividad de las caspasas [396]. El estrés reticular ha sido relacionado con un amplio abanico de patologías, dentro de las cuales se incluyen el cáncer [397], la diabetes [398], diversas patologías cardíacas [399] y enfermedades neurodegenerativas [400]. Para continuar con el análisis de la función de TRPC6 en la homeostasis de las células de cáncer de mama MCF7, evaluamos si el bloqueo de la actividad de esta proteína, y la demostrada disminución de la $[Ca^{2+}]$ basal, induce el aumento del estrés reticular. Tanto la inhibición de la expresión de TRPC6, como la sobreexpresión de su dominante negativo, resultaron en el aumento de la fosforilación de eIF2 α en el residuo de S51. Dicha fosforilación regula la actividad de este factor de iniciación de la traducción e inhibe la síntesis proteica como parte de las adaptaciones al estrés reticular [401]. Este resultado sugiere el papel de TRPC6 en la maquinaria celular encargada de salvaguardar el microambiente reticular, protegiendo las células de cáncer de mama ER+ contra los agentes capaces de inducir estrés reticular. El análisis de la activación de las señales proapoptótica nos permitió confirmar la función de TRPC6 en la evasión del estrés reticular. Tras la inhibición de la expresión de TRPC6 o la sobreexpresión de TRPC6dn se observó un aumento significativo de la actividad de la caspasa 3, sugiriendo el papel de este canal en la evasión del estrés reticular y las consecuencias nocivas del mismo. Por último, quisimos validar esta hipótesis analizando la viabilidad de las células MCF7 tras inducir de nuevo el bloqueo de la función de TRPC6. Tras incubar las células con los colorantes calceína-AM y yoduro de propidio, pudimos observar como el bloqueo de la función de

TRPC6 reduce la viabilidad de las células MCF7, resultado que sugiere a TRPC6 como una posible diana en el desarrollo de nuevas estrategias anti-tumorales contra el cáncer de mama ER+.

En conjunto, todos los resultados obtenidos en el transcurso de la presente tesis doctoral refuerzan el papel de las proteínas responsables de la ECC en el desarrollo de los procesos característicos del cáncer de mama. Tras analizar estos resultados, es fácil concluir que las células de cáncer de mama reprograman los sistemas de comunicación, en general, y el mecanismo de ECC, en particular, para facilitar la consecución de los fenotipos tumorales que las caracterizan. Este proceso de remodelado se logra a través de una gran variedad de mecanismos, siendo de especial relevancia los cambios en la expresión de las proteínas involucradas en la ECC o la modificación de la funcionalidad de estas. En los próximos años, los estudios focalizados en el mecanismo de la ECC continuarán expandiendo nuestro conocimiento sobre los agentes que se encuentran inmersos en el mismo y sobre los sistemas regulatorios que los controlan. Estos avances serán de gran utilidad para el desarrollo y la mejora de nuevas terapias, especialmente para aquellas patologías en las que la ECC juega un papel relevante, dentro de las cuales destaca el cáncer de mama.

Conclusiones

7 Conclusiones:

- 1.- La filamina A modula de forma negativa la ECC a través de su interacción con STIM1 tras el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} .
- 2.- El mecanismo inhibitorio llevado a cabo por la filamina A se basa en la asociación de STIM1 a la fracción citoesquelética y, la inhibición de su interacción con los canales Orai1.
- 3.- En células de cáncer de mama triple negativo, un cambio en la relación estequiométrica entre AC8 y Orai1 determina el bloqueo de la inactivación de Orai1 y, el aumento de la actividad del canal.
- 4.- La sobreexpresión de la AC8 incrementa la capacidad migratoria y proliferativa de las células de cáncer de mama triple negativo, potenciando la ECC en estas células.
- 5.- En reposo, el canal TRPC6 controla la concentración citosólica y reticular de Ca^{2+} en las células de cáncer de mama caracterizadas como ER+. Función que protege estas células contra los agentes que promueven el estrés reticular y la muerte celular.

7 Conclusions:

- 1.- Filamin A negatively regulates SOCE by interacting with STIM1 after intracellular store depletion.
- 2.- Filamin A inhibitory mechanism is based on the association of STIM1 with the cytoskeletal fraction and the impairment of STIM1-Orai1 interaction.
- 3.- In Triple negative breast cancer cells, a stoichiometry change between AC8 and Orai1 impairs Orai1 inhibitory mechanisms and promotes channel activity.
- 4.- By promoting SOCE, AC8 overexpression supports the migratory and proliferative capability of triple negative breast cancer cells.
- 5.- In resting ER+ breast cancer cells, TRPC6 channel controls the cytosolic and reticular Ca²⁺ content. This role is proposed to protect breast cancer cells from the agents that trigger endoplasmic reticulum stress and cell death.

Bibliografía:

8 Bibliografía:

- [1] D. E. Clapham, "Calcium signaling," *Cell*, vol. 80, no. 2. Cell, pp. 259–268, Jan. 27, 1995, doi: 10.1016/0092-8674(95)90408-5.
- [2] H. J. Schatzmann, "ATP-dependent Ca⁺⁺-Extrusion from human red cells," *Experientia*, vol. 22, no. 6, pp. 364–365, Jun. 1966, doi: 10.1007/BF01901136.
- [3] T. Calì, M. Brini, and E. Carafoli, "Regulation of Cell Calcium and Role of Plasma Membrane Calcium ATPases," in *International Review of Cell and Molecular Biology*, vol. 332, Elsevier Inc., 2017, pp. 259–296.
- [4] G. R. Monteith, Y. Wanigasekara, and B. D. Roufogalis, "The plasma membrane calcium pump, its role and regulation: New complexities and possibilities," *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, vol. 40, no. 4. Elsevier, pp. 183–190, Nov. 01, 1998, doi: 10.1016/S1056-8719(99)00004-0.
- [5] M. Brini and E. Carafoli, "Calcium pumps in health and disease," *Physiological Reviews*, vol. 89, no. 4. Physiol Rev, pp. 1341–1378, Oct. 2009, doi: 10.1152/physrev.00032.2008.
- [6] E. E. Strehler and D. A. Zacharias, "Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps," *Physiological Reviews*, vol. 81, no. 1. American Physiological Society, pp. 21–50, 2001, doi: 10.1152/physrev.2001.81.1.21.
- [7] M. Periasamy and A. Kalyanasundaram, "SERCA pump isoforms: Their role in calcium transport and disease," *Muscle and Nerve*, vol. 35, no. 4. Muscle Nerve, pp. 430–442, Apr. 2007, doi: 10.1002/mus.20745.
- [8] C. J. Brandl, S. deLeon, D. R. Martin, and D. H. MacLennan, "Adult forms of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. Expression in developing skeletal muscle.," *J. Biol. Chem.*, vol. 262, no. 8, pp. 3768–3774, Mar. 1987, doi: 10.1016/s0021-9258(18)61421-8.
- [9] A. Verkhratsky, "Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons," *Physiological Reviews*, vol. 85, no. 1. Physiol Rev, pp. 201–279, Jan. 2005, doi: 10.1152/physrev.00004.2004.
- [10] M. R. Sepúlveda, M. Hidalgo-Sánchez, and A. M. Mata, "Localization of endoplasmic reticulum and plasma membrane Ca²⁺-ATPases in subcellular fractions and sections

- of pig cerebellum," *Eur. J. Neurosci.*, vol. 19, no. 3, pp. 542–551, Feb. 2004, doi: 10.1111/j.0953-816X.2003.03156.x.
- [11] F. WUYTACK *et al.*, "Ca²⁺-Transport ATPases and Their Regulation in Muscle and Brain," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 671, no. 1, pp. 82–91, 1992, doi: 10.1111/j.1749-6632.1992.tb43786.x.
- [12] K. Van Baelen *et al.*, "The Ca²⁺/Mn²⁺ pumps in the Golgi apparatus," in *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, Dec. 2004, vol. 1742, no. 1–3, pp. 103–112, doi: 10.1016/j.bbamcr.2004.08.018.
- [13] M. Xiang, D. Mohamalawari, and R. Rao, "A novel isoform of the secretory pathway Ca²⁺,Mn²⁺-ATPase, hSPCA2, has unusual properties and is expressed in the brain," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 12, pp. 11608–11614, Mar. 2005, doi: 10.1074/jbc.M413116200.
- [14] M. Sidoryk-Wegrzynowicz and M. Aschner, "Manganese toxicity in the central nervous system: The glutamine/glutamate- γ -aminobutyric acid cycle," *J. Intern. Med.*, vol. 273, no. 5, pp. 466–477, May 2013, doi: 10.1111/joim.12040.
- [15] L. L. Wootton, C. C. H. Argent, M. Wheatley, and F. Michelangeli, "The expression, activity and localisation of the secretory pathway Ca²⁺-ATPase (SPCA1) in different mammalian tissues," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1664, no. 2, pp. 189–197, Aug. 2004, doi: 10.1016/j.bbamem.2004.05.009.
- [16] J. Vanoevelen *et al.*, "The secretory pathway Ca²⁺/Mn²⁺-ATPase 2 is a Golgi-localized pump with high affinity for Ca²⁺ ions," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 24, pp. 22800–22808, Jun. 2005, doi: 10.1074/jbc.M501026200.
- [17] M. R. Sepúlveda, M. Berrocal, D. Marcos, F. Wuytack, and A. M. Mata, "Functional and immunocytochemical evidence for the expression and localization of the secretory pathway Ca²⁺-ATPase isoform 1 (SPCA1) in cerebellum relative to other Ca²⁺ pumps," *J. Neurochem.*, vol. 103, no. 3, pp. 1009–1018, Nov. 2007, doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04794.x.
- [18] M. Micaroni, G. Giacchetti, R. Plebani, G. G. Xiao, and L. Federici, "ATP2C1 gene mutations in Hailey-Hailey disease and possible roles of SPCA1 isoforms in membrane trafficking," *Cell Death and Disease*, vol. 7, no. 6. Nature Publishing Group, Jun. 09, 2016, doi: 10.1038/cddis.2016.147.
- [19] J. M. Baughman *et al.*, "Integrative genomics identifies MCU as an essential

- component of the mitochondrial calcium uniporter," *Nature*, vol. 476, no. 7360, pp. 341–345, Aug. 2011, doi: 10.1038/nature10234.
- [20] D. De Stefani, A. Raffaello, E. Teardo, I. Szabó, and R. Rizzuto, "A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter," *Nature*, vol. 476, no. 7360, pp. 336–340, Aug. 2011, doi: 10.1038/nature10230.
- [21] Y. Kirichok, G. Krapivinsky, and D. E. Clapham, "The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel," *Nature*, vol. 427, no. 6972, pp. 360–364, Jan. 2004, doi: 10.1038/nature02246.
- [22] G. Csordás *et al.*, "MICU1 controls both the threshold and cooperative activation of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter," *Cell Metab.*, vol. 17, no. 6, pp. 976–987, Jun. 2013, doi: 10.1016/j.cmet.2013.04.020.
- [23] N. E. Hoffman *et al.*, "MICU1 motifs define mitochondrial calcium uniporter binding and activity," *Cell Rep.*, vol. 5, no. 6, pp. 1576–1588, Dec. 2013, doi: 10.1016/j.celrep.2013.11.026.
- [24] K. Mallilankaraman *et al.*, "MICU1 is an essential gatekeeper for MCU-mediated mitochondrial Ca²⁺ uptake that regulates cell survival," *Cell*, vol. 151, no. 3, pp. 630–644, Oct. 2012, doi: 10.1016/j.cell.2012.10.011.
- [25] Y. Sancak *et al.*, "EMRE is an essential component of the mitochondrial calcium uniporter complex," *Science (80-.)*, vol. 342, no. 6164, pp. 1379–1382, 2013, doi: 10.1126/science.1242993.
- [26] R. G. Hansford, "Physiological role of mitochondrial Ca²⁺ transport," *J. Bioenerg. Biomembr.*, vol. 26, no. 5, pp. 495–508, 1994, doi: 10.1007/BF00762734.
- [27] J. G. McCormack and R. M. Denton, "The effects of calcium ions and adenine nucleotides on the activity of pig heart 2-oxoglutarate dehydrogenase complex," *Biochem. J.*, vol. 180, no. 3, pp. 533–544, 1979, doi: 10.1042/bj1800533.
- [28] J. Liao, H. Li, W. Zeng, D. B. Sauer, R. Belmares, and Y. Jiang, "Structural insight into the ion-exchange mechanism of the sodium/calcium exchanger," *Science (80-.)*, vol. 335, no. 6069, pp. 686–690, Feb. 2012, doi: 10.1126/science.1215759.
- [29] M. Hilge, J. Aelen, and G. W. Vuister, "Ca²⁺ Regulation in the Na⁺/Ca²⁺ Exchanger Involves Two Markedly Different Ca²⁺ Sensors," *Mol. Cell*, vol. 22, no. 1, pp. 15–25, Apr. 2006, doi: 10.1016/j.molcel.2006.03.008.
- [30] M. Giladi, I. Tal, and D. Khananshvil, "Structural features of ion transport and

- allosteric regulation in Sodium-Calcium Exchanger (NCX) proteins,” *Frontiers in Physiology*, vol. 7, no. FEB. Frontiers Media S.A., Feb. 09, 2016, doi: 10.3389/fphys.2016.00030.
- [31] D. Khananshveli, “Long-Range Allosteric Regulation of Pumps and Transporters: What Can We Learn from Mammalian NCX Antiporters?,” in *Regulation of Ca²⁺-ATPases, V-ATPases and F-ATPases*, Springer International Publishing, 2016, pp. 93–115.
- [32] H. AG and S. SO, “A key role for reverse Na⁺/Ca²⁺ exchange influenced by the actin cytoskeleton in store-operated Ca²⁺ entry in human platelets: evidence against the de novo conformational coupling hypothesis,” *Cell Calcium*, vol. 42, no. 6, pp. 606–617, 2007, doi: 10.1016/J.CECA.2007.02.004.
- [33] D. M. Bers, “Cardiac excitation-contraction coupling,” *Nature*, vol. 415, no. 6868. Nature, pp. 198–205, Jan. 10, 2002, doi: 10.1038/415198a.
- [34] S. Kirischuk, V. Parpura, and A. Verkhratsky, “Sodium dynamics: Another key to astroglial excitability?,” *Trends in Neurosciences*, vol. 35, no. 8. Trends Neurosci, pp. 497–506, Aug. 2012, doi: 10.1016/j.tins.2012.04.003.
- [35] D. De Stefani, R. Rizzuto, and T. Pozzan, “Enjoy the Trip: Calcium in Mitochondria Back and Forth,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 85, pp. 161–192, Jun. 2016, doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-034216.
- [36] M. B. Robinson and J. G. Jackson, “Astroglial glutamate transporters coordinate excitatory signaling and brain energetics,” *Neurochemistry International*, vol. 98. Elsevier Ltd, pp. 56–71, Sep. 01, 2016, doi: 10.1016/j.neuint.2016.03.014.
- [37] K. D. Philipson and D. A. Nicoll, “Sodium-calcium exchange: A molecular perspective,” *Annual Review of Physiology*, vol. 62. Annu Rev Physiol, pp. 111–133, 2000, doi: 10.1146/annurev.physiol.62.1.111.
- [38] J. Lytton, “Na⁺/Ca²⁺ exchangers: Three mammalian gene families control Ca²⁺ transport,” *Biochemical Journal*, vol. 406, no. 3. Biochem J, pp. 365–382, Sep. 15, 2007, doi: 10.1042/BJ20070619.
- [39] P. P. M. Schnetkamp, “The SLC24 gene family of Na⁺/Ca²⁺-K⁺ exchangers: From sight and smell to memory consolidation and skin pigmentation,” *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 34, no. 2–3. Mol Aspects Med, pp. 455–464, Apr. 2013, doi: 10.1016/j.mam.2012.07.008.
- [40] J. Lytton, X. F. Li, H. Dong, and A. Kraev, “K⁺-dependent Na⁺/Ca²⁺ exchangers in the

- brain," in *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2002, vol. 976, pp. 382–393, doi: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb04765.x.
- [41] C. F. M. Prinsen, R. T. Szerencsei, and P. P. M. Schnetkamp, "Molecular cloning and functional expression of the potassium-dependent sodium-calcium exchanger from human and chicken retinal cone photoreceptors," *J. Neurosci.*, vol. 20, no. 4, pp. 1424–1434, Feb. 2000, doi: 10.1523/jneurosci.20-04-01424.2000.
- [42] X. F. Li *et al.*, "Importance of K⁺-dependent Na⁺/Ca²⁺- exchanger 2, NCKX2, in motor learning and memory," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 10, pp. 6273–6282, Mar. 2006, doi: 10.1074/jbc.M512137200.
- [43] A. H. Jalloul, T. P. Rogasevskaia, R. T. Szerencsei, and P. P. M. Schnetkamp, "A functional study of mutations in k⁺-dependent na⁺-ca²⁺ exchangers associated with amelogenesis imperfecta and non-syndromic oculocutaneous albinism," *J. Biol. Chem.*, vol. 291, no. 25, pp. 13113–13123, Jun. 2016, doi: 10.1074/jbc.M116.728824.
- [44] P. Sulem *et al.*, "Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans," *Nat. Genet.*, vol. 39, no. 12, pp. 1443–1452, Dec. 2007, doi: 10.1038/ng.2007.13.
- [45] A. B. Stephan, S. Tobochnik, M. Dibattista, C. M. Wall, J. Reiser, and H. Zhao, "The Na⁺/Ca²⁺ exchanger NCKX4 governs termination and adaptation of the mammalian olfactory response," *Nat. Neurosci.*, vol. 15, no. 1, pp. 131–137, Jan. 2012, doi: 10.1038/nn.2943.
- [46] R. L. Lamason *et al.*, "Genetics: SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans," *Science (80-.)*, vol. 310, no. 5755, pp. 1782–1786, Dec. 2005, doi: 10.1126/science.1116238.
- [47] D. W. Hilgemann, A. Yaradanakul, Y. Wang, and D. Fuster, "Molecular control of cardiac sodium homeostasis in health and disease," in *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, May 2006, vol. 17, no. SUPPL. 1, doi: 10.1111/j.1540-8167.2006.00383.x.
- [48] H. Streb, R. F. Irvine, M. J. Berridge, and I. Schulz, "Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate," *Nature*, vol. 306, no. 5938, pp. 67–69, 1983, doi: 10.1038/306067a0.
- [49] T. Furuichi, S. Yoshikawa, A. Miyawaki, K. Wada, N. Maeda, and K. Mikoshiba, "Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-

- binding protein P400," *Nature*, vol. 342, no. 6245, pp. 32–38, 1989, doi: 10.1038/342032a0.
- [50] O. A. Fedorenko, E. Popugaeva, M. Enomoto, P. B. Stathopoulos, M. Ikura, and I. Bezprozvanny, "Intracellular calcium channels: Inositol-1,4,5-trisphosphate receptors," *European Journal of Pharmacology*, vol. 739, no. C. Elsevier B.V., pp. 39–48, Sep. 15, 2014, doi: 10.1016/j.ejphar.2013.10.074.
- [51] J. K. Foskett, C. White, K. H. Cheung, and D. O. D. Mak, "Inositol trisphosphate receptor Ca²⁺ release channels," *Physiological Reviews*, vol. 87, no. 2. Physiol Rev, pp. 593–658, Apr. 2007, doi: 10.1152/physrev.00035.2006.
- [52] D. L. Prole and C. W. Taylor, "Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and their protein partners as signalling hubs," *Journal of Physiology*, vol. 594, no. 11. Blackwell Publishing Ltd, pp. 2849–2866, Jun. 01, 2016, doi: 10.1113/JP271139.
- [53] H. Ivanova, T. Vervliet, L. Missiaen, J. B. Parys, H. De Smedt, and G. Bultynck, "Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-isoform diversity in cell death and survival," *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, vol. 1843, no. 10. Elsevier, pp. 2164–2183, Oct. 01, 2014, doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.03.007.
- [54] S. Patel, S. K. Joseph, and A. P. Thomas, "Molecular properties of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors," *Cell Calcium*, vol. 25, no. 3, pp. 247–264, 1999, doi: 10.1054/ceca.1999.0021.
- [55] C. W. Taylor, A. A. Genazzani, and S. A. Morris, "Expression of inositol trisphosphate receptors," *Cell Calcium*, vol. 26, no. 6. Elsevier Ltd, pp. 237–251, 1999, doi: 10.1054/ceca.1999.0090.
- [56] T. Vervloessem, D. I. Yule, G. Bultynck, and J. B. Parys, "The type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, emerging functions for an intriguing Ca²⁺-release channel," *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, vol. 1853, no. 9. Elsevier, pp. 1992–2005, Nov. 01, 2014, doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.12.006.
- [57] T. Nakagawa, H. Okano, T. Furuichi, J. Aruga, and K. Mikoshiba, "The subtypes of the mouse inositol 1,4,5-trisphosphate receptor are expressed in a tissue-specific and developmentally specific manner," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 88, no. 14, pp. 6244–6248, Jul. 1991, doi: 10.1073/pnas.88.14.6244.
- [58] R. Chandrasekhar, K. J. Alzayady, L. E. Wagner, and D. I. Yule, "Unique regulatory properties of heterotetrameric inositol 1,4, 5-trisphosphate receptors revealed by

- studying concatenated receptor constructs," *J. Biol. Chem.*, vol. 291, no. 10, pp. 4846–4860, Mar. 2016, doi: 10.1074/jbc.M115.705301.
- [59] K. Uchida, H. Miyauchi, T. Furuichi, T. Michikawa, and K. Mikoshiba, "Critical regions for activation gating of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 19, pp. 16551–16560, May 2003, doi: 10.1074/jbc.M300646200.
- [60] M. Ananthanarayanan *et al.*, "Post-translational regulation of the type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by miRNA-506," *J. Biol. Chem.*, vol. 290, no. 1, pp. 184–196, Jan. 2015, doi: 10.1074/jbc.M114.587030.
- [61] L. Gorza, S. Schiaffino, and P. Volpe, "Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in heart: Evidence for its concentration in Purkinje myocytes of the conduction system," *J. Cell Biol.*, vol. 121, no. 2, pp. 345–353, 1993, doi: 10.1083/jcb.121.2.345.
- [62] A. Verma, D. J. Hirsch, and S. H. Snyder, "Calcium pools mobilized by calcium or inositol 1,4,5-trisphosphate are differentially localized in rat heart and brain," *Mol. Biol. Cell*, vol. 3, no. 6, pp. 621–631, 1992, doi: 10.1091/mbc.3.6.621.
- [63] G. Santulli, R. Nakashima, Q. Yuan, and A. R. Marks, "Intracellular calcium release channels: an update," *Journal of Physiology*, vol. 595, no. 10. Blackwell Publishing Ltd, pp. 3041–3051, May 15, 2017, doi: 10.1113/JP272781.
- [64] I. B. Bezprozvanny, K. Ondrias, E. Kaftan, D. A. Stoyanovsky, and B. E. Ehrlich, "Activation of the calcium release channel (ryanodine receptor) by heparin and other polyanions is calcium dependent," *Mol. Biol. Cell*, vol. 4, no. 3, pp. 347–352, 1993, doi: 10.1091/mbc.4.3.347.
- [65] A. R. Marks *et al.*, "Molecular cloning and characterization of the ryanodine receptor/junctional channel complex cDNA from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 86, no. 22, pp. 8683–8687, 1989, doi: 10.1073/pnas.86.22.8683.
- [66] A. M. Brillantes, P. Allen, T. Takahashi, S. Izumo, and A. R. Marks, "Differences in cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) expression in myocardium from patients with end-stage heart failure caused by ischemic versus dilated cardiomyopathy," *Circ. Res.*, vol. 71, no. 1, pp. 18–26, 1992, doi: 10.1161/01.RES.71.1.18.
- [67] T. Maki *et al.*, "Regulation of calcium channel expression in neonatal myocytes by catecholamines," *J. Clin. Invest.*, vol. 97, no. 3, pp. 656–663, Feb. 1996, doi:

- 10.1172/JCI118462.
- [68] A. M. B. Brillantes, S. Bezprozvannaya, and A. R. Marks, "Developmental and tissue-specific regulation of rabbit skeletal and cardiac muscle calcium channels involved in excitation-contraction coupling," *Circ. Res.*, vol. 75, no. 3, pp. 503–510, 1994, doi: 10.1161/01.RES.75.3.503.
- [69] M. Fitzgerald, C. B. Neylon, A. R. Marks, and E. A. Woodcock, "Reduced ryanodine receptor content in isolated neonatal cardiomyocytes compared with the intact tissue," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 26, no. 10, pp. 1261–1265, 1994, doi: 10.1006/jmcc.1994.1145.
- [70] N. Roseblit, M. C. Moschella, E. Ondriašová, D. E. Gutstein, K. Ondriaš, and A. R. Marks, "Intracellular calcium release channel expression during embryogenesis," *Dev. Biol.*, vol. 206, no. 2, pp. 163–177, Feb. 1999, doi: 10.1006/dbio.1998.9120.
- [71] P. S. McPherson and K. P. Campbell, "Solubilization and biochemical characterization of the high affinity [3H]ryanodine receptor from rabbit brain membranes," *J. Biol. Chem.*, vol. 265, no. 30, pp. 18454–18460, Oct. 1990, doi: 10.1016/s0021-9258(17)44774-0.
- [72] G. Kuwajima, A. Futatsugi, M. Niinobe, S. Nakanishi, and K. Mikoshiba, "Two types of ryanodine receptors in mouse brain: Skeletal muscle type exclusively in Purkinje cells and cardiac muscle type in various neurons," *Neuron*, vol. 9, no. 6, pp. 1133–1142, 1992, doi: 10.1016/0896-6273(92)90071-K.
- [73] Y. Hakamata, J. Nakai, H. Takeshima, and K. Imoto, "Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain," *FEBS Lett.*, vol. 312, no. 2–3, pp. 229–235, Nov. 1992, doi: 10.1016/0014-5793(92)80941-9.
- [74] G. Santulli, D. R. Lewis, and A. R. Marks, "Physiology and pathophysiology of excitation–contraction coupling: the functional role of ryanodine receptor," *J. Muscle Res. Cell Motil.*, vol. 38, no. 1, pp. 37–45, Feb. 2017, doi: 10.1007/s10974-017-9470-z.
- [75] X. Liu *et al.*, "Role of leaky neuronal ryanodine receptors in stress-induced cognitive dysfunction," *Cell*, vol. 150, no. 5, pp. 1055–1067, Aug. 2012, doi: 10.1016/j.cell.2012.06.052.
- [76] S. E. Lehnart *et al.*, "Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias," *Cell*, vol. 123, no. 1, pp. 25–35,

- Oct. 2005, doi: 10.1016/j.cell.2005.07.030.
- [77] D. C. Andersson *et al.*, “Ryanodine receptor oxidation causes intracellular calcium leak and muscle weakness in aging,” *Cell Metab.*, vol. 14, no. 2, pp. 196–207, Aug. 2011, doi: 10.1016/j.cmet.2011.05.014.
- [78] A. M. Bellinger *et al.*, “Hypernitrosylated ryanodine receptor calcium release channels are leaky in dystrophic muscle,” *Nat. Med.*, vol. 15, no. 3, pp. 325–330, Mar. 2009, doi: 10.1038/nm.1916.
- [79] T. Nguyen, W. C. Chin, and P. Verdugo, “Role of Ca²⁺/K⁺ ion exchange in intracellular storage and release of Ca²⁺,” *Nature*, vol. 395, no. 6705, pp. 908–912, Oct. 1998, doi: 10.1038/27686.
- [80] K. Venkatachalam and C. Montell, “TRP Channels,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 76, no. 1, pp. 387–417, Jun. 2007, doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819.
- [81] M. Faouzi and R. Penner, “TRPM2,” *Handb. Exp. Pharmacol.*, vol. 222, pp. 403–426, 2014, doi: 10.1007/978-3-642-54215-2_16.
- [82] R. Hooper, D. Churamani, E. Brailoiu, C. W. Taylor, and S. Patel, “Membrane topology of NAADP-sensitive two-pore channels and their regulation by N-linked glycosylation,” *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 11, pp. 9141–9149, Mar. 2011, doi: 10.1074/jbc.M110.189985.
- [83] K. Rietdorf, T. M. Funnell, M. Ruas, J. Heinemann, J. Parrington, and A. Galione, “Two-pore channels form homo- and heterodimers,” *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 43, pp. 37058–37062, Oct. 2011, doi: 10.1074/jbc.C111.289835.
- [84] P. J. Calcraft *et al.*, “NAADP mobilizes calcium from acidic organelles through two-pore channels,” *Nature*, vol. 459, no. 7246, pp. 596–600, May 2009, doi: 10.1038/nature08030.
- [85] E. Brailoiu *et al.*, “Essential requirement for two-pore channel 1 in NAADP-mediated calcium signaling,” *J. Cell Biol.*, vol. 186, no. 2, pp. 201–209, Jul. 2009, doi: 10.1083/jcb.200904073.
- [86] E. Brailoiu *et al.*, “An NAADP-gated two-pore channel targeted to the plasma membrane uncouples triggering from amplifying Ca²⁺ signals,” *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 49, pp. 38511–38516, Dec. 2010, doi: 10.1074/jbc.M110.162073.
- [87] X. Wang *et al.*, “TPC proteins are phosphoinositide- Activated sodium-selective ion channels in endosomes and lysosomes,” *Cell*, vol. 151, no. 2, pp. 372–383, Oct. 2012,

- doi: 10.1016/j.cell.2012.08.036.
- [88] S. J. Pitt, A. K. M. Lam, K. Rietdorf, A. Galione, and R. Sitsapesan, "Reconstituted Human TPC1 is a proton-permeable ion channel and is activated by NAADP or Ca²⁺," *Sci. Signal.*, vol. 7, no. 326, pp. ra46–ra46, May 2014, doi: 10.1126/scisignal.2004854.
- [89] Y. Lin-Moshier *et al.*, "Photoaffinity labeling of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) targets in mammalian cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 4, pp. 2296–2307, Jan. 2012, doi: 10.1074/jbc.M111.305813.
- [90] C. Cang, B. Bekele, and D. Ren, "The voltage-gated sodium channel TPC1 confers endolysosomal excitability," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 10, no. 6, pp. 463–469, Apr. 2014, doi: 10.1038/nchembio.1522.
- [91] B. S. Khakh and R. Alan North, "P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease," *Nature*, vol. 442, no. 7102. Nature Publishing Group, pp. 527–532, Aug. 03, 2006, doi: 10.1038/nature04886.
- [92] O. S. Qureshi, A. Paramasivam, J. C. H. Yu, and R. D. Murrell-Lagnado, "Regulation of P2X4 receptors by lysosomal targeting, glycan protection and exocytosis," *J. Cell Sci.*, vol. 120, no. 21, pp. 3838–3849, Nov. 2007, doi: 10.1242/jcs.010348.
- [93] P. Huang *et al.*, "P2X4 forms functional ATP-activated cation channels on lysosomal membranes regulated by luminal pH," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 25, pp. 17658–17667, Jun. 2014, doi: 10.1074/jbc.M114.552158.
- [94] M. Montero *et al.*, "Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca²⁺ transients that modulate secretion," *Nat. Cell Biol.*, vol. 2, no. 2, pp. 57–61, 2000, doi: 10.1038/35000001.
- [95] S. Gandhi *et al.*, "PINK1-Associated Parkinson's Disease Is Caused by Neuronal Vulnerability to Calcium-Induced Cell Death," *Mol. Cell*, vol. 33, no. 5, pp. 627–638, Mar. 2009, doi: 10.1016/j.molcel.2009.02.013.
- [96] M. Kostic *et al.*, "PKA Phosphorylation of NCLX Reverses Mitochondrial Calcium Overload and Depolarization, Promoting Survival of PINK1-Deficient Dopaminergic Neurons," *Cell Rep.*, vol. 13, no. 2, pp. 376–386, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.celrep.2015.08.079.
- [97] R. K. Dagda *et al.*, "Mitochondrially localized PKA reverses mitochondrial pathology and dysfunction in a cellular model of Parkinson's disease," *Cell Death Differ.*, vol. 18, no. 12, pp. 1914–1923, Dec. 2011, doi: 10.1038/cdd.2011.74.

- [98] M. Navarrete and A. Araque, "Endocannabinoids Mediate Neuron-Astrocyte Communication," *Neuron*, vol. 57, no. 6, pp. 883–893, Mar. 2008, doi: 10.1016/j.neuron.2008.01.029.
- [99] A. Serrano, N. Haddjeri, J. C. Lacaille, and R. Robitaille, "GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression," *J. Neurosci.*, vol. 26, no. 20, pp. 5370–5382, May 2006, doi: 10.1523/JNEUROSCI.5255-05.2006.
- [100] M. C. Proverbio *et al.*, "Whole Genome SNP Genotyping and Exome Sequencing Reveal Novel Genetic Variants and Putative Causative Genes in Congenital Hyperinsulinism," *PLoS One*, vol. 8, no. 7, Jul. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0068740.
- [101] M. Verma, J. Callio, P. Anthony Otero, I. Sekler, Z. P. Wills, and C. T. Chu, "Mitochondrial calcium dysregulation contributes to dendrite degeneration mediated by PD/LBD-Associated LRRK2 mutants," *J. Neurosci.*, vol. 37, no. 46, pp. 11151–11165, Nov. 2017, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3791-16.2017.
- [102] D. Rojas-Rivera and C. Hetz, "TM2IM protein family: Ancestral regulators of cell death," *Oncogene*, vol. 34, no. 3. Nature Publishing Group, pp. 269–280, Jan. 15, 2015, doi: 10.1038/onc.2014.6.
- [103] Y. Chang *et al.*, "Structural basis for a pH-sensitive calcium leak across membranes," *Science (80-.)*, vol. 344, no. 6188, pp. 1131–1135, Jun. 2014, doi: 10.1126/science.1252043.
- [104] G. Carrara *et al.*, "Golgi anti-apoptotic proteins are highly conserved ion channels that affect apoptosis and cell migration," *J. Biol. Chem.*, vol. 290, no. 18, pp. 11785–11801, May 2015, doi: 10.1074/jbc.M115.637306.
- [105] R. B. Lomax, C. Camello, F. Van Coppenolle, O. H. Petersen, and A. V. Tepikin, "Basal and physiological Ca²⁺ leak from the endoplasmic reticulum of pancreatic acinar cells. Second messenger-activated channels and translocons," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 29, pp. 26479–26485, Jul. 2002, doi: 10.1074/jbc.M201845200.
- [106] F. Van Coppenolle *et al.*, "Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores," *J. Cell Sci.*, vol. 117, no. 18, pp. 4135–4142, Aug. 2004, doi: 10.1242/jcs.01274.
- [107] P. Pinton and R. Rizzuto, "Bcl-2 and Ca²⁺ homeostasis in the endoplasmic reticulum," *Cell Death and Differentiation*, vol. 13, no. 8. Nature Publishing Group, pp. 1409–

- 1418, Aug. 26, 2006, doi: 10.1038/sj.cdd.4401960.
- [108] H. Tu *et al.*, "Presenilins Form ER Ca²⁺ Leak Channels, a Function Disrupted by Familial Alzheimer's Disease-Linked Mutations," *Cell*, vol. 126, no. 5, pp. 981–993, Sep. 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.06.059.
- [109] M. Chami *et al.*, "SERCA1 truncated proteins unable to pump calcium reduce the endoplasmic reticulum calcium concentration and induce apoptosis," *J. Cell Biol.*, vol. 153, no. 6, pp. 1301–1313, Jun. 2001, doi: 10.1083/jcb.153.6.1301.
- [110] Q. C. Wang *et al.*, "TMCO1 is an ER Ca²⁺ load-activated Ca²⁺ channel," *Cell*, vol. 165, no. 6, pp. 1454–1466, Jun. 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.04.051.
- [111] B. F. Alfonso and M. Al-Rubeai, "Flow Cytometry," in *Comprehensive Biotechnology, Second Edition*, vol. 1, Elsevier Inc., 2011, pp. 559–578.
- [112] P. J. Buchanan and K. D. McCloskey, "CaV channels and cancer: canonical functions indicate benefits of repurposed drugs as cancer therapeutics," *European Biophysics Journal*, vol. 45, no. 7, Springer Verlag, pp. 621–633, Oct. 01, 2016, doi: 10.1007/s00249-016-1144-z.
- [113] W. A. Catterall, "Voltage-gated calcium channels," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 3, no. 8, pp. 1–23, Aug. 2011, doi: 10.1101/cshperspect.a003947.
- [114] C. Gachet, "P2 receptors, platelet function and pharmacological implications," *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 99, no. 3, pp. 466–472, Mar. 2008, doi: 10.1160/TH07-11-0673.
- [115] J. X. Shen and J. L. Yakel, "Nicotinic acetylcholine receptor-mediated calcium signaling in the nervous system," *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 30, no. 6, Nature Publishing Group, pp. 673–680, Jun. 18, 2009, doi: 10.1038/aps.2009.64.
- [116] J. A. Rosado and S. O. Sage, "Protein kinase C activates non-capacitative calcium entry in human platelets," *J. Physiol.*, vol. 529, no. 1, pp. 159–169, Nov. 2000, doi: 10.1111/j.1469-7793.2000.00159.x.
- [117] O. Mignen and T. J. Shuttleworth, "I(ARC), a novel arachidonate-regulated, noncapacitative Ca²⁺ entry channel," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 13, pp. 9114–9119, Mar. 2000, doi: 10.1074/jbc.275.13.9114.
- [118] J. W. Putney, "A model for receptor-regulated calcium entry," *Cell Calcium*, vol. 7, no. 1, pp. 1–12, 1986, doi: 10.1016/0143-4160(86)90026-6.
- [119] C. Y. Kwan, H. Takemura, J. F. Obie, O. Thastrup, and J. W. Putney, "Effects of MeCh,

- thapsigargin, and La³⁺ on plasmalemmal and intracellular Ca²⁺ transport in lacrimal acinar cells," *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.*, vol. 258, no. 6 27-6, 1990, doi: 10.1152/ajpcell.1990.258.6.c1006.
- [120] M. Hoth and R. Penner, "Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells," *Nature*, vol. 355, no. 6358, pp. 353–356, 1992, doi: 10.1038/355353a0.
- [121] M. Trebak, G. S. J. Bird, R. R. McKay, and J. W. Putney, "Comparison of human TRPC3 channels in receptor-activated and store-operated modes. Differential sensitivity to channel blockers suggests fundamental differences in channel composition," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 24, pp. 21617–21623, Jun. 2002, doi: 10.1074/jbc.M202549200.
- [122] K. Venkatachalam, F. Zheng, and D. L. Gill, "Regulation of canonical transient receptor potential (TRPC) channel function by diacylglycerol and protein kinase C," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 31, pp. 29031–29040, Aug. 2003, doi: 10.1074/jbc.M302751200.
- [123] K. T. Cheng, X. Liu, H. L. Ong, W. Swaim, and I. S. Ambudkar, "Local Ca²⁺ Entry Via Orai1 Regulates Plasma Membrane Recruitment of TRPC1 and Controls Cytosolic Ca²⁺ Signals Required for Specific Cell Functions," *PLoS Biol.*, vol. 9, no. 3, p. e1001025, Mar. 2011, doi: 10.1371/journal.pbio.1001025.
- [124] H. L. Ong, L. B. De Souza, and I. S. Ambudkar, "Role of TRPC channels in store-operated calcium entry," in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 898, Springer New York LLC, 2016, pp. 87–109.
- [125] I. S. Ambudkar, L. B. de Souza, and H. L. Ong, "TRPC1, Orai1, and STIM1 in SOCE: Friends in tight spaces," *Cell Calcium*, vol. 63. Elsevier Ltd, pp. 33–39, May 01, 2017, doi: 10.1016/j.ceca.2016.12.009.
- [126] S. L. Zhang *et al.*, "STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane," *Nature*, vol. 437, no. 7060, pp. 902–905, Oct. 2005, doi: 10.1038/nature04147.
- [127] J. Roos *et al.*, "STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function," *J. Cell Biol.*, vol. 169, no. 3, pp. 435–445, May 2005, doi: 10.1083/jcb.200502019.
- [128] S. Feske *et al.*, "A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function," *Nature*, vol. 441, no. 7090, pp. 179–185, May 2006, doi: 10.1038/nature04702.

- [129] A. Gudlur *et al.*, “Calcium sensing by the STIM1 ER-luminal domain,” *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–15, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-06816-8.
- [130] V. Lunz, C. Romanin, and I. Frischauf, “STIM1 activation of Orai1,” *Cell Calcium*, vol. 77, pp. 29–38, Jan. 2019, doi: 10.1016/J.CECA.2018.11.009.
- [131] N. Hirve, V. Rajanikanth, P. G. Hogan, and A. Gudlur, “Coiled-Coil Formation Conveys a STIM1 Signal from ER Lumen to Cytoplasm,” *Cell Rep.*, vol. 22, no. 1, pp. 72–83, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.celrep.2017.12.030.
- [132] M. Fahrner *et al.*, “A coiled-coil clamp controls both conformation and clustering of stromal interaction molecule 1 (STIM1),” *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 48, pp. 33231–33244, Nov. 2014, doi: 10.1074/jbc.M114.610022.
- [133] F. Yu, L. Sun, S. Hubrack, S. Selvaraj, and K. Machaca, “Intramolecular shielding maintains the ER Ca²⁺ sensor stim1 in an inactive conformation,” *J. Cell Sci.*, vol. 126, no. 11, pp. 2401–2410, Jun. 2013, doi: 10.1242/jcs.117200.
- [134] P. B. Stathopoulos, L. Zheng, G. Y. Li, M. J. Plevin, and M. Ikura, “Structural and Mechanistic Insights into STIM1-Mediated Initiation of Store-Operated Calcium Entry,” *Cell*, vol. 135, no. 1, pp. 110–122, Oct. 2008, doi: 10.1016/j.cell.2008.08.006.
- [135] P. B. Stathopoulos, G. Y. Li, M. J. Plevin, J. B. Ames, and M. Ikura, “Stored Ca²⁺ depletion-induced oligomerization of stromal interaction molecule 1 (STIM1) via the EF-SAM region: An initiation mechanism for capacitive Ca²⁺ entry,” *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 47, pp. 35855–35862, Nov. 2006, doi: 10.1074/jbc.M608247200.
- [136] G. Ma *et al.*, “Inside-out Ca²⁺ signalling prompted by STIM1 conformational switch,” *Nat. Commun.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–14, Jul. 2015, doi: 10.1038/ncomms8826.
- [137] H. Dong, G. Fiorin, V. Carnevale, W. Treptow, and M. L. Klein, “Pore waters regulate ion permeation in a calcium release-activated calcium channel,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 43, pp. 17332–17337, Oct. 2013, doi: 10.1073/pnas.1316969110.
- [138] M. Fahrner *et al.*, “Mechanistic view on domains mediating STIM1-Orai coupling,” *Immunological Reviews*, vol. 231, no. 1, pp. 99–112, Sep. 01, 2009, doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00815.x.
- [139] M. Fahrner *et al.*, “A dual mechanism promotes switching of the Stormorken STIM1 R304W mutant into the activated state,” *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–12, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-03062-w.

- [140] J. P. Yuan, W. Zeng, M. R. Dorwart, Y. J. Choi, P. F. Worley, and S. Muallem, "SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels," *Nat. Cell Biol.*, vol. 11, no. 3, pp. 337–343, 2009, doi: 10.1038/ncb1842.
- [141] M. Muik *et al.*, "A cytosolic homomerization and a modulatory domain within STIM1 C terminus determine coupling to ORAI1 channels," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 13, pp. 8421–8426, Mar. 2009, doi: 10.1074/jbc.C800229200.
- [142] C. Y. Park *et al.*, "STIM1 Clusters and Activates CRAC Channels via Direct Binding of a Cytosolic Domain to Orai1," *Cell*, vol. 136, no. 5, pp. 876–890, Mar. 2009, doi: 10.1016/j.cell.2009.02.014.
- [143] T. Kawasaki, I. Lange, and S. Feske, "A minimal regulatory domain in the C terminus of STIM1 binds to and activates ORAI1 CRAC channels," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 385, no. 1, pp. 49–54, Jul. 2009, doi: 10.1016/j.bbrc.2009.05.020.
- [144] J. Liou, M. Fivaz, T. Inoue, and T. Meyer, "Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after Ca²⁺ store depletion," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 22, pp. 9301–9306, May 2007, doi: 10.1073/pnas.0702866104.
- [145] G. N. Huang *et al.*, "STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, Icrac and TRPC1 channels," *Nat. Cell Biol.*, vol. 8, no. 9, pp. 1003–1010, Sep. 2006, doi: 10.1038/ncb1454.
- [146] M. M. Wu, E. D. Covington, and R. S. Lewis, "Single-molecule analysis of diffusion and trapping of STIM1 and Orai1 at endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions," *Mol. Biol. Cell*, vol. 25, no. 22, pp. 3672–3685, Nov. 2014, doi: 10.1091/mbc.E14-06-1107.
- [147] X. Hou, L. Pedi, M. M. Diver, and S. B. Long, "Crystal structure of the calcium release-activated calcium channel orai," *Science (80-.)*, vol. 338, no. 6112, pp. 1308–1313, Dec. 2012, doi: 10.1126/science.1228757.
- [148] I. Frischauf *et al.*, "A calcium-accumulating region, CAR, in the channel Orai1 enhances Ca²⁺ permeation and SOCE-induced gene transcription," *Sci. Signal.*, vol. 8, no. 408, Dec. 2015, doi: 10.1126/scisignal.aab1901.
- [149] Z. Li, J. Lu, P. Xu, X. Xie, L. Chen, and T. Xu, "Mapping the interacting domains of STIM1 and Orai1 in Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel activation," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 40, pp. 29448–29456, Oct. 2007, doi: 10.1074/jbc.M703573200.

- [150] M. Muik *et al.*, “Dynamic coupling of the putative coiled-coil domain of ORAI1 with STIM1 mediates ORAI1 channel activation,” *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 12, pp. 8014–8022, Mar. 2008, doi: 10.1074/jbc.M708898200.
- [151] H. Zheng *et al.*, “Differential roles of the C and N termini of Orai1 protein in interacting with stromal interaction molecule 1 (STIM1) for Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) channel activation,” *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 16, pp. 11263–11272, Apr. 2013, doi: 10.1074/jbc.M113.450254.
- [152] Y. Zhou *et al.*, “The STIM1-binding site nexus remotely controls Orai1 channel gating,” *Nat. Commun.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–13, Dec. 2016, doi: 10.1038/ncomms13725.
- [153] B. A. McNally, A. Somasundaram, A. Jairaman, M. Yamashita, and M. Prakriya, “The C- and N-terminal STIM1 binding sites on Orai1 are required for both trapping and gating CRAC channels,” *J. Physiol.*, vol. 591, no. 11, pp. 2833–2850, Jun. 2013, doi: 10.1113/jphysiol.2012.250456.
- [154] R. Palty and E. Y. Isacoff, “Cooperative binding of stromal interaction molecule 1 (STIM1) to the N and C termini of calcium release-activated calcium modulator 1 (Orai1),” *J. Biol. Chem.*, vol. 291, no. 1, pp. 334–341, Jan. 2016, doi: 10.1074/jbc.M115.685289.
- [155] P. B. Stathopoulos *et al.*, “STIM1/Orai1 coiled-coil interplay in the regulation of store-operated calcium entry,” *Nat. Commun.*, vol. 4, Dec. 2013, doi: 10.1038/ncomms3963.
- [156] P. S. W. Yeung, M. Yamashita, and M. Prakriya, “Molecular basis of allosteric Orai1 channel activation by STIM1,” *Journal of Physiology*, vol. 598, no. 9. Blackwell Publishing Ltd, pp. 1707–1723, May 01, 2020, doi: 10.1113/JP276550.
- [157] X. Hou, S. R. Burstein, and S. B. Long, “Structures reveal opening of the store-operated calcium channel Orai,” *Elife*, vol. 7, Aug. 2018, doi: 10.7554/eLife.36758.
- [158] X. Liu *et al.*, “Molecular understanding of calcium permeation through the open Orai channel,” vol. 17, no. 4, p. e3000096, Apr. 2019, doi: 10.1371/journal.pbio.3000096.
- [159] M. Yen and R. S. Lewis, “Numbers count: How STIM and Orai stoichiometry affect store-operated calcium entry,” *Cell Calcium*, vol. 79, pp. 35–43, May 2019, doi: 10.1016/J.CECA.2019.02.002.
- [160] X. Yang, H. Jin, X. Cai, S. Li, and Y. Shen, “Structural and mechanistic insights into the activation of Stromal interaction molecule 1 (STIM1),” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*,

- vol. 109, no. 15, pp. 5657–5662, Apr. 2012, doi: 10.1073/pnas.1118947109.
- [161] M. K. Korzeniewski, E. Wisniewski, B. Baird, D. A. Holowka, and T. Balla, “Molecular anatomy of the early events in STIM1 activation - Oligomerization or conformational change?,” *J. Cell Sci.*, vol. 130, no. 17, pp. 2821–2832, Sep. 2017, doi: 10.1242/jcs.205583.
- [162] E. D. Covington, M. M. Wu, and R. S. Lewis, “Essential role for the CRAC activation domain in store-dependent oligomerization of STIM1,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 21, no. 11, pp. 1897–1907, Jun. 2010, doi: 10.1091/mbc.E10-02-0145.
- [163] M. Yen and R. S. Lewis, “Physiological CRAC channel activation and pore properties require STIM1 binding to all six Orai1 subunits,” *J. Gen. Physiol.*, vol. 215, no. 10, pp. 1373–1385, Oct. 2018, doi: 10.1085/jgp.201711985.
- [164] B. Zhivotovsky and S. Orrenius, “Calcium and cell death mechanisms: A perspective from the cell death community,” *Cell Calcium*, vol. 50, no. 3. Elsevier Ltd, pp. 211–221, Sep. 01, 2011, doi: 10.1016/j.ceca.2011.03.003.
- [165] A. Zweifach and R. S. Lewis, “Rapid inactivation of depletion-activated calcium current (ICRAC) due to local calcium feedback,” *J. Gen. Physiol.*, vol. 105, no. 2, pp. 209–226, Feb. 1995, doi: 10.1085/jgp.105.2.209.
- [166] L. Fierro and A. B. Parekh, “Fast calcium-dependent inactivation of calcium release-activated calcium current (CRAC) in RBL-1 cells,” *J. Membr. Biol.*, vol. 168, no. 1, pp. 9–17, Mar. 1999, doi: 10.1007/s002329900493.
- [167] S. Srikanth, H. J. Jung, B. Ribalet, and Y. Gwack, “The intracellular loop of Orai1 plays a central role in fast inactivation of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels,” *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 7, pp. 5066–5075, Feb. 2010, doi: 10.1074/jbc.M109.072736.
- [168] F. M. Mullins, Y. P. Chan, R. E. Dolmetsch, and R. S. Lewis, “STIM1 and calmodulin interact with Orai1 to induce Ca²⁺-dependent inactivation of CRAC channels,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 36, pp. 15495–15500, Sep. 2009, doi: 10.1073/pnas.0906781106.
- [169] F. M. Mullins and R. S. Lewis, “The inactivation domain of STIM1 is functionally coupled with the Orai1 pore to enable Ca²⁺-dependent inactivation,” *J. Gen. Physiol.*, vol. 147, no. 2, pp. 153–164, 2016, doi: 10.1085/jgp.201511438.
- [170] D. Willoughby *et al.*, “Direct binding between Orai1 and AC8 mediates dynamic interplay between Ca²⁺ and cAMP signaling,” *Sci. Signal.*, vol. 5, no. 219, pp. ra29–

- ra29, Apr. 2012, doi: 10.1126/scisignal.2002299.
- [171] X. Zhang *et al.*, “A calcium/cAMP signaling loop at the ORAI1 mouth drives channel inactivation to shape NFAT induction,” *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-09593-0.
- [172] A. Zweifach and R. S. Lewis, “Slow calcium-dependent inactivation of depletion-activated calcium current. Store-dependent and -independent mechanisms,” *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 24, pp. 14445–14451, Jun. 1995, doi: 10.1074/jbc.270.24.14445.
- [173] M. Zhang and T. Yuan, “Molecular mechanisms of calmodulin’s functional versatility,” *Biochemistry and Cell Biology*, vol. 76, no. 2–3. National Research Council of Canada, pp. 313–323, 1998, doi: 10.1139/o98-027.
- [174] T. Tanaka and H. Hidaka, “Hydrophobic regions function in calmodulin-enzyme(s) interactions,” *J. Biol. Chem.*, vol. 255, no. 23, pp. 11078–11080, Dec. 1980, doi: 10.1016/s0021-9258(19)70253-1.
- [175] M. Ben-Johny *et al.*, “Towards a Unified Theory of Calmodulin Regulation (Calmodulation) of Voltage-Gated Calcium and Sodium Channels.”
- [176] B. B. Singh, X. Liu, J. Tang, M. X. Zhu, and I. S. Ambudkar, “Calmodulin regulates Ca²⁺-dependent feedback inhibition of store-operated Ca²⁺ influx by interaction with a site in the C terminus of TrpC1,” *Mol. Cell*, vol. 9, no. 4, pp. 739–750, Apr. 2002, doi: 10.1016/S1097-2765(02)00506-3.
- [177] R. Bhardwaj *et al.*, “Ca²⁺/calmodulin binding to STIM1 hydrophobic residues facilitates slow Ca²⁺-dependent inactivation of the ORAI1 channel,” *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 54, no. 2, pp. 252–270, 2020, doi: 10.33594/000000218.
- [178] R. Palty, A. Raveh, I. Kaminsky, R. Meller, and E. Reuveny, “SARAF inactivates the store operated calcium entry machinery to prevent excess calcium refilling,” *Cell*, vol. 149, no. 2, pp. 425–438, Apr. 2012, doi: 10.1016/j.cell.2012.01.055.
- [179] L. Albarran, S. Regodón, G. M. Salido, J. J. Lopez, and J. A. Rosado, “Role of STIM1 in the surface expression of SARAF,” *Channels*, vol. 11, no. 1, pp. 84–88, 2016, doi: 10.1080/19336950.2016.1212141.
- [180] A. Jha *et al.*, “The STIM1 CTID domain determines access of SARAF to SOAR to regulate Orai1 channel function,” *J. Cell Biol.*, vol. 202, no. 1, pp. 71–78, Jul. 2013, doi: 10.1083/jcb.201301148.
- [181] L. Albarran *et al.*, “EFHB is a novel cytosolic Ca²⁺ sensor that modulates STIM1-

- SARAF interaction," *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 51, no. 3, pp. 1164–1178, Dec. 2018, doi: 10.1159/000495494.
- [182] A. T. Campagnoni *et al.*, "Structure and developmental regulation of Golli-mbp, a 105-kilobase gene that encompasses the myelin basic protein gene and is expressed in cells in the oligodendrocyte lineage in the brain," *J. Biol. Chem.*, vol. 268, no. 7, pp. 4930–4938, Mar. 1993, doi: 10.1016/s0021-9258(18)53485-2.
- [183] C. M. Walsh, M. K. Doherty, A. V. Tepikin, and R. D. Burgoyne, "Evidence for an interaction between Golli and STIM1 in store-operated calcium entry," *Biochem. J.*, vol. 430, no. 3, pp. 453–460, Sep. 2010, doi: 10.1042/BJ20100650.
- [184] S. G. Ha *et al.*, "ORMDL3 promotes eosinophil trafficking and activation via regulation of integrins and CD48," *Nat. Commun.*, vol. 4, no. 1, pp. 1–9, Sep. 2013, doi: 10.1038/ncomms3479.
- [185] A. Carreras-sureda *et al.*, "ORMDL3 modulates store-operated calcium entry and lymphocyte activation," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 22, no. 3, pp. 519–530, Feb. 2013, doi: 10.1093/hmg/dds450.
- [186] S. Srikanth, H. J. Jung, K. Do Kim, P. Souda, J. Whitelegge, and Y. Gwack, "A novel EF-hand protein, CRACR2A, is a cytosolic Ca²⁺ sensor that stabilizes CRAC channels in T cells," *Nat. Cell Biol.*, vol. 12, no. 5, pp. 436–446, May 2010, doi: 10.1038/ncb2045.
- [187] J. Jing *et al.*, "Proteomic mapping of ER-PM junctions identifies STIMATE as a regulator of Ca²⁺ influx," *Nat. Cell Biol.*, vol. 17, no. 10, pp. 1339–1347, Oct. 2015, doi: 10.1038/ncb3234.
- [188] C. Peinelt *et al.*, "Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1)," *Nat. Cell Biol.*, vol. 8, no. 7, pp. 771–773, Jul. 2006, doi: 10.1038/ncb1435.
- [189] B. Darbellay, S. Arnaudeau, C. R. Bader, S. Konig, and L. Bernheim, "STIM1L is a new actin-binding splice variant involved in fast repetitive Ca²⁺ release," *J. Cell Biol.*, vol. 194, no. 2, pp. 335–346, Jul. 2011, doi: 10.1083/jcb.201012157.
- [190] S. Saüc *et al.*, "STIM1L traps and gates Orai1 channels without remodeling the cortical ER," *J. Cell Sci.*, vol. 128, no. 8, pp. 1568–1579, Apr. 2015, doi: 10.1242/jcs.164228.
- [191] A. Dyrda, S. Koenig, and M. Frieden, "STIM1 long and STIM1 gate differently TRPC1 during store-operated calcium entry," *Cell Calcium*, vol. 86, p. 102134, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.ceca.2019.102134.
- [192] M. L. Knapp *et al.*, "Alternative splicing switches STIM1 targeting to specialized

- membrane contact sites and modifies SOCE," *bioRxiv*, p. 2020.03.25.005199, Mar. 2020, doi: 10.1101/2020.03.25.005199.
- [193] G. Ramesh *et al.*, "A short isoform of STIM1 confers frequency-dependent synaptic enhancement," *Cell Rep.*, vol. 34, no. 11, p. 108844, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.celrep.2021.108844.
- [194] R. T. Williams *et al.*, "Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: Coding for a novel class of transmembrane proteins," *Biochem. J.*, vol. 357, no. 3, pp. 673–685, Aug. 2001, doi: 10.1042/0264-6021:3570673.
- [195] A. M. Miederer *et al.*, "A STIM2 splice variant negatively regulates store-operated calcium entry," *Nat. Commun.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–12, Apr. 2015, doi: 10.1038/ncomms7899.
- [196] O. Brandman, J. Liou, W. S. Park, and T. Meyer, "STIM2 Is a Feedback Regulator that Stabilizes Basal Cytosolic and Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ Levels," *Cell*, vol. 131, no. 7, pp. 1327–1339, Dec. 2007, doi: 10.1016/j.cell.2007.11.039.
- [197] Y. Zhou *et al.*, "The short N-terminal domains of STIM1 and STIM2 control the activation kinetics of Orai1 channels," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 29, pp. 19164–19168, Jul. 2009, doi: 10.1074/jbc.C109.010900.
- [198] S. Zheng *et al.*, "Identification of molecular determinants that govern distinct STIM2 activation dynamics," *PLoS Biol.*, vol. 16, no. 11, p. e2006898, Nov. 2018, doi: 10.1371/journal.pbio.2006898.
- [199] M. A. Dziadek and L. S. Johnstone, "Biochemical properties and cellular localisation of STIM proteins," *Cell Calcium*, vol. 42, no. 2, pp. 123–132, Aug. 2007, doi: 10.1016/j.ceca.2007.02.006.
- [200] H. L. Ong *et al.*, "STIM2 enhances receptor-stimulated Ca²⁺ signaling by promoting recruitment of STIM1 to the endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions," *Sci. Signal.*, vol. 8, no. 359, pp. ra3–ra3, Jan. 2015, doi: 10.1126/scisignal.2005748.
- [201] M. Fukushima, T. Tomita, A. Janoshazi, and J. W. Putney, "Alternative translation initiation gives rise to two isoforms of Orai1 with distinct plasma membrane mobilities," *J. Cell Sci.*, vol. 125, no. 18, pp. 4354–4361, Sep. 2012, doi: 10.1242/jcs.104919.
- [202] M. Maus *et al.*, "Store-Operated Ca²⁺ Entry Controls Induction of Lipolysis and the

- Transcriptional Reprogramming to Lipid Metabolism,” *Cell Metab.*, vol. 25, no. 3, pp. 698–712, Mar. 2017, doi: 10.1016/j.cmet.2016.12.021.
- [203] R. Hooper *et al.*, “Novel Protein Kinase C-Mediated Control of Orai1 Function in Invasive Melanoma,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 35, no. 16, pp. 2790–2798, Aug. 2015, doi: 10.1128/mcb.01500-14.
- [204] T. Kawasaki, T. Ueyama, I. Lange, S. Feske, and N. Saito, “Protein kinase C-induced phosphorylation of Orai1 regulates the intracellular Ca²⁺ level via the store-operated Ca²⁺ channel,” *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 33, pp. 25720–25730, Aug. 2010, doi: 10.1074/jbc.M109.022996.
- [205] F. Yu, L. Sun, and K. Machaca, “Constitutive recycling of the store-operated Ca²⁺ channel Orai1 and its internalization during meiosis,” *J. Cell Biol.*, vol. 191, no. 3, pp. 523–535, Nov. 2010, doi: 10.1083/jcb.201006022.
- [206] P. N. Desai *et al.*, “Multiple types of calcium channels arising from alternative translation initiation of the Orai1 message,” *Sci. Signal.*, vol. 8, no. 387, pp. ra74–ra74, Jul. 2015, doi: 10.1126/scisignal.aaa8323.
- [207] P. Kar *et al.*, “The N terminus of Orai1 couples to the AKAP79 signaling complex to drive NFAT1 activation by local Ca²⁺ entry,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 118, no. 19, p. e2012908118, May 2021, doi: 10.1073/pnas.2012908118.
- [208] F. Shibasaki, E. R. Price, D. Milan, and F. McKeon, “Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4,” *Nature*, vol. 382, no. 6589, pp. 370–373, 1996, doi: 10.1038/382370a0.
- [209] X. Cai, “Molecular Evolution and Structural Analysis of the Ca²⁺ Release-Activated Ca²⁺ Channel Subunit, Orai,” *J. Mol. Biol.*, vol. 368, no. 5, pp. 1284–1291, May 2007, doi: 10.1016/j.jmb.2007.03.022.
- [210] M. Fahrner *et al.*, “Communication between N terminus and loop2 tunes Orai activation,” *J. Biol. Chem.*, vol. 293, no. 4, pp. 1271–1285, Jan. 2018, doi: 10.1074/jbc.M117.812693.
- [211] I. Azimi *et al.*, “A New Selective Pharmacological Enhancer of the Orai1 Ca²⁺ Channel Reveals Roles for Orai1 in Smooth and Skeletal Muscle Functions,” *ACS Pharmacol. Transl. Sci.*, vol. 3, no. 1, pp. 135–147, Feb. 2020, doi: 10.1021/acspsci.9b00081.
- [212] S. Kappel, T. Kilch, R. Baur, M. Lochner, and C. Peinelt, “The number and position of orai3 units within heteromeric store-operated Ca²⁺ channels alter the pharmacology

- of ICRCAC," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 7, p. 2458, Apr. 2020, doi: 10.3390/ijms21072458.
- [213] R. Schindl *et al.*, "2-Aminoethoxydiphenyl borate alters selectivity of Orai3 channels by increasing their pore size," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 29, pp. 20261–20267, Jul. 2008, doi: 10.1074/jbc.M803101200.
- [214] C. Peinelt, A. Lis, A. Beck, A. Fleig, and R. Penner, "2-Aminoethoxydiphenyl borate directly facilitates and indirectly inhibits STIM1-dependent gating of CRAC channels," *J. Physiol.*, vol. 586, no. 13, pp. 3061–3073, Jul. 2008, doi: 10.1113/jphysiol.2008.151365.
- [215] W. I. DeHaven, J. T. Smyth, R. R. Boyles, G. S. Bird, and J. W. Putney, "Complex actions of 2-aminoethoxydiphenyl borate on store-operated calcium entry," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 28, pp. 19265–19273, Jul. 2008, doi: 10.1074/jbc.M801535200.
- [216] W. I. DeHaven, J. T. Smyth, R. R. Boyles, and J. W. Putney, "Calcium inhibition and calcium potentiation of Orai1, Orai2, and Orai3 calcium release-activated calcium channels," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 24, pp. 17548–17556, Jun. 2007, doi: 10.1074/jbc.M611374200.
- [217] A. Lis *et al.*, "CRACM1, CRACM2, and CRACM3 Are Store-Operated Ca²⁺ Channels with Distinct Functional Properties," *Curr. Biol.*, vol. 17, no. 9, pp. 794–800, May 2007, doi: 10.1016/j.cub.2007.03.065.
- [218] R. E. Yoast *et al.*, "The native ORAI channel trio underlies the diversity of Ca²⁺ signaling events," *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, p. 2444, May 2020, doi: 10.1038/s41467-020-16232-6.
- [219] M. Vaeth *et al.*, "ORAI2 modulates store-operated calcium entry and T cell-mediated immunity," *Nat. Commun.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–17, Mar. 2017, doi: 10.1038/ncomms14714.
- [220] V. Tsvilovskyy *et al.*, "Deletion of Orai2 augments endogenous CRAC currents and degranulation in mast cells leading to enhanced anaphylaxis," *Cell Calcium*, vol. 71, pp. 24–33, May 2018, doi: 10.1016/j.ceca.2017.11.004.
- [221] R. K. Motiani *et al.*, "Orai3 is an estrogen receptor α -regulated Ca²⁺ channel that promotes tumorigenesis," *FASEB J.*, vol. 27, no. 1, pp. 63–75, Jan. 2013, doi: 10.1096/fj.12-213801.
- [222] S. Chauvet, L. Jarvis, M. Chevallet, N. Shrestha, K. Groschner, and A. Bouron,

- “Pharmacological characterization of the native store-operated calcium channels of cortical neurons from embryonic mouse brain,” *Front. Pharmacol.*, vol. 7, no. DEC, p. 486, Dec. 2016, doi: 10.3389/fphar.2016.00486.
- [223] A. Berna-Erro *et al.*, “STIM2 regulates capacitive Ca²⁺ entry in neurons and plays a key role in hypoxic neuronal cell death,” *Sci. Signal.*, vol. 2, no. 93, pp. ra67–ra67, Oct. 2009, doi: 10.1126/scisignal.2000522.
- [224] P. D. Wes, J. Chevesich, A. Jeromin, C. Rosenberg, G. Stetten, and C. Montell, “TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 21, pp. 9652–9656, Oct. 1995, doi: 10.1073/pnas.92.21.9652.
- [225] X. Zhu, P. B. Chu, M. Peyton, and L. Birnbaumer, “Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the *Drosophila* trp gene,” *FEBS Lett.*, vol. 373, no. 3, pp. 193–198, Oct. 1995, doi: 10.1016/0014-5793(95)01038-G.
- [226] U. A. Hellmich and R. Gaudet, “Structural biology of TRP channels,” *Handb. Exp. Pharmacol.*, vol. 223, pp. 963–990, 2014, doi: 10.1007/978-3-319-05161-1_10.
- [227] M. Schaefer, “Homo- and heteromeric assembly of TRP channel subunits,” *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, vol. 451, no. 1. Springer, pp. 35–42, Oct. 22, 2005, doi: 10.1007/s00424-005-1467-6.
- [228] A. W. Cohen, R. Hnasko, W. Schubert, and M. P. Lisanti, “Role of caveolae and caveolins in health and disease,” *Physiological Reviews*, vol. 84, no. 4. American Physiological Society, pp. 1341–1379, Oct. 2004, doi: 10.1152/physrev.00046.2003.
- [229] L. Gregorio-Teruel, P. Valente, J. M. González-Ros, G. Fernández-Ballester, and A. Ferrer-Montiel, “Mutation of I696 and W697 in the TRP box of vanilloid receptor subtype 1 modulates allosteric channel activation,” *J. Gen. Physiol.*, vol. 143, no. 3, pp. 361–375, Mar. 2014, doi: 10.1085/jgp.201311070.
- [230] B. J. Wedel, G. Vazquez, R. R. McKay, G. S. J. Bird, and J. W. Putney, “A calmodulin/inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) receptor-binding region targets TRPC3 to the plasma membrane in a calmodulin/IP₃ receptor-independent process,” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 28, pp. 25758–25765, Jul. 2003, doi: 10.1074/jbc.M303890200.
- [231] N. Dionisio, L. Albarran, A. Berna-Erro, J. M. Hernandez-Cruz, G. M. Salido, and J. A. Rosado, “Functional role of the calmodulin- and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-binding (CIRB) site of TRPC6 in human platelet activation,” *Cell. Signal.*, vol. 23, no. 11, pp. 1850–1856, Nov. 2011, doi: 10.1016/j.cellsig.2011.06.022.

- [232] K. P. Lee *et al.*, “Molecular determinants mediating gating of transient receptor potential canonical (TRPC) channels by stromal interaction molecule 1 (STIM1),” *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 10, pp. 6372–6382, Mar. 2014, doi: 10.1074/jbc.M113.546556.
- [233] X. Zhu *et al.*, “trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca²⁺ entry,” *Cell*, vol. 85, no. 5, pp. 661–671, May 1996, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81233-7.
- [234] C. Zitt *et al.*, “Cloning and functional expression of a human Ca²⁺-permeable cation channel activated by calcium store depletion,” *Neuron*, vol. 16, no. 6, pp. 1189–1196, Jun. 1996, doi: 10.1016/S0896-6273(00)80145-2.
- [235] J. A. Rosado, S. L. Brownlow, and S. O. Sage, “Endogenously expressed Trp1 is involved in store-mediated Ca²⁺ entry by conformational coupling in human platelets,” *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 44, pp. 42157–42163, Nov. 2002, doi: 10.1074/jbc.M207320200.
- [236] X. Liu *et al.*, “Trp1, a candidate protein for the store-operated Ca²⁺ influx mechanism in salivary gland cells,” *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 5, pp. 3403–3411, Feb. 2000, doi: 10.1074/jbc.275.5.3403.
- [237] A. B. Parekh and J. W. Putney, “Store-operated calcium channels,” *Physiological Reviews*, vol. 85, no. 2. American Physiological Society, pp. 757–810, Apr. 2005, doi: 10.1152/physrev.00057.2003.
- [238] M. S. Kim, W. Zeng, J. P. Yuan, D. M. Shin, P. F. Worley, and S. Muallem, “Native store-operated Ca²⁺ influx requires the channel function of Orai 1 and TRPC1,” *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 15, pp. 9733–9741, Apr. 2009, doi: 10.1074/jbc.M808097200.
- [239] I. Jardin, J. J. Lopez, G. M. Salido, and J. A. Rosado, “Orai1 mediates the interaction between STIM1 and hTRPC1 and regulates the mode of activation of hTRPC1-forming Ca²⁺ channels,” *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 37, pp. 25296–25304, Sep. 2008, doi: 10.1074/jbc.M802904200.
- [240] L. O. Hwei *et al.*, “Dynamic assembly of TRPC1-STIM1-Orai1 ternary complex is involved in store-operated calcium influx: Evidence for similarities in store-operated and calcium release-activated calcium channel components,” *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 12, pp. 9105–9116, Mar. 2007, doi: 10.1074/jbc.M608942200.
- [241] T. C. Kwong, X. Liu, L. O. Hwei, and I. S. Ambudkar, “Functional requirement for Orai1

- in store-operated TRPC1-STIM1 channels," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 19, pp. 12935–12940, May 2008, doi: 10.1074/jbc.C800008200.
- [242] H. L. Ong, S. I. Jang, and I. S. Ambudkar, "Distinct Contributions of Orai1 and TRPC1 to Agonist-Induced $[Ca^{2+}]_i$ Signals Determine Specificity of Ca^{2+} -Dependent Gene Expression," *PLoS One*, vol. 7, no. 10, p. 47146, Oct. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0047146.
- [243] C. Galán, H. Zbidi, A. Bartegi, G. M. Salido, and J. A. Rosado, "STIM1, Orai1 and hTRPC1 are important for thrombin- and ADP-induced aggregation in human platelets," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 490, no. 2, pp. 137–144, Oct. 2009, doi: 10.1016/j.abb.2009.08.007.
- [244] J. Sabourin, L. Le Gal, L. Saurwein, J. A. Haefliger, E. Raddatz, and F. Allagnat, "Store-operated Ca^{2+} entry mediated by Orai1 and TRPC1 participates to insulin secretion in rat β -cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 290, no. 51, pp. 30530–30539, Dec. 2015, doi: 10.1074/jbc.M115.682583.
- [245] A. Schaar *et al.*, " Ca^{2+} entry via TRPC1 is essential for cellular differentiation and modulates secretion via the SNARE complex," *J. Cell Sci.*, vol. 132, no. 13, Jul. 2019, doi: 10.1242/jcs.231878.
- [246] J. Ávila-Medina *et al.*, "Orai1 and TRPC1 proteins co-localize with $CaV1.2$ channels to form a signal complex in vascular smooth muscle cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 291, no. 40, pp. 21148–21159, Sep. 2016, doi: 10.1074/jbc.M116.742171.
- [247] A. Beck *et al.*, "Functional characterization of Transient Receptor Potential (TRP) channel C5 in female murine gonadotropes," *Endocrinology*, vol. 158, no. 4, pp. 887–902, Apr. 2017, doi: 10.1210/en.2016-1810.
- [248] D. C. PEASE, "An electron microscopic study of red bone marrow.," *Blood*, vol. 11, no. 6, pp. 501–526, Jun. 1956, doi: 10.1182/blood.v11.6.501.501.
- [249] J. Levin, S. Ebbe, G. Longmore, J. S. Harrison, and N. G. Abraham, "Why are recently published platelet counts in normal mice so low? [4]," *Blood*, vol. 83, no. 12. American Society of Hematology, pp. 3829–3831, Jun. 15, 1994, doi: 10.1182/blood.v83.12.3829.3829.
- [250] M. M. Frojmovic and J. G. Milton, "Human platelet size, shape, and related functions in health and disease.," *Physiological reviews*, vol. 62, no. 1. pp. 185–261, 1982, doi: 10.1152/physrev.1982.62.1.185.

- [251] K. R. Machlus and J. E. Italiano, "The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation," *Journal of Cell Biology*, vol. 201, no. 6. The Rockefeller University Press, pp. 785–796, Jun. 10, 2013, doi: 10.1083/jcb.201304054.
- [252] T. D. Bartley *et al.*, "Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl," *Cell*, vol. 77, no. 7, pp. 1117–1124, Jul. 1994, doi: 10.1016/0092-8674(94)90450-2.
- [253] K. Kaushansky *et al.*, "Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin," *Nature*, vol. 369, no. 6481, pp. 568–571, 1994, doi: 10.1038/369568a0.
- [254] J. Zimmet and K. Ravid, "Polyploidy: Occurrence in nature, mechanisms, and significance for the megakaryocyte-platelet system," *Experimental Hematology*, vol. 28, no. 1. Elsevier, pp. 3–16, Jan. 01, 2000, doi: 10.1016/S0301-472X(99)00124-1.
- [255] H. Schulze *et al.*, "Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis," *Blood*, vol. 107, no. 10, pp. 3868–3875, May 2006, doi: 10.1182/blood-2005-07-2755.
- [256] M. Tavassoli and M. Aoki, "Localization of megakaryocytes in the bone marrow," *Blood Cells*, vol. 15, no. 1. pp. 3–14, Jan. 01, 1989, Accessed: Jun. 15, 2021. [Online]. Available: <https://europepmc.org/article/med/2649185>.
- [257] J. L. Richardson, R. A. Shivdasani, C. Boers, J. H. Hartwig, and J. E. Italiano, "Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production," *Blood*, vol. 106, no. 13, pp. 4066–4075, Dec. 2005, doi: 10.1182/blood-2005-06-2206.
- [258] P. Lecine, J. E. Italiano, S.-W. Kim, J.-L. Villeval, and R. A. Shivdasani, "Hematopoietic-specific β 1 tubulin participates in a pathway of platelet biogenesis dependent on the transcription factor NF-E2," *Blood*, vol. 96, no. 4, pp. 1366–1373, Aug. 2000, doi: 10.1182/blood.v96.4.1366.
- [259] M. J. Kelley, W. Jawien, T. L. Ortel, and J. F. Korzczak, "Mutation of MYH9, encoding non-muscle myosin heavy chain A, in May-Hegglin anomaly," *Nat. Genet.*, vol. 26, no. 1, pp. 106–108, Sep. 2000, doi: 10.1038/79069.
- [260] M. Seri *et al.*, "Mutations in MYH9 result in the May-Hegglin anomaly, and Fechtner and Sebastian syndromes," *Nat. Genet.*, vol. 26, no. 1, pp. 103–105, Sep. 2000, doi: 10.1038/79063.

- [261] H. Schwertz *et al.*, "Anucleate platelets generate progeny," *Blood*, vol. 115, no. 18, pp. 3801–3809, May 2010, doi: 10.1182/blood-2009-08-239558.
- [262] J. N. Thon *et al.*, "Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release," *J. Cell Biol.*, vol. 191, no. 4, pp. 861–874, Nov. 2010, doi: 10.1083/jcb.201006102.
- [263] D. W. Xiao, M. Yang, J. Yang, K. L. Hon, and F. T. Fok, "Lung damage may induce thrombocytopenia," *Platelets*, vol. 17, no. 5, pp. 347–349, Aug. 2006, doi: 10.1080/09537100600745120.
- [264] R. E. Scharf, "Platelet Signaling in Primary Haemostasis and Arterial Thrombus Formation *: Part 1," *Hamostaseologie*, vol. 38, no. 4. Georg Thieme Verlag, pp. 203–210, 2018, doi: 10.1055/s-0038-1675144.
- [265] K. Jurk and B. E. Kehrel, "Platelets: Physiology and biochemistry," in *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, Aug. 2005, vol. 31, no. 4, pp. 381–392, doi: 10.1055/s-2005-916671.
- [266] A. S. Kamiguti, "Platelets as targets of snake venom metalloproteinases," *Toxicon*, vol. 45, no. 8, pp. 1041–1049, Jun. 2005, doi: 10.1016/j.toxicon.2005.02.026.
- [267] B. Nieswandt, D. Varga-Szabo, and M. Elvers, "Integrins in platelet activation," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 7, no. SUPPL. 1. Blackwell Publishing Ltd, pp. 206–209, 2009, doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03370.x.
- [268] D. Varga-Szabo, I. Pleines, and B. Nieswandt, "Cell adhesion mechanisms in platelets," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 28, no. 3. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 403–413, Mar. 01, 2008, doi: 10.1161/ATVBAHA.107.150474.
- [269] F. H. Epstein, V. Fuster, L. Badimon, J. J. Badimon, and J. H. Chesebro, "The Pathogenesis of Coronary Artery Disease and the Acute Coronary Syndromes," *N. Engl. J. Med.*, vol. 326, no. 5, pp. 310–318, Jan. 1992, doi: 10.1056/nejm199201303260506.
- [270] S. Offermanns, "Activation of platelet function through G protein-coupled receptors," *Circulation Research*, vol. 99, no. 12. Lippincott Williams & Wilkins, pp. 1293–1304, Dec. 08, 2006, doi: 10.1161/01.RES.0000251742.71301.16.
- [271] S. HOURANI and N. CUSACK, "PHARMACOLOGICAL RECEPTORS ON BLOOD-PLATELETS," Sep. 1991.
- [272] G. Davì and C. Patrono, "Platelet Activation and Atherothrombosis," *N. Engl. J. Med.*,

- vol. 357, no. 24, pp. 2482–2494, Dec. 2007, doi: 10.1056/nejmra071014.
- [273] H. Rang, M. Dale, J. Ritter, R. Flower, and G. Henderson, “Farmacologia,” pp. 778–778, 2011.
- [274] J. Rivera, M. L. Lozano, L. Navarro-Núñez, and V. Vicente García, “Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation,” *Haematologica*, vol. 94, no. 5, pp. 700–711, May 01, 2009, doi: 10.3324/haematol.2008.003178.
- [275] S. R. Coughlin, “Protease-activated receptors in vascular biology,” in *Thrombosis and Haemostasis*, 2001, vol. 86, no. 1, pp. 298–307, doi: 10.1055/s-0037-1616227.
- [276] T. Hirata, F. Ushikubi, A. Kakizuka, M. Okutna, and S. Narumiya, “Two thromboxane A2 receptor isoforms in human platelets: Opposite coupling to adenylyl cyclase with different sensitivity to Arg60 to Leu mutation,” *J. Clin. Invest.*, vol. 97, no. 4, pp. 949–956, Feb. 1996, doi: 10.1172/JCI118518.
- [277] D. W. Thomas *et al.*, “Coagulation defects and altered hemodynamic responses in mice lacking receptors for thromboxane A2,” *J. Clin. Invest.*, vol. 102, no. 11, pp. 1994–2001, Dec. 1998, doi: 10.1172/JCI5116.
- [278] P. S. M. Bernardi and H. W. Moreira, “Análise dos traçados de ondas da agregação plaquetária em pacientes com doenças cardiovasculares em uso do ácido acetil salicílico comparados a doadores de sangue,” *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, vol. 26, no. 4, pp. 239–244, Dec. 2004, doi: 10.1590/s1516-84842004000400003.
- [279] J. Yang *et al.*, “Loss of signaling through the G protein, Gz, results in abnormal platelet activation and altered responses to psychoactive drugs,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 18, pp. 9984–9989, Aug. 2000, doi: 10.1073/pnas.180194597.
- [280] G. L. Dale *et al.*, “Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface,” *Nature*, vol. 415, no. 6868, Nature Publishing Group, pp. 175–179, 2002, doi: 10.1038/415175a.
- [281] R. O. Hynes, “Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines,” *Cell*, vol. 110, no. 6, pp. 673–687, Sep. 2002, doi: 10.1016/S0092-8674(02)00971-6.
- [282] E. M. Golebiewska and A. W. Poole, “Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond,” *Blood Rev.*, vol. 29, no. 3, pp. 153–162, May 2015, doi: 10.1016/J.BLRE.2014.10.003.
- [283] B. Papp *et al.*, “Simultaneous presence of two distinct endoplasmic-reticulum-type calcium-pump isoforms in human cells. Characterization by radio-immunoblotting

- and inhibition by 2,5-di-(t-butyl)-1,4-benzohydroquinone," *Biochem. J.*, vol. 288, no. 1, pp. 297–302, Nov. 1992, doi: 10.1042/BJ2880297.
- [284] L. Cavallini, M. Coassin, and A. Alexandre, "Two classes of agonist-sensitive Ca²⁺ stores in platelets, as identified by their differential sensitivity to 2,5-di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone and thapsigargin," *Biochem. J.*, vol. 310, no. 2, pp. 449–452, Sep. 1995, doi: 10.1042/BJ3100449.
- [285] J. J. López, C. Camello-Almaraz, J. A. Pariente, G. M. Salido, and J. A. Rosado, "Ca²⁺ accumulation into acidic organelles mediated by Ca²⁺- and vacuolar H⁺-ATPases in human platelets," *Biochem. J.*, vol. 390, no. Pt 1, p. 243, Aug. 2005, doi: 10.1042/BJ20050168.
- [286] R. Bobe *et al.*, "The rat platelet 97-kDa Ca²⁺-ATPase isoform is the sarcoendoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 3 protein.," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 2, pp. 1417–1424, Jan. 1994, doi: 10.1016/S0021-9258(17)42274-5.
- [287] C. Y. E. FUNG, C. CENDANA, R. W. FARNDALE, and M. P. MAHAUT-SMITH, "Primary and secondary agonists can use P2X1 receptors as a major pathway to increase intracellular Ca²⁺ in the human platelet," *J. Thromb. Haemost.*, vol. 5, no. 5, pp. 910–917, May 2007, doi: 10.1111/J.1538-7836.2007.02525.X.
- [288] M. P. Mahaut-Smith, S. J. Ennion, M. G. Rolf, and R. J. Evans, "ADP is not an agonist at P2X1 receptors: evidence for separate receptors stimulated by ATP and ADP on human platelets," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 131, no. 1, p. 108, 2000, doi: 10.1038/SJ.BJP.0703517.
- [289] M. T. Harper and S. O. Sage, "Src family tyrosine kinases activate thrombin-induced non-capacitative cation entry in human platelets," <http://dx.doi.org/10.3109/09537104.2010.483295>, vol. 21, no. 6, pp. 445–450, Sep. 2010, doi: 10.3109/09537104.2010.483295.
- [290] S. O. Sage, J. E. Merritt, T. J. Hallam, and T. J. Rink, "Receptor-mediated calcium entry in fura-2-loaded human platelets stimulated with ADP and thrombin. Dual-wavelengths studies with Mn²⁺," *Biochem. J.*, vol. 258, no. 3, pp. 923–926, Mar. 1989, Accessed: Aug. 03, 2020. [Online]. Available: </biochemj/article/258/3/923/36392/Receptor-mediated-calcium-entry-in-fura-2-loaded>.
- [291] G. Tolhurst, R. N. Carter, S. Amisten, J. P. Holdich, D. Erlinge, and M. P. Mahaut-Smith,

- “Expression profiling and electrophysiological studies suggest a major role for Orai1 in the store-operated Ca²⁺ influx pathway of platelets and megakaryocytes,” <http://dx.doi.org/10.1080/09537100801935710>, vol. 19, no. 4, pp. 308–313, Jun. 2009, doi: 10.1080/09537100801935710.
- [292] O. Borst *et al.*, “1,25(OH)₂ vitamin D₃-dependent inhibition of platelet Ca²⁺ signaling and thrombus formation in klotho-deficient mice,” *FASEB J.*, vol. 28, no. 5, pp. 2108–2119, May 2014, doi: 10.1096/FJ.13-239277.
- [293] D. Varga-Szabo *et al.*, “The calcium sensor STIM1 is an essential mediator of arterial thrombosis and ischemic brain infarction,” *J. Exp. Med.*, vol. 205, no. 7, pp. 1583–1591, Jul. 2008, doi: 10.1084/JEM.20080302.
- [294] A. Braun *et al.*, “Orai1 (CRACM1) is the platelet SOC channel and essential for pathological thrombus formation,” *Blood*, vol. 113, no. 9, pp. 2056–2063, Feb. 2009, doi: 10.1182/BLOOD-2008-07-171611.
- [295] F. AHMAD *et al.*, “Relative contributions of stromal interaction molecule 1 and CalDAG-GEFI to calcium-dependent platelet activation and thrombosis,” *J. Thromb. Haemost.*, vol. 9, no. 10, pp. 2077–2086, Oct. 2011, doi: 10.1111/J.1538-7836.2011.04474.X.
- [296] W. Bergmeier, C. Weidinger, I. Zee, and S. Feske, “Emerging roles of store-operated Ca²⁺ entry through STIM and ORAI proteins in immunity, hemostasis and cancer,” <https://doi.org/10.4161/chan.24302>, vol. 7, no. 5, pp. 379–391, Sep. 2013, doi: 10.4161/CHAN.24302.
- [297] E. V. Paez Espinosa, J. P. Murad, H. J. Ting, and F. T. Khasawneh, “Mouse transient receptor potential channel 6: Role in hemostasis and thrombogenesis,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 417, no. 2, pp. 853–856, Jan. 2012, doi: 10.1016/J.BBRC.2011.12.058.
- [298] G. RAMANATHAN *et al.*, “Defective diacylglycerol-induced Ca²⁺ entry but normal agonist-induced activation responses in TRPC6-deficient mouse platelets,” *J. Thromb. Haemost.*, vol. 10, no. 3, pp. 419–429, Mar. 2012, doi: 10.1111/J.1538-7836.2011.04596.X.
- [299] L. Albarran *et al.*, “TRPC6 participates in the regulation of cytosolic basal calcium concentration in murine resting platelets,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1843, no. 4, pp. 789–796, Apr. 2014, doi: 10.1016/J.BBAMCR.2014.01.014.

- [300] H. Sung *et al.*, “Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries,” *CA. Cancer J. Clin.*, Feb. 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [301] F. Bray *et al.*, “Cancer Incidence in Five Continents: Inclusion criteria, highlights from Volume X and the global status of cancer registration,” *Int. J. Cancer*, vol. 137, no. 9, pp. 2060–2071, Nov. 2015, doi: 10.1002/ijc.29670.
- [302] J. Russo, R. Moral, G. A. Balogh, D. Mailo, and I. H. Russo, “The protective role of pregnancy in breast cancer,” *Breast Cancer Research*, vol. 7, no. 3. BioMed Central, pp. 131–142, May 07, 2005, doi: 10.1186/bcr1029.
- [303] S. K. Siwko, J. Dong, M. T. Lewis, H. Liu, S. G. Hilsenbeck, and Y. Li, “Evidence That an Early Pregnancy Causes a Persistent Decrease in the Number of Functional Mammary Epithelial Stem Cells-Implications for Pregnancy-Induced Protection Against Breast Cancer,” *Stem Cells*, vol. 26, no. 12, pp. 3205–3209, Dec. 2008, doi: 10.1634/stemcells.2008-0103.
- [304] L. Hilakivi-Clarke, S. De Assis, and A. Warri, “Exposures to synthetic estrogens at different times during the life, and their effect on breast cancer risk,” *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, vol. 18, no. 1. J Mammary Gland Biol Neoplasia, pp. 25–42, Mar. 2013, doi: 10.1007/s10911-013-9274-8.
- [305] M. Busund, N. S. Bugge, T. Braaten, M. Waaseth, C. Rylander, and E. Lund, “Progestin-only and combined oral contraceptives and receptor-defined premenopausal breast cancer risk: The Norwegian Women and Cancer Study,” *Int. J. Cancer*, vol. 142, no. 11, pp. 2293–2302, Jun. 2018, doi: 10.1002/ijc.31266.
- [306] G. Danaei, S. Vander Hoorn, A. D. Lopez, C. J. L. Murray, and M. Ezzati, “Causes of cancer in the world: Comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors,” *Lancet*, vol. 366, no. 9499, pp. 1784–1793, Nov. 2005, doi: 10.1016/S0140-6736(05)67725-2.
- [307] S. Shiovitz and L. A. Korde, “Genetics of breast cancer: A topic in evolution,” *Ann. Oncol.*, vol. 26, no. 7, pp. 1291–1299, Jul. 2015, doi: 10.1093/annonc/mdv022.
- [308] K. B. Kuchenbaecker *et al.*, “Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers,” *JAMA - J. Am. Med. Assoc.*, vol. 317, no. 23, pp. 2402–2416, Jun. 2017, doi: 10.1001/jama.2017.7112.
- [309] A. Taylor *et al.*, “Consensus for genes to be included on cancer panel tests offered by

- UK genetics services: guidelines of the UK Cancer Genetics Group," *J. Med. Genet.*, vol. 55, no. 6, pp. 372–377, Jun. 2018, doi: 10.1136/jmedgenet-2017-105188.
- [310] G. K. Malhotra, X. Zhao, H. Band, and V. Band, "Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers," *Cancer Biology and Therapy*, vol. 10, no. 10. *Cancer Biol Ther*, pp. 955–960, Nov. 15, 2010, doi: 10.4161/cbt.10.10.13879.
- [311] J. D. C. Hon *et al.*, "Breast cancer molecular subtypes: From TNBC to QNBC," *American Journal of Cancer Research*, vol. 6, no. 9. E-Century Publishing Corporation, pp. 1864–1872, 2016, Accessed: Apr. 24, 2021. [Online]. Available: www.ajcr.us/.
- [312] C. M. Perou *et al.*, "Molecular portraits of human breast tumours," *Nature*, vol. 406, no. 6797, pp. 747–752, Aug. 2000, doi: 10.1038/35021093.
- [313] K. D. Voduc, M. C. U. Cheang, S. Tyldesley, K. Gelmon, T. O. Nielsen, and H. Kennecke, "Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse," *J. Clin. Oncol.*, vol. 28, no. 10, pp. 1684–1691, Apr. 2010, doi: 10.1200/JCO.2009.24.9284.
- [314] P. S. Bernard *et al.*, "Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes," *J. Clin. Oncol.*, vol. 27, no. 8, pp. 1160–1167, Mar. 2009, doi: 10.1200/JCO.2008.18.1370.
- [315] S. Badve *et al.*, "Basal-like and triple-negative breast cancers: A critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists," *Modern Pathology*, vol. 24, no. 2. *Mod Pathol*, pp. 157–167, Feb. 2011, doi: 10.1038/modpathol.2010.200.
- [316] C. L. Chaffer and R. A. Weinberg, "A perspective on cancer cell metastasis," *Science*, vol. 331, no. 6024. American Association for the Advancement of Science, pp. 1559–1564, Mar. 25, 2011, doi: 10.1126/science.1203543.
- [317] P. S. Steeg, "Tumor metastasis: Mechanistic insights and clinical challenges," *Nature Medicine*, vol. 12, no. 8. *Nat Med*, pp. 895–904, Aug. 2006, doi: 10.1038/nm1469.
- [318] "Cancer Statistics Review, 1975-2018 - SEER Statistics."
https://seer.cancer.gov/csr/1975_2018/ (accessed Apr. 24, 2021).
- [319] O. C. Buonomo *et al.*, "New insights into the metastatic behavior after breast cancer surgery, according to well-established clinicopathological variables and molecular subtypes," *PLoS One*, vol. 12, no. 9, Sep. 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0184680.
- [320] M. J. Berridge, P. Lipp, and M. D. Bootman, *The versatility and universality of calcium signalling*, vol. 1, no. 1. European Association for Cardio-Thoracic Surgery, 2000, pp.

- 11–21.
- [321] W. H. Frishman, “Calcium Channel Blockers: Differences Between Subclasses,” *Am. J. Cardiovasc. Drugs*, vol. 7, no. Suppl 1, p. 17–23, Dec. 2007, doi: 10.2165/00129784-200707001-00003.
- [322] N. Weiss and G. W. Zamponi, “T-type calcium channels: From molecule to therapeutic opportunities,” *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 108. Elsevier Ltd, pp. 34–39, Mar. 01, 2019, doi: 10.1016/j.biocel.2019.01.008.
- [323] S. Marchi, C. Giorgi, L. Galluzzi, and P. Pinton, “Ca²⁺ Fluxes and Cancer,” *Molecular Cell*, vol. 78, no. 6. Cell Press, pp. 1055–1069, Jun. 18, 2020, doi: 10.1016/j.molcel.2020.04.017.
- [324] B. M. Cross, G. E. Breitwieser, T. A. Reinhardt, and R. Rao, “Cellular calcium dynamics in lactation and breast cancer: From physiology to pathology,” *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, vol. 306, no. 6. American Physiological Society, pp. 515–526, Mar. 15, 2014, doi: 10.1152/ajpcell.00330.2013.
- [325] H. M. Faddy *et al.*, “Localization of plasma membrane and secretory calcium pumps in the mammary gland,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 369, no. 3, pp. 977–981, May 2008, doi: 10.1016/j.bbrc.2008.03.003.
- [326] L. Nie, Y. Oishi, I. Doi, H. Shibata, and I. Kojima, “Inhibition of proliferation of MCF-7 breast cancer cells by a blocker of Ca²⁺-permeable channel,” *Cell Calcium*, vol. 22, no. 2, pp. 75–82, Aug. 1997, doi: 10.1016/S0143-4160(97)90107-X.
- [327] I. N. Sergeev and W. B. Rhoten, “Regulation of intracellular calcium in human breast cancer cells,” *Endocrine*, vol. 9, no. 3, pp. 321–327, 1998, doi: 10.1385/ENDO:9:3:321.
- [328] S. Greco, M. G. Elia, A. Muscella, C. Storelli, and S. Marsigliante, “AT1 angiotensin II receptor mediates intracellular calcium mobilization in normal and cancerous breast cells in primary culture,” *Cell Calcium*, vol. 32, no. 1, pp. 1–10, Jul. 2002, doi: 10.1016/S0143-4160(02)00077-5.
- [329] D. McAndrew *et al.*, “ORAI1-mediated calcium influx in lactation and in breast cancer,” *Mol. Cancer Ther.*, vol. 10, no. 3, pp. 448–460, Mar. 2011, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0923.
- [330] I. Jardin *et al.*, “Trpc6 channels are required for proliferation, migration and invasion of breast cancer cell lines by modulation of orai1 and orai3 surface exposure,” *Cancers (Basel)*, vol. 10, no. 9, p. 331, Sep. 2018, doi: 10.3390/cancers10090331.

- [331] R. K. Motiani, I. F. Abdullaev, and M. Trebak, "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," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 25, pp. 19173–19183, Jun. 2010, doi: 10.1074/jbc.M110.102582.
- [332] M. Faouzi *et al.*, "ORAI3 silencing alters cell proliferation and cell cycle progression via c-myc pathway in breast cancer cells," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1833, no. 3, pp. 752–760, Mar. 2013, doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.12.009.
- [333] I. Azimi *et al.*, "TRPC1 is a differential regulator of hypoxia-mediated events and Akt signalling in PTEN-deficient breast cancer cells," *J. Cell Sci.*, vol. 130, no. 14, pp. 2292–2305, Jul. 2017, doi: 10.1242/jcs.196659.
- [334] D. Babaer *et al.*, "High salt induces P-glycoprotein mediated treatment resistance in breast cancer cells through store operated calcium influx," *Oncotarget*, vol. 9, no. 38, pp. 25193–25205, May 2018, doi: 10.18632/oncotarget.25391.
- [335] H. M. Abdallah, A. M. Al-Abd, R. S. El-Dine, and A. M. El-Halawany, "P-glycoprotein inhibitors of natural origin as potential tumor chemo-sensitizers: A review," *Journal of Advanced Research*, vol. 6, no. 1. Elsevier, pp. 45–62, Jan. 01, 2015, doi: 10.1016/j.jare.2014.11.008.
- [336] M. Badaoui *et al.*, "Collagen type 1 promotes survival of human breast cancer cells by overexpressing Kv10.1 potassium and Orai1 calcium channels through DDR1-dependent pathway," *Oncotarget*, vol. 9, no. 37, pp. 24653–24671, May 2018, doi: 10.18632/oncotarget.19065.
- [337] J. Hasna *et al.*, "Orai3 calcium channel and resistance to chemotherapy in breast cancer cells: The p53 connection," *Cell Death Differ.*, vol. 25, no. 4, pp. 691–705, Mar. 2018, doi: 10.1038/s41418-017-0007-1.
- [338] N. Gueder *et al.*, "sp2-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," *J. Cell. Physiol.*, vol. 232, no. 12, pp. 3631–3640, Dec. 2017, doi: 10.1002/jcp.25832.
- [339] S. Yang, J. J. Zhang, and X. Y. Huang, "Orai1 and STIM1 Are Critical for Breast Tumor Cell Migration and Metastasis," *Cancer Cell*, vol. 15, no. 2, pp. 124–134, Feb. 2009, doi: 10.1016/j.ccr.2008.12.019.
- [340] C. Yu *et al.*, "Downregulation of ACE2/Ang-(1-7)/Mas axis promotes breast cancer

- metastasis by enhancing store-operated calcium entry," *Cancer Lett.*, vol. 376, no. 2, pp. 268–277, Jul. 2016, doi: 10.1016/j.canlet.2016.04.006.
- [341] J. Hu *et al.*, "Downregulation of transcription factor Oct4 induces an epithelial-to-mesenchymal transition via enhancement of Ca²⁺ influx in breast cancer cells," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 411, no. 4, pp. 786–791, Aug. 2011, doi: 10.1016/j.bbrc.2011.07.025.
- [342] S. Zhang *et al.*, "STIM1 and STIM2 differently regulate endogenous Ca²⁺ entry and promote TGF- β -induced EMT in breast cancer cells," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 488, no. 1, pp. 74–80, Jun. 2017, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.05.009.
- [343] X. Liu *et al.*, "Orai1 is critical for Notch-driven aggressiveness under hypoxic conditions in triple-negative breast cancers," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1864, no. 4, pp. 975–986, Apr. 2018, doi: 10.1016/j.bbadis.2018.01.003.
- [344] E. Kaemmerer, D. Turner, A. A. Peters, S. J. Roberts-Thomson, and G. R. Monteith, "An automated epifluorescence microscopy imaging assay for the identification of phospho-AKT level modulators in breast cancer cells," *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, vol. 92, pp. 13–19, Jul. 2018, doi: 10.1016/j.vascn.2018.02.005.
- [345] A. Schaar, P. Sukumaran, Y. Sun, A. Dhasarathy, and B. B. Singh, "TRPC1-STIM1 activation modulates transforming growth factor β -induced epithelial-to-mesenchymal transition," *Oncotarget*, vol. 7, no. 49, pp. 80554–80567, Oct. 2016, doi: 10.18632/oncotarget.12895.
- [346] S. Tang *et al.*, "Mitochondrial Ca²⁺ uniporter is critical for store-operated Ca²⁺ entry-dependent breast cancer cell migration," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 458, no. 1, pp. 186–193, Feb. 2015, doi: 10.1016/j.bbrc.2015.01.092.
- [347] N. Emeriau, M. de Clippele, P. Gailly, and N. Tajeddine, "Store operated calcium entry is altered by the inhibition of receptors tyrosine kinase," *Oncotarget*, vol. 9, no. 22, pp. 16059–16073, Mar. 2018, doi: 10.18632/oncotarget.24685.
- [348] I. Azimi *et al.*, "Pharmacological inhibition of store-operated calcium entry in MDA-MB-468 basal A breast cancer cells: consequences on calcium signalling, cell migration and proliferation," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 75, no. 24, pp. 4525–4537, Dec. 2018, doi: 10.1007/s00018-018-2904-y.
- [349] S. Chakraborty *et al.*, "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," *Front. Pharmacol.*, vol. 7, no. MAY, p. 114, May 2016, doi: 10.3389/fphar.2016.00114.
- [350] C. Weidinger, P. J. Shaw, and S. Feske, "STIM1 and STIM2-mediated Ca²⁺ influx regulates antitumour immunity by CD8⁺ T cells," *EMBO Mol. Med.*, vol. 5, no. 9, pp. 1311–1321, Sep. 2013, doi: 10.1002/emmm.201302989.
- [351] R. Gualdani, M. de Clippele, I. Ratbi, P. Gailly, and N. Tajeddine, "Store-operated calcium entry contributes to cisplatin-induced cell death in non-small cell lung carcinoma," *Cancers (Basel)*, vol. 11, no. 3, p. 430, Mar. 2019, doi: 10.3390/cancers11030430.
- [352] X. Zhou *et al.*, "A calcium optimum for cytotoxic T lymphocyte and natural killer cell cytotoxicity," *J. Physiol.*, vol. 596, no. 14, pp. 2681–2698, Jul. 2018, doi: 10.1113/JP274964.
- [353] "Isolation and Characterization of a Spontaneously Immortalized Human Breast Epithelial Cell Line, MCF-10 - PubMed." <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1975513/> (accessed Jun. 10, 2020).
- [354] "Human Cell Line From a Pleural Effusion Derived From a Breast Carcinoma2 | JNCI: Journal of the National Cancer Institute | Oxford Academic." <https://academic.oup.com/jnci/article-abstract/51/5/1409/962551?redirectedFrom=PDF> (accessed Jun. 10, 2020).
- [355] I. Keydar *et al.*, "Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin," *Eur. J. Cancer*, vol. 15, no. 5, pp. 659–670, May 1979, doi: 10.1016/0014-2964(79)90139-7.
- [356] S. Yu, T. Kim, K. H. Yoo, and K. Kang, "The T47D cell line is an ideal experimental model to elucidate the progesterone-specific effects of a luminal A subtype of breast cancer," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 486, no. 3, pp. 752–758, May 2017, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.03.114.
- [357] "Cultivation of Human Breast Carcinomas - PubMed." <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13611537/> (accessed Jun. 15, 2020).
- [358] E. L. Huguet, J. A. McMahon, A. P. McMahon, R. Bicknell, and A. L. Harris, "Differential Expression of Human Wnt Genes 2, 3, 4, and 7B in Human Breast Cell Lines and Normal and Disease States of Human Breast Tissue," *Cancer Res.*, vol. 54, no. 10, pp. 2615–2621, May 1994.

- [359] R. Cailleau, M. Olive, and Q. V. J. Cruciger, "LONG-TERM HUMAN BREAST CARCINOMA CELL LINES OF METASTATIC ORIGIN: PRELIMINARY CHARACTERIZATION," 1978.
- [360] "Breast Tumor Cell Lines From Pleural Effusions - PubMed."
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4412247/> (accessed Jun. 10, 2020).
- [361] A. J. Hackett *et al.*, "Two syngeneic cell lines from human breast tissue: The aneuploid mammary epithelial (Hs578T) and the diploid myoepithelial (Hs578Bst) cell lines," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 58, no. 6, pp. 1795–1806, Jun. 1977, doi: 10.1093/jnci/58.6.1795.
- [362] H. Byers, T. Etoh, J. Doherty, ... A. S.-T. A. journal, and undefined 1991, "Cell migration and actin organization in cultured human primary, recurrent cutaneous and metastatic melanoma. Time-lapse and image analysis.," *ncbi.nlm.nih.gov*, Accessed: Jun. 22, 2021. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1886079/>.
- [363] C. C. Cunningham *et al.*, "Actin-binding protein requirement for cortical stability and efficient locomotion," *Science (80-.)*, vol. 255, no. 5042, pp. 325–327, Jan. 1992, doi: 10.1126/science.1549777.
- [364] T. K. Kim and J. H. Eberwine, "Mammalian cell transfection: The present and the future," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 397, no. 8, pp. 3173–3178, Aug. 2010, doi: 10.1007/s00216-010-3821-6.
- [365] J. J. López, G. M. Salido, J. A. Pariente, and J. A. Rosado, "Interaction of STIM1 with endogenously expressed human canonical TRP1 upon depletion of intracellular Ca²⁺ stores," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 38, pp. 28254–28264, Sep. 2006, doi: 10.1074/jbc.M604272200.
- [366] P. K. Smith *et al.*, "Measurement of protein using bicinchoninic acid," *Anal. Biochem.*, vol. 150, no. 1, pp. 76–85, 1985, doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.
- [367] H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon, "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 76, no. 9, pp. 4350–4354, 1979, doi: 10.1073/pnas.76.9.4350.
- [368] G. Grynkiewicz, M. Poenie, and R. Y. Tsien, "A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties," *Journal of Biological Chemistry*, Mar. 01,

1985.
[https://www.jbc.org/content/260/6/3440.short?rss=1&ssource=mfc&utm_source=feedburner&utm_medium=feed&utm_campaign=Feed%253A+JBiolChemMost-citedFull-textArticles+\(J+Biol+Chem%253A+Most-Cited+Full-Text+Articles\)](https://www.jbc.org/content/260/6/3440.short?rss=1&ssource=mfc&utm_source=feedburner&utm_medium=feed&utm_campaign=Feed%253A+JBiolChemMost-citedFull-textArticles+(J+Biol+Chem%253A+Most-Cited+Full-Text+Articles)) (accessed Aug. 03, 2020).
- [369] R. M. Paredes, J. C. Etzler, L. T. Watts, W. Zheng, and J. D. Lechleiter, "Chemical calcium indicators," *Methods*, vol. 46, no. 3, pp. 143–151, Nov. 2008, doi: 10.1016/j.ymeth.2008.09.025.
- [370] C. Vorndran, A. Minta, and M. Poenie, "New fluorescent calcium indicators designed for cytosolic retention or measuring calcium near membranes," *Biophys. J.*, vol. 69, no. 5, pp. 2112–2124, 1995, doi: 10.1016/S0006-3495(95)80082-2.
- [371] Y. Zhao *et al.*, "An expanded palette of genetically encoded Ca²⁺ indicators," *Science* (80-.), vol. 333, no. 6051, pp. 1888–1891, Sep. 2011, doi: 10.1126/science.1208592.
- [372] J. L. Dynes, A. Amcheslavsky, and M. D. Cahalan, "Genetically targeted single-channel optical recording reveals multiple Orai1 gating states and oscillations in calcium influx," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 113, no. 2, pp. 440–445, Jan. 2016, doi: 10.1073/pnas.1523410113.
- [373] J. Suzuki, K. Kanemaru, K. Ishii, M. Ohkura, Y. Okubo, and M. Iino, "Imaging intraorganellar Ca²⁺ at subcellular resolution using CEPIA," *Nat. Commun.*, vol. 5, no. 1, pp. 1–13, Jun. 2014, doi: 10.1038/ncomms5153.
- [374] C. C. Liang, A. Y. Park, and J. L. Guan, "In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro," *Nat. Protoc.*, vol. 2, no. 2, pp. 329–333, Mar. 2007, doi: 10.1038/nprot.2007.30.
- [375] D. Le Roith and M. Karas, "Apoptosis," in *Encyclopedia of Hormones*, Elsevier, 2003, pp. 153–156.
- [376] S. R. D'Mello, "Programmed Cell Death," in *Medical Cell Biology: Third Edition*, Elsevier Inc., 2007, pp. 291–307.
- [377] J. Li and J. Yuan, "Caspases in apoptosis and beyond," *Oncogene*, vol. 27, no. 48. Nature Publishing Group, pp. 6194–6206, Oct. 20, 2008, doi: 10.1038/onc.2008.297.
- [378] A. Fribley, K. Zhang, and R. J. Kaufman, "Regulation of apoptosis by the unfolded protein response.," *Methods Mol. Biol.*, vol. 559, pp. 191–204, 2009, doi: 10.1007/978-1-60327-017-5_14.

- [379] D. V. Iwamoto *et al.*, “Structural basis of the filamin A actin-binding domain interaction with F-actin,” *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2018 2510, vol. 25, no. 10, pp. 918–927, Sep. 2018, doi: 10.1038/s41594-018-0128-3.
- [380] A. Van der Flier and A. Sonnenberg, “Structural and functional aspects of filamins,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1538, no. 2–3, pp. 99–117, Apr. 2001, doi: 10.1016/S0167-4889(01)00072-6.
- [381] J. P. Rosa, H. Raslova, and M. Bryckaert, “Filamin A: key actor in platelet biology,” *Blood*, vol. 134, no. 16, pp. 1279–1288, Oct. 2019, doi: 10.1182/BLOOD.2019000014.
- [382] D. Jay, E. J. García, and M. de la Luz Ibarra, “In situ determination of a PKA phosphorylation site in the C-terminal region of filamin,” *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 260, no. 1, pp. 49–53, May 2004, doi: 10.1023/B:MCBI.0000026052.76418.55.
- [383] H. Kim and C. A. McCulloch, “Filamin A mediates interactions between cytoskeletal proteins that control cell adhesion,” *FEBS Lett.*, vol. 585, no. 1, pp. 18–22, Jan. 2011, doi: 10.1016/J.FEBSLET.2010.11.033.
- [384] C. Galán, N. Dionisio, T. Smani, G. M. Salido, and J. A. Rosado, “The cytoskeleton plays a modulatory role in the association between STIM1 and the Ca²⁺ channel subunits Orai1 and TRPC1,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 82, no. 4, pp. 400–410, Aug. 2011, doi: 10.1016/J.BCP.2011.05.017.
- [385] P. C. Redondo, A. G. S. Harper, S. O. Sage, and J. A. Rosado, “Dual role of tubulin-cytoskeleton in store-operated calcium entry in human platelets,” *Cell. Signal.*, vol. 19, no. 10, pp. 2147–2154, Oct. 2007, doi: 10.1016/J.CELLSIG.2007.06.011.
- [386] J. T. Smyth, W. I. DeHaven, G. S. Bird, and J. W. Putney, “Role of the microtubule cytoskeleton in the function of the store-operated Ca²⁺ channel activator STIM1,” *J. Cell Sci.*, vol. 120, no. 21, pp. 3762–3771, Nov. 2007, doi: 10.1242/JCS.015735.
- [387] R. M. Savoy and P. M. Ghosh, “The dual role of filamin A in cancer: can’t live with (too much of) it, can’t live without it,” *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 20, no. 6, pp. R341–R356, Dec. 2013, doi: 10.1530/ERC-13-0364.
- [388] Z. Ji *et al.*, “Silencing Filamin A Inhibits the Invasion and Migration of Breast Cancer Cells by Up-regulating 14-3-3 σ ,” *Curr. Med. Sci.* 2018 383, vol. 38, no. 3, pp. 461–466, Jun. 2018, doi: 10.1007/S11596-018-1901-6.
- [389] P. Zhao, W. Ma, Z. Hu, L. Zang, Z. Tian, and K. Zhang, “Filamin A (FLNA) modulates chemosensitivity to docetaxel in triple-negative breast cancer through the MAPK/ERK

- pathway," *Tumor Biol.*, doi: 10.1007/s13277-015-4357-3.
- [390] Y. Guo *et al.*, "Filamin A inhibits tumor progression through regulating BRCA1 expression in human breast cancer," *Oncol. Lett.*, vol. 16, no. 5, pp. 6261–6266, Nov. 2018, doi: 10.3892/OL.2018.9473.
- [391] F. J. Sulzmaier, C. Jean, and D. D. Schlaepfer, "FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications," *Nat. Rev. Cancer 2014 149*, vol. 14, no. 9, pp. 598–610, Aug. 2014, doi: 10.1038/nrc3792.
- [392] R. Diez-Bello, I. Jardin, G. M. Salido, and J. A. Rosado, "Orai1 and Orai2 mediate store-operated calcium entry that regulates HL60 cell migration and FAK phosphorylation," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1864, no. 6, pp. 1064–1070, Jun. 2017, doi: 10.1016/J.BBAMCR.2016.11.014.
- [393] A. Guilbert *et al.*, "Expression of TRPC6 channels in human epithelial breast cancer cells," *BMC Cancer 2008 81*, vol. 8, no. 1, pp. 1–11, May 2008, doi: 10.1186/1471-2407-8-125.
- [394] R. K.-T. J. of clinical investigation and undefined 2002, "Orchestrating the unfolded protein response in health and disease," *Am Soc Clin Investig*, Accessed: Jul. 06, 2021. [Online]. Available: <https://www.jci.org/articles/view/16886>.
- [395] J. D. Malhotra and R. J. Kaufman, "The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response," *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 18, no. 6, pp. 716–731, Dec. 2007, doi: 10.1016/J.SEMCDB.2007.09.003.
- [396] R. V. Rao *et al.*, "Coupling Endoplasmic Reticulum Stress to the Cell Death Program," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 36, pp. 33869–33874, Sep. 2001, doi: 10.1074/JBC.M102225200.
- [397] Y. C. Tsai and A. M. Weissman, "The Unfolded Protein Response, Degradation from the Endoplasmic Reticulum, and Cancer:," <http://dx.doi.org/10.1177/1947601910383011>, vol. 1, no. 7, pp. 764–778, Sep. 2010, doi: 10.1177/1947601910383011.
- [398] R. Cunard and K. Sharma, "The endoplasmic reticulum stress response and diabetic kidney disease," <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00021.2011>, vol. 300, no. 5, pp. 1054–1061, May 2011, doi: 10.1152/AJPRENAL.00021.2011.
- [399] T. Minamino, I. Komuro, and M. Kitakaze, "Endoplasmic Reticulum Stress As a Therapeutic Target in Cardiovascular Disease," *Circ. Res.*, vol. 107, no. 9, pp. 1071–

- 1082, Oct. 2010, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.227819.
- [400] S. Matus, L. H. Glimcher, and C. Hetz, "Protein folding stress in neurodegenerative diseases: a glimpse into the ER," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 23, no. 2, pp. 239–252, Apr. 2011, doi: 10.1016/J.CEB.2011.01.003.
- [401] T. Adomavicius *et al.*, "The structural basis of translational control by eIF2 phosphorylation," *Nat. Commun.* 2019 101, vol. 10, no. 1, pp. 1–10, May 2019, doi: 10.1038/s41467-019-10167-3.
- [402] R. E. Yoast, S. M. Emrich, and M. Trebak, "The anatomy of native CRAC channel(s)," *Curr. Opin. Physiol.*, vol. 17, pp. 89–95, Oct. 2020, doi: 10.1016/J.COPHYS.2020.07.012.