



TESIS DOCTORAL

**IMPLICACIONES FUNCIONALES DE LA
FOSFORILACIÓN DE STIM1 MEDIADA POR ERK1/2:
CONTROL DE RUTAS DE SEÑALIZACIÓN Y
MIGRACIÓN CELULAR**

PATRICIA TOMÁS MARTÍN

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética

2016



TESIS DOCTORAL

**IMPLICACIONES FUNCIONALES DE LA FOSFORILACIÓN DE
STIM1 MEDIADA POR ERK1/2: CONTROL DE RUTAS DE
SEÑALIZACIÓN Y MIGRACIÓN CELULAR**

PATRICIA TOMÁS MARTÍN

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética

Conformidad de los Directores:

Fdo.: Dr. Fco. Javier Martín Romero

Fdo.: Dra. Eulalia Pozo Guisado

2016



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética

Área de Bioquímica y Biología Molecular

Facultad de Ciencias

06006 BADAJOZ

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

CERTIFICAN que:

La presente Tesis Doctoral titulada: ***“Implicaciones funcionales de la fosforilación de STIM1 mediada por ERK1/2: control de rutas de señalización y migración celular.”*** presentada por Doña Patricia Tomás Martín, para optar al título de doctora ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética de la Universidad de Extremadura.

Que revisada la memoria presentada, los Directores del trabajo consideran que posee las condiciones requeridas para un trabajo de Tesis Doctoral. Por todo ello,

AUTORIZAN:

Su presentación y defensa pública frente al tribunal designado al efecto y para que así conste, expedimos y firmamos la presente certificación en Badajoz, a 14 de Julio de 2016.

Fdo.: Dr. Fco. Javier Martín Romero

Fdo.: Dra. Eulalia Pozo Guisado

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

Pozo-Guisado, Eulalia; Casa-Rua, Vanessa; **Tomas-Martin, Patricia**; Lopez-Guerrero, Aida M.; Alvarez-Barrientos, Alberto; y Martin-Romero, Francisco Javier. ***Phosphorylation of STIM1 at ERK1/2 target sites regulates the interaccion with the microtubule plus-end binding protein EB1.*** J Cell Sci 2013; 126 (14): 3170-3180.

Casa-Rua, Vanessa; **Tomas-Martin, Patricia**; Lopez-Guerrero, Aida M.; Alvarez, Ignacio S., Pozo-Guisado, Eulalia y Martin-Romero, Francisco Javier. ***STIM1 phosphorylation triggered by epidermal growth factor mediates cell migration.*** Biochim Biophys Acta- Mol. Cell Res. 2015; 1853 (1): 233-243..

Tomas-Martin, Patricia; Lopez-Guerrero, Aida M.; Casa-Rua, Vanessa; Pozo-Guisado, Eulalia y Martin-Romero, Francisco Javier. ***Phospho-STIM1 is a downstream effector that mediates the signaling triggered by IGF-1 in HEK293 cells.*** Cell Signalling; 2015 (27): 545-554.

Congresos Nacionales:

Patricia Tomás-Martín, Francisco Javier Martín-Romero y Eulalia Pozo-Guisado. ***La fosforilación reversible de STIM1 en sitios diana de ERK1/2 modula su función y localización en células HEK293.*** XXXIV Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Barcelona. 2011.

Patricia Tomás-Martín, Francisco Javier Martín-Romero y Eulalia Pozo-Guisado. ***La migración de mioblastos inducida por IGF-1 está mediada por la fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2.*** XXXVI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Madrid. 2013.

Eulalia Pozo-Guisado, Vanessa Casas-Rua, **Patricia Tomás-Martín**, Aida López-Guerrero, Alberto Álvarez-Barrientos, Francisco Javier Martín-Romero. ***La fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2 controla su asociación con el regulador de microtúbulos EB1.*** XXXVI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Madrid. 2013.

Congresos Internacionales:

Patricia Tomás-Martín, Francisco Javier Martín-Romero y Eulalia Pozo-Guisado. ***Effect of STIM1 phosphorylation at ERK1/2 target sites on myoblast migration and myotube formation.*** 35th SEBBM, 22nd IUBBM & 37th FEBS meeting. Seville. 2012.

Patricia Tomás-Martín, Francisco Javier Martín-Romero y Eulalia Pozo-Guisado. ***Phospho-STIM1 is a downstream effector of IGF-1 and mediates calcium-dependent NFAT signaling.*** Calcium Signalling: The Next Generation. Biochemical Society. London.2014.

Patricia Tomás-Martín, Aida M. López-Guerrero, Francisco Javier Martín-Romero y Eulalia Pozo-Guisado. ***Phospho-STIM1 localizes in cortactin-rich domains and controls membrane ruffling dynamics.*** European cytoskeletal forum - Cell adhesion and Migration. Biochemical Society. Cambridge. 2016.

Este trabajo ha sido financiado con Proyectos del Ministerio de Economía y competitividad (BFU2011-22798, BFU2014-52401-P) y de la Junta de Extremadura-Fondo Social Europeo (PDT08A027). D^a Patricia Tomás Martín ha sido beneficiaria de una Beca de Colaboración del Ministerio de Educación, una ayuda de Iniciación en I+D+I de la Universidad de Extremadura (código A-02 de 2010), y una Beca Predoctoral de la Junta de Extremadura (código PD10081).



A Elena

Quiero mostrar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han hecho posible la realización de este trabajo.

En primer lugar quiero agradecer a los Dres. Fco. Javier Martín y Eulalia Pozo su apoyo y su cercanía. Al Dr. Fco. Javier Martín por su dedicación y por la confianza puesta en mí desde el principio. A la Dra. Eulalia Pozo por tantas horas de formación y por su infinita paciencia.

A todos los integrantes del grupo REDES por hacer de este trabajo casi un hobby, en especial a los predoc: Vanessa, Aida y Carlos. Porque trabajando en equipo todo es mucho más fácil.

A mis compañeros del área de Bioquímica y Biología Molecular, por hacer más llevaderas las interminables horas de trabajo.

A Vanessa y a Luis por ser parte imprescindible de este trabajo. A todos aquellos que en algún momento habéis sacado un hueco para llevarme al lab en fechas y horarios impensables sin pedir nada a cambio y a todos los que habeis colaborado en la edición de este trabajo ayudándome con las "nuevas" tecnologías.

A mi familia montijana, por hacerme sentir cerca de mi casa y cuidarme tanto. Gracias por todo vuestro apoyo y vuestro cariño.

A mis amigas, por escucharme, por entenderme, por aguantarme. Por apoyarme en todo momento y animarme a seguir, por creer en mí.

A mi familia, por su apoyo incondicional.

INDICE

ABREVIATURAS

<i>INTRODUCCIÓN</i>	1
1. ION CALCIO COMO SEÑALIZADOR INTRACELULAR	1
2. ENTRADA DE CALCIO OPERADA POR DEPÓSITOS INTRACELULARES (SOCE). 4	
3. STIM1	6
3.1. STIM1 es un sensor de la concentración de Ca ²⁺ intraluminal de RE.....	6
3.2. Dominios funcionales de la proteína STIM1.	8
3.3. Localización celular de STIM1.....	9
3.4. Activación de STIM1.....	10
4. ORAI1 Y TRPCs COMO CANALES SOC.....	12
4.1. Dominios de ORAI1.....	13
4.2. Mecanismo de activación y estequiometría del complejo STIM1-ORAI1.	14
4.3. Inactivación del complejo STIM1-ORAI1.....	15
5. REGULACIÓN DE SOCE POR FOSFORILACIÓN DE STIM1.....	16
5.1. Sitios de fosforilación de STIM1.....	16
5.2. STIM1 es una proteína de interacción con microtúbulos.....	18
6. STIM1 Y MIGRACIÓN CELULAR.....	19
6.1. Polaridad y migración celular.	20
6.2. Implicación de SOCE en la migración celular.....	20
7. EL Ca ²⁺ REGULA LA FORMACIÓN DE ADHESIONES FOCALES.	21
8. CORTACTINA Y MIGRACIÓN CELULAR.....	24
8.1. Estructura molecular de CTTN.....	24
8.2. Modificaciones postraduccionales de CTTN.....	25
8.3. Implicaciones fisiológicas de CTTN.....	26
8.4. CTTN, migración y tumorigénesis.....	27
8.5. CTTN y la señalización mediada por Ca ²⁺	27
<i>OBJETIVOS</i>	33
<i>RESULTADOS</i>	36
1. LA FOSFORILACIÓN DE STIM1 MODULA SOCE.....	36
1.1. Medida de la entrada de calcio operada por depósitos intracelulares (SOCE).....	36
2. MULTIMERIZACIÓN DE STIM1 EN RESPUESTA AL VACIADO DE DEPÓSITOS INTRACELULARES DE Ca ²⁺	39

2.1.	Fenotipo de la multimerización de STIM1.....	39
2.2.	Estudio de la cinética de multimerización de STIM1.....	40
2.3.	Cinética y reversibilidad de la multimerización de STIM1.....	42
2.4.	Fosforilación reversible de STIM1 en sitios dianas de ERK1/2.....	46
3.	ESTUDIO DE LA RELOCALIZACIÓN DE STIM1 MEDIANTE MICROSCOPIA TIRF.....	48
4.	ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE STIM1 Y ORAI1 MEDIANTE FRET.....	50
5.	ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.....	53
5.1.	Bases moleculares y utilización de la sonda CFSE.....	53
5.2.	Utilización de MTT.....	54
6.	IGF-1 INDUCE LA FOSFORILACIÓN DE STIM1 EN SITIOS DIANA DE ERK1/2 EN CÉLULAS HEK293.....	56
6.1.	Estudio de la fosforilación de ERK1/2 en presencia o ausencia de Ca ²⁺ extracelular.....	58
6.2.	Estudio de la fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2.....	59
6.3.	Estudio de la fosforilación de STIM1 por JNK y p38.....	62
7.	STIM1-GFP SE ACUMULA EN MULTÍMEROS TRAS LA ESTIMULACIÓN CON IGF-1.....	65
8.	LA FOSFORILACIÓN DE STIM1 INDUCIDA POR IGF-1 REGULA SU MULTIMERIZACIÓN.....	68
9.	IGF-1 INDUCE LA DISOCIACIÓN ENTRE STIM1 Y EB1.....	69
10.	LA FOSFORILACIÓN DE STIM1 REGULA LA TRANSLOCACIÓN DE NFAT AL NÚCLEO.....	71
11.	IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS DE LA FOSFORILACIÓN DE STIM1 EN SITIOS DIANAS DE ERK1/2.....	76
11.1.	Fosforilación de STIM1 y migración celular.....	76
11.1.1.	<i>Los canales SOC están implicados en migración celular.....</i>	78
11.2.	La fosforilación de STIM1 en sitios dianas de ERK1/2 regula el reciclaje de adhesiones focales en mioblastos C2C12.....	81
11.3.	La localización de fosfo-STIM1 en mioblastos C2C12 está polarizada.....	85
11.4.	Fosfo-STIM1 colocaliza con cortactina.....	88
11.5.	Localización de cortactina y STIM1 mutado.....	92
11.6.	La fosforilación de STIM1 en sitios dianas de ERK1/2 regula la dinámica de cortactina en el frente de avance.....	96
	<i>DISCUSIÓN.....</i>	104
	<i>CONCLUSIONES.....</i>	124
	<i>MATERIALES Y MÉTODOS.....</i>	128
1.	CULTIVOS CELULARES.....	128

1.1.	Cultivo de las líneas celulares HEK293 y C2C12.....	128
1.2.	Sobre-expresión de STIM1 en las líneas celulares.....	128
1.2.1.	<i>Transfección transitoria de STIM1 en mioblastos C2C12.</i>	129
1.2.2.	<i>Generación de líneas celulares HEK293 establemente transfectadas con STIM1.</i>	129
1.2.3.	<i>Inducción de la expresión de Flag-STIM1 y STIM1-GFP en células HEK293.</i>	131
1.3.	Tratamientos de las líneas celulares.....	133
1.3.1.	<i>Tratamientos de la línea celular C2C12.</i>	133
1.3.2.	<i>Tratamientos de la línea celular HEK293.</i>	134
2.	PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES Y WESTERN BLOT.....	134
2.1.	Preparación de extractos celulares totales.....	134
2.2.	Medida de concentración de proteína.....	134
2.3.	Inmunoprecipitación y co-inmunoprecipitación de proteínas.....	135
2.4.	Electroforesis en condiciones desnaturizantes y transferencia a membranas de nitrocelulosa.....	135
2.5.	Inmunodetección.....	136
3.	INMUNOHISTOQUÍMICA EN HEK293 Y C2C12.....	138
3.1.	Tinción de la cromatina nuclear con Hoechst 33342.....	139
4.	ENSAYOS DE MIGRACIÓN CELULAR.....	140
4.1.	Ensayos de cierre de heridas en placa.....	140
4.2.	Ensayos de cierre de heridas en placa con dispositivos IBIDI®.....	141
4.3.	Ensayos de inmunolocalización en heridas.....	142
5.	ENSAYOS DE LOCALIZACIÓN DE ADHESIONES FOCALES.....	142
5.1.	Ensayos en célula fijada.....	142
5.2.	Ensayos de cinética de formación de adhesiones focales.....	143
6.	CUANTIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE DNA.....	143
6.1.	Cuantificación del DNA.....	143
6.2.	Secuenciación del cDNA.....	143
7.	TRANSFORMACIÓN BACTERIANA.....	144
7.1.	Obtención del DNA plasmídico.....	145
7.2.	Construcciones de DNA y transfección.....	145
8.	MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO LIBRE INTRACELULAR.....	145
8.1.	Carga con fura-2AM en células HEK293.....	147
8.3.	Calibración de la medida.....	147
8.4.	Activación de la entrada de Ca ²⁺ mediante canales SOC.....	148

9.	ANÁLISIS DE LA MULTIMERIZACIÓN DE STIM1.....	148
9.1.	Análisis por epifluorescencia y microscopía confocal en célula fijada.....	148
9.2.	Análisis por epifluorescencia en célula viva.....	149
10.	ANÁLISIS DE LA RELOCALIZACIÓN DE STIM1 MEDIANTE MICROSCOPIA TIRF.	149
10.1.	Bases físicas de TIRFM.....	150
10.2.	Relocalización de STIM1.....	150
11.	ANÁLISIS DE LA UNIÓN STIM1-ORAI1 MEDIANTE FRET.....	150
11.1.	Bases físicas de FRET.....	151
12.	PROLIFERACIÓN CELULAR EN CÉLULAS HEK293.....	152
12.1.	CFSE (carboxifluoresceína succinimidil éster).....	152
12.2.	MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazolio).....	153
13.	ANÁLISIS DE LA TRANSLOCACIÓN DE NFAT.....	154
	<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	158

INDICE figuras

Figura 1.	Activación de la fosfolipasa C y de la ruta de los fosfoinosítidos.....	2
Figura 2.	Dominios de las proteínas STIM.....	7
Figura 3.	Esquema de los dominios de la proteína STIM1.....	8
Figura 4.	Modelo propuesto de activación de los canales SOC mediada por STIM1 tras la depleción de los depósitos intracelulares de Ca ²⁺	10
Figura 5.	Mecanismo molecular de activación de STIM1.....	11
Figura 6.	Dominios funcionales de ORAI1.....	13
Figura 7.	STIM1 media la organización de la unidad elemental de los canales ORAI1.....	15
Figura 8.	Adhesión celular a la ECM: estructura de las FAs.....	23
Figura 9.	Estructura e interacciones de CTTN.....	25
Figura 10.	Medida de SOCE en células HEK293 que sobre-expresan Flag-STIM1-WT, Flag-STIM1-S575A7S608A/S621A y Flag-STIM1-S575E-S608E-S621E.....	38
Figura 11.	Multimerización de STIM1 en células HEK293 tras vaciado de depósitos.....	40
Figura 12.	Cinética de la multimerización de STIM1 en células HEK293 tras el vaciado de depósitos intracelulares de Ca ²⁺	41
Figura 13.	Cinética de multimerización y reversión de la multimerización de STIM1-GFP.....	43
Figura 14.	Cinética de multimerización y reversión de la multimerización de STIM1-GFP.....	46
Figura 15.	Fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2.....	47

Figura 16. Observación de STIM1 con TIRFM tras el vaciado de depósitos intracelulares de Ca^{2+}	50
Figura 17. Análisis de la eficiencia de FRET.....	51
Figura 18. Eficiencia de FRET entre ORAI1-CFP y STIM1-GFP.....	52
Figura 19. Medida de la proliferación celular mediante CFSE.....	53
Figura 20. Relación absorbancia-número de células empleando el ensayo de proliferación de MTT.....	55
Figura 21. Proliferación celular determinada con el ensayo de reducción de MTT.....	56
Figura 22. Posibles rutas de señalización para la fosforilación de STIM1 tras el tratamiento con IGF-1.....	57
Figura 23. IGF-1 activa la fosforilación de ERK1/2 en presencia y ausencia de Ca^{2+} extracelular.....	59
Figura 24. IGF-1 activa la fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2.....	61
Figura 25. Inhibición de p38 MAPK y JNK1/2.....	63
Figura 26. La fosforilación de STIM1 en la Ser575 es dependiente de la actividad de p38 MAPK, JNK1/2 y ERK1/2.....	64
Figura 27. IGF-1 induce la multimerización de STIM1-GFP en células HEK293.....	66
Figura 28. Inmunolocalización de fosfo-STIM1.....	67
Figura 29. La multimerización de STIM1 inducida por IGF-1 es dependiente de la fosforilación en sitios diana de ERK1/2.....	69
Figura 30. IGF-1 induce la disociación de STIM1 y EB1.....	30
Figura 31. Optimización del tiempo de incubación con IGF-1 en células HEK293 para inducir la translocación nuclear de NFAT.....	73
Figura 32. La desfosforilación constitutiva de STIM1 inhibe la translocación de NFAT al núcleo.....	74
Figura 33. Ruta propuesta para la señalización dependiente de STIM1 inducida por IGF-1.....	75
Figura 34. Migración de mioblastos C2C12 transfectados con variantes de STIM1.....	77
Figura 35. Optimización de la concentración de BAPTA necesaria para inhibir la entrada de Ca^{2+}	79
Figura 36. Optimización de la concentración de SKF96365 necesaria para inhibir los canales SOC.....	80
Figura 37. Migración de mioblastos C2C12 tratados con BAPTA 5 μ M y SKF96365 10 μ M.....	80
Figura 38. Adhesiones focales en mioblastos C2C12.....	82

Figura 39. Cuantificación del número, área por célula y área individual de adhesiones focales.....	84
Figura 40. Doble marcaje fosfo-Ser575-STIM1 y f-actina en mioblastos C2C12.....	86
Figura 41. Inmunolocalización de fosfo-STIM1 en mioblastos C2C12.....	88
Figura 42. Colocalización entre fosfo-STIM1 y cortactina endógenos.....	90
Figura 43. Colocalización de fosfo-STIM1 y cortactina endógenos en mioblastos C2C12 tratados con PD0325901.....	91
Figura 44. Localización de STIM1 mutado en mioblastos C2C12.....	92
Figura 45. Localización de STIM1-GFP y CTTN-Cherry en el frente de avance de mioblastos C2C12 en migración.....	94
Figura 46. Dinámica de GFP-CTTN en mioblastos C2C12 que sobre-expresan mutantes de STIM1-Cherry.....	97
Figura 47. Dinámica de CTTN-Cherry en mioblastos C2C12 que sobre-expresan STIM1-GFP.....	98
Figura 48. Cinética de GFP-CTTN en mioblastos cotransfectados con STIM1-WT-Cherry o STIM1-3E-Cherry tratados con SKF96365.....	99
Figura 49. Cinética de CTTN-Cherry en mioblastos C2C12 cotransfectados con mutantes de STIM1-GFP tratados con SKF96365.....	101
Figura 50. Obtención de las líneas Flp-In T-REx.....	130
Figura 51. Expresión del gen de interés por adición de doxiciclina.....	131
Figura 52. Expresión de Flag-STIM1 en líneas celulares HEK293 Flp-In T-REx.....	132
Figura 53. Expresión inducible de Flag-STIM1 y STIM1-GFP en líneas celulares HEK293 Flp-In T-REx.....	133
Figura 54. Ensayos de sellamiento de heridas con dispositivos IBIDI.....	141
Figura 55. Secuenciación del cDNA.....	144
Figura 56. Espectro de excitación del Fura-2AM.....	146
Figura 57. Transferencia de energía entre emisor y aceptor.....	151

INDICE tablas

Tabla I. <i>Relación de anticuerpos utilizados en IB</i>	137
Tabla II. <i>Relación de anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica</i>	139
Tabla III. <i>Marcadores fluorescentes</i>	140

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

actina-F: actina filamentosa

actina-G: actina globular

BSA: albúmina de suero bovino

CDI: inactivación independiente de calcio

CFP: proteína azul fluorescente

CTTN: cortactina

CFSE: carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster

DHPR: dihidropiridinas

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

DMSO: dimetil-sulfóxido

DOX: doxiciclina

DTT: ditioneitol

EB1: end binding protein-1

ECM: matriz extracelular

EGTA: ácido etilen-glicol-bis-(β -aminoetil-éter)-N,N,N',N'-tetraacético

FA: adhesiones focales

FAK: quinasa de adhesiones focales

FBS: suero fetal bovino

GFP: proteína verde fluorescente

HBSS: Hank's balanced salt solution

IGF-1: factor de crecimiento insulínico-1

IP3: inositol 1,4,5 trisfosfato

MP: membrana plasmática

MTs: microtúbulos

MTT: bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazolio

NPF: factor promotor de nucleación

NTA: dominio ácido N-terminal

PBS: tampón fosfato salino

PFA: paraformaldehído

PMSF: fluoruro de fenil metil sulfonilo

RE: retículo endoplasmático

RT: room temperature (temperatura ambiente)

RyR: receptor de rianodina

SDS: dodecil sulfato sódico

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes

SH3: Src homology domain 3

SERCA: Ca²⁺-ATPasa de retículo sarco(endoplasmático)

STIM1: stromal interaction molecule 1.

SOCE: entrada de calcio regulada por depósitos intracelulares (store operated calcium entry)

TEMED: N,N,N',N'-tetrametil etilendiamina

Tg: tapsigargina

TBHQ: 2,5-di-tert-butilhidroquinona

Tris: tris (hidroximetil)aminometano

RESUMEN

STIM1 es una proteína situada en la membrana del retículo endoplasmático (RE) que funciona como sensor de la concentración de calcio (Ca^{2+}) dentro del lumen de este orgánulo subcelular. Tras la depleción de los depósitos intracelulares, STIM1 se transloca a regiones cercanas a la membrana plasmática (MP), donde activa el influjo de Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} de la MP, en un proceso denominado entrada de Ca^{2+} operada por depósitos (SOCE, store-operated Ca^{2+} entry). Durante el vaciado de los depósitos de Ca^{2+} intracelulares inducida por taspigargina (Tg), ERK1/2 fosforila a STIM1 en los residuos Ser575, Ser608 y Ser621. Esta fosforilación de la proteína determina la cinética de multimerización y translocación de STIM1 a regiones próximas a la MP, de forma que la sobre-expresión de STIM1-S575A/S608A/S621A reduce SOCE y ralentiza la cinética de activación y multimerización de la proteína.

Con respecto a la implicación fisiológica de esta fosforilación se sabe que IGF-1 activa la ruta de RAF-MEK-ERK y la ruta de los fosfoinosítidos, por ello decidimos estudiar la función de la fosforilación de STIM1 inducida por IGF-1. Hemos comprobado que la fosforilación de STIM1 tiene lugar tanto en presencia como en ausencia de Ca^{2+} extracelular, lo que demuestra que la entrada de Ca^{2+} no es esencial para la activación de ERK1/2. Hemos probado además, que STIM1 se fosforila en los residuos anteriormente citados tras el tratamiento con IGF-1 y que esta fosforilación se bloquea tras el tratamiento con PD0325901, un inhibidor de MEK1/2 utilizado para bloquear la activación de ERK1/2. Así mismo, se observaron multímeros de STIM1-GFP tras la estimulación con IGF-1, y la sobre-expresión de STIM1-S575A/S608A/S621A-GFP reduce esta multimerización significativamente.

Por otro lado, se ha descrito que la fosforilación de STIM1 en los residuos citados regula, a su vez, la disociación entre STIM1 y la proteína EB1 de unión a microtúbulos, un paso esencial para la activación de STIM1 inducida por Tg, y hemos mostrado en este trabajo que STIM1 se disocia de EB1 tras el tratamiento con IGF-1, de manera similar a lo que ocurre con Tg, lo que sugiere que STIM1 participa en la cascada de señalización de IGF-1. Se ha llevado a cabo, además, un estudio de la translocación nuclear de NFAT, encontrándose que STIM1-S575A/S608A/S621A bloquea esta translocación de la misma forma que ocurre con la proteína de fusión STIM1-EB1, confirmando que tanto la fosforilación de STIM1 como su disociación de EB1 son necesarias para la activación de la proteína y que además la fosforilación de

STIM1 forma parte de la cascada RAF-MEK-ERK activada por IGF-1 y que esta fosforilación media la activación de la entrada de Ca^{2+} .

Dado que SOCE regula la migración celular, en esta Tesis Doctoral, hemos estudiado además, la implicación de la fosforilación de STIM1 en este proceso. Para ello hemos utilizado mioblastos C2C12 y hemos realizado ensayos de sellamiento de heridas en monocapas en placa. Los resultados obtenidos muestran que la sobreexpresión de STIM1-3A ralentiza la migración en ensayos de sellamiento de heridas. Por otro lado, hemos mostrado que STIM1 se localiza en ruffles de membrana, una estructura dinámica necesaria para la formación de protrusiones celulares. Estudiamos por tanto, si fosfo-STIM1 modula la dinámica de los ruffles de MP transfectando los mioblastos C2C12 con mutantes de STIM1 a alanina o glutamato (S575A/S608A/S621A o S575E/S608E/S621E). Los resultados obtenidos prueban que STIM-3A reduce la migración, incrementando el número y tamaño de adhesiones coales y ralentizando la dinámica de los ruffles de membrana. Además SKF96365, un inhibidor de SOCE, bloquea totalmente la formación de ruffles, que se monitorizó utilizando células que expresan GFP-cortactina. Estos resultados sugieren que la entrada de Ca^{2+} a través de canales SOC regula la cinética de cortactina y que en este proceso es determinante la fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2.

INTRODUCCIÓN

1. ION CALCIO COMO SEÑALIZADOR INTRACELULAR

Las señales de calcio (Ca^{2+}) citosólicas controlan un gran número de funciones celulares, desde respuestas a corto plazo, como la contracción o la secreción hasta respuestas a largo plazo como la regulación de la transcripción, el crecimiento o la división celular (Berridge et al., 2003; Berridge et al., 2000). Los niveles de Ca^{2+} libre intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) en una célula en reposo se encuentran próximos a 100 nM y se mantienen en estas concentraciones por la acción de diferentes sistemas, pero cuando la célula es estimulada la concentración de Ca^{2+} libre intracelular puede alcanzar niveles micromolares (Bootman et al., 2001). La cinética de elevación de los niveles intracelulares de Ca^{2+} es muy variable en cuanto a velocidad, amplitud y patrón espacio-temporal. Esta versatilidad en las señales de Ca^{2+} confieren a la célula una especificidad, sensibilidad y precisión únicas en la activación de cascadas de señalización con diversas funciones (Berridge, 2007).

Los cambios en los niveles de Ca^{2+} libre citosólico pueden iniciarse por ligandos que actúan sobre receptores de la membrana plasmática asociados a la fosfolipasa C (PLC) que estimula la ruta de los fosfoinosítidos (figura 1). Esta fosfolipasa libera inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG), mediante la hidrólisis de fosfatidilinositol (4,5)-bisfosfato (PIP_2). El IP_3 se une entonces a receptores específicos (IP_3R) localizados en la membrana del retículo endoplasmático (RE), provocando la liberación de Ca^{2+} desde el lumen hacia el citosol (Berridge, 2005; Streb et al., 1983).

El sistema de membranas del RE o su equivalente en células musculares (retículo sarco(endo)plasmático, RS) son los depósitos intracelulares de Ca^{2+} más importantes. El vaciado de estos depósitos está regulado por varios canales, como el ya citado receptor del inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3R) y el receptor de rianodina (RyR), que han sido los más estudiados (Berridge, 1993; Clapham, 1995).

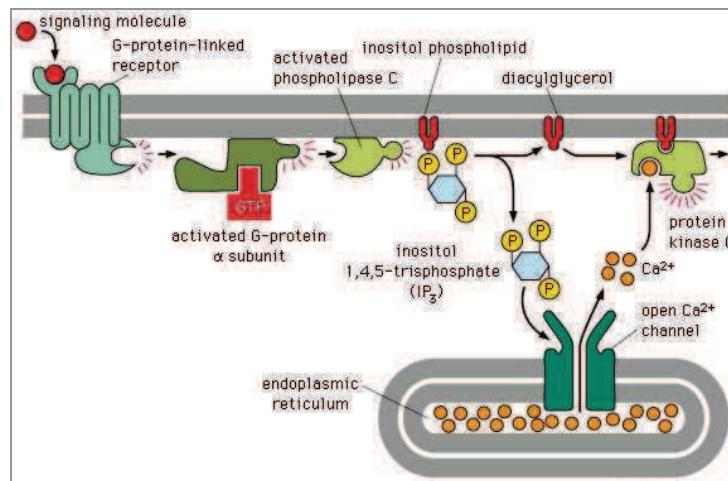


Figura 1. Activación de la fosfolipasa C y de la ruta de los fosfoinosítidos. La llegada de una molécula señalizadora activa receptores de la membrana plasmática asociados a proteínas G triméricas. La subunidad α de la proteína G se disocia activando a la fosfolipasa C, que hidroliza el fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) en 1,2-diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trisfosfato (IP₃). El IP₃ soluble en el citosol activa receptores de IP₃ (IP₃R) en la membrana del RE, que actúan como canales de Ca²⁺ provocando el vaciado de los depósitos intracelulares (*Molecular biology of the cell*, 4th edition).

En el caso de las células musculares los canales RyR constituyen un sistema muy especializado responsable del vaciado de los depósitos intracelulares de Ca²⁺ (RS) implicados en el proceso de contracción-relajación muscular (Meissner, 1994). En este caso, los canales de RyR se activan mediante un cambio conformacional de los canales sensibles a voltaje de tipo L (sensibles a dihidropiridinas, DHPR) presentes en la membrana plasmática de la célula muscular. Estos canales DHPR se localizan en las zonas de los túbulos T, que son invaginaciones de la membrana plasmática muy próximas al RS. Así, cuando un estímulo consigue despolarizar la membrana plasmática, el canal DHPR cambia su conformación, lo cual, además de permitir la entrada de Ca²⁺ desde el exterior celular, induce la alteración conformacional del receptor de RyR por interacción directa entre ambos, permitiendo el vaciado del RS consiguiendo un aumento en la concentración de Ca²⁺ citosólico (Meissner, 1994).

Otros canales que aumentan los niveles de Ca²⁺ libre intracelular son los canales localizados en la membrana plasmática (MP), y de entre ellos los más conocidos son los canales de Ca²⁺ sensibles a voltaje (VOCs, voltage-operated calcium channels) que se activan por la despolarización de la membrana (Catterall, 1998). Otros canales importantes en la MP son los canales ROC (receptor-operated calcium channels) que son estructuralmente y funcionalmente diferentes, siendo particularmente abundantes en

células secretoras y terminales nerviosas. Los ROC más conocidos son los activados por la unión de glutamato, ATP, serotonina y acetilcolina (Cavero and Spedding, 1983).

Se ha descrito además en la membrana plasmática la presencia de unos canales de Ca^{2+} activados por el vaciado de los depósitos intracelulares, llamados canales sensibles al vaciado de depósitos (SOCs, store-operated calcium channels), responsables del proceso conocido como entrada de Ca^{2+} regulada por depósitos (SOCE, store operated calcium entry) (Putney, 1986). Este proceso se estudió inicialmente en una amplia variedad de tipos celulares, principalmente en células no excitables (Berridge, 1995; Parekh and Penner, 1997; Putney et al., 2001) y hoy en día SOCE es considerado uno de los moduladores primarios de la dinámica intracelular del Ca^{2+} .

Los experimentos iniciales que han conducido a la identificación de las bases moleculares de la entrada capacitativa de Ca^{2+} fueron llevados a cabo mediante el estudio de fotorreceptores de *Drosophila melanogaster*, ya que ofrecen una oportunidad única para estudiar la entrada de Ca^{2+} a través de un mecanismo que presenta propiedades similares a las de SOCE (Hardie and Minke, 1993; Selinger et al., 1993). Mediante estudios de biología molecular en *Drosophila* se observó que aquellas estirpes mutadas en genes *trp* (Transient Receptor Potential) presentaban deficiencias en la entrada de Ca^{2+} activada por estimulación luminosa (Montell and Rubin, 1989; Phillips et al., 1992; Wong et al., 1989). Al mismo tiempo se ha observado que la expresión de la proteína TRP en diferentes sistemas produce corrientes de Ca^{2+} cuando se induce el vaciado de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} mediante la inhibición de las Ca^{2+} -ATPasas del RE por tapsigargina (Tg). Ambos resultados sugieren que las proteínas TRP intervienen en la entrada rápida de Ca^{2+} desde el exterior celular, activadas por el vaciado de los depósitos intracelulares, es decir que estas proteínas intervienen en SOCE (Petersen et al., 1995; Vaca et al., 1994).

Por tanto, existen dos fuentes principales que pueden incrementar los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$: (1) la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular a través de diferentes canales de la MP y (2) la liberación desde los depósitos intracelulares hacia el citosol, incluyendo el depósito de Ca^{2+} más importante, el RE y el especializado RS en células musculares. En todos los casos el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es transitorio y los niveles basales de Ca^{2+} son restablecidos rápidamente.

Una vez que se ha generado la señal de Ca^{2+} la red de señalización cuenta con numerosas proteínas de unión a dicho catión, que pueden actuar como tamponadoras o como sensores de Ca^{2+} . El aumento de Ca^{2+} se traduce entonces en una respuesta celular variada, ya que hay numerosos procesos sensibles a Ca^{2+} como la contracción muscular, distintas rutas metabólicas, muerte celular, proliferación celular, excitabilidad neuronal, etc. En otros casos, como se ha comentado anteriormente, esta liberación de Ca^{2+} va seguida de una entrada de Ca^{2+} a través de los canales operados por depósitos intracelulares (SOCs), cuya activación es clave para mediar respuestas a largo plazo de las señales de Ca^{2+} citosólicas y el rellenado de estos depósitos intracelulares (Parekh and Putney, 2005; Putney et al., 2001; Venkatachalam et al., 2002). La versatilidad de la señalización de Ca^{2+} mencionada se puede incrementar por interacciones con otras vías de señalización, como por ejemplo con el control de la transcripción génica (Berridge et al., 2000).

Finalmente, y una vez que el Ca^{2+} ha desempeñado su función, éste es rápidamente eliminado del citosol hasta la restauración de los niveles de Ca^{2+} libre en reposo. Los principales sistemas encargados de la restauración de la concentración de Ca^{2+} libre intracelular son las bombas de Ca^{2+} (Pozzan et al., 1994) tanto las Ca^{2+} -ATPasas de la membrana plasmática (PMCA), que bombean Ca^{2+} desde el citosol al medio extracelular (Gill et al., 1981), como las Ca^{2+} -ATPasas del RE (SERCA), que transportan Ca^{2+} desde el citosol al interior de dicho orgánulo (Ebashi et al., 1969; Hasselbach, 1964). Además de estas enzimas, los intercambiadores iónicos de la membrana plasmática, como es el caso del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, desempeñan un importante papel en este proceso sacando Ca^{2+} al exterior celular (Blaustein, 1982; Blaustein and Lederer, 1999). En la mitocondria también actúa otro mecanismo de restauración de los niveles de Ca^{2+} basales. Este orgánulo importa Ca^{2+} a través de un unitransportador de Ca^{2+} presente en la membrana mitocondrial (Budd and Nicholls, 1996; Duchon, 1999; Jouaville et al., 1995).

2. ENTRADA DE CALCIO OPERADA POR DEPÓSITOS INTRACELULARES (SOCE).

Tras 20 años de estudio de los flujos de Ca^{2+} y la depleción y rellenado de los depósitos intracelulares durante la señalización celular, se llegó a la conclusión de que la entrada de calcio a través de la MP está controlada, al menos en parte, por los niveles

de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares (Putney, 1986, 1990). Esta primera idea de la entrada capacitativa de Ca^{2+} , posteriormente denominada entrada de Ca^{2+} operada por depósitos (SOCE, store-operated calcium entry) ha dado lugar a un enorme interés en la identificación de las proteínas implicadas en dicho proceso por su papel en la regulación del Ca^{2+} intracelular.

Uno de los mejores ejemplos de SOCE son las corrientes CRAC (Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} current o corrientes de Ca^{2+} activadas por Ca^{2+}), descritas en 1992 (Hoth and Penner, 1992) en mastocitos. Estudios con patch-clamp establecieron que estas corrientes se producían por canales iónicos con características biofísicas específicas, como una alta selectividad por Ca^{2+} y una baja conductividad (Parekh and Putney, 2005; Prakriya and Lewis, 2015). Se demostró así mismo que los canales CRAC cumplían todas las características de los canales SOC y que sólo se activaban cuando la concentración luminal de Ca^{2+} se reducía de forma significativa. Aunque inicialmente los canales SOC fueron descritos en células no excitables, hoy en día se sabe que están presentes en un gran número de tipos celulares, incluyendo células excitables como músculo esquelético o neuronas (Parekh and Putney, 2005). Además, estudios electrofisiológicos en células estimuladas para inducir una depleción de los depósitos del RE, muestran corrientes de membrana con diversas propiedades, lo cual indica que los diferentes tipos celulares podrían expresar diferentes canales SOC (Parekh and Putney, 2005).

Fisiológicamente los canales SOC se activan generalmente por estímulos que provocan la liberación de Ca^{2+} desde el RE. La idea general de este mecanismo es que los receptores situados en la MP pueden activar la ruta de los fosfoinosítidos, liberando Ca^{2+} desde el RE (Streb et al., 1983), lo que hace necesario un sistema de restauración de los niveles de Ca^{2+} dentro del RE. Este mecanismo se resuelve con los canales SOC.

Uno de los principales hallazgos en el estudio de SOCE fue la identificación de STIM1 (stromal interaction molecule 1), como el sensor de Ca^{2+} del RE (Liou et al., 2005; Roos et al., 2005), seguida en 2006 de la identificación de ORAI1/CRACM1, como el componente de los canales CRAC (Feske et al., 2006; Vig et al., 2006; Zhang et al., 2006). Otras proteínas propuestas como posibles canales SOC fueron los canales TRP (transient receptor potential), muchos de los cuales pueden transportar Ca^{2+} (Montell, 2005; Ramsey et al., 2006). De entre los TRP, uno de los candidatos como

canal SOC es TRPC1 (Ambudkar, 2007; Beech, 2005; Vaca and Sampieri, 2002). Sin embargo, existe mucha controversia sobre la participación de los TRPC en SOCE y se ha sugerido que algunos de ellos funcionan sólo como canales operados por receptor (ROC) (Gudermann et al., 2004). En conjunto, todos estos hallazgos fueron claves para entender la interacción entre las dos membranas (MP-RE) (Patterson et al., 1999; Yao et al., 1999), así como para explicar el modelo propuesto por J. Putney en 1986 (Putney, 1986).

El descubrimiento de STIM1 deriva de dos estudios con RNA interferente (RNA_i). El primer estudio examinó las respuestas de Ca²⁺ en células S2 de *Drosophila melanogaster*, lo que permitió el descubrimiento de una única forma de la proteína STIM (Roos et al., 2005). El otro estudio monitorizó la señalización por Ca²⁺ en células HeLa, lo que dio lugar al descubrimiento del par de proteínas humanas STIM, STIM1 y STIM2 (Liou et al., 2005). Actualmente las proteínas STIM están reconocidas como las sensoras de los niveles de Ca²⁺ y activadoras de SOCE. La identificación del canal SOC, conocido como ORAI se realizó también utilizando células S2 (Feske et al., 2006; Vig et al., 2006; Zhang et al., 2006). En mamíferos existen tres genes de ORAI (ORAI1-3) que codifican para canales SOC con propiedades significativamente diferentes. En general, la revelación de que las proteínas STIM podrían mediar SOCE (Liou et al., 2005; Roos et al., 2005) proporciona el mecanismo de acople entre el vaciado de depósitos y la entrada de Ca²⁺ propuesto en los modelos de Putney y Berridge (Berridge, 1995; Putney, 1986, 1990).

3. STIM1

3.1. STIM1 es un sensor de la concentración de Ca²⁺ intraluminal de RE.

La proteína STIM1 (stromal interaction molecule 1) ha sido descrita como un regulador clave en SOCE (Liou et al., 2005; Roos et al., 2005). Especies como *Drosophila* o *C. elegans* tienen una sola proteína STIM, pero anfibios, aves y mamíferos tienen dos homólogos de STIM, denominadas STIM1 y STIM2. En la mayoría de los tejidos los niveles de expresión de STIM1 son muy superiores a los de STIM2 (Gwack et al., 2008; Williams et al., 2001). Sin embargo, la expresión de STIM2 es predominante en cerebro (Berna-Erro et al., 2009) y en células dendríticas. Las proteínas STIM1 y STIM2 tienen una alta similitud con pequeñas diferencias en los extremos amino y carboxilo-terminales (figura 2) (Deng et al., 2009). Con respecto a su

localización, STIM2 aparece exclusivamente en el RE (Saitoh et al., 2011; Soboloff et al., 2006a; Soboloff et al., 2006b) mientras que STIM1 sí tiene representación en la MP, aunque reside mayoritariamente en el RE (Manji et al., 2000; Williams et al., 2001; Williams et al., 2002). STIM2, por su parte, es un activador de ORAI1 significativamente más débil que STIM1 (Bird et al., 2009), mediando una activación más lenta de ORAI1 (Parvez et al., 2008; Zhou et al., 2009; Zhou et al.). Además, y a diferencia de STIM1 (Soboloff et al., 2006b; Spassova et al., 2006), la sobreexpresión de STIM2 tiene un fuerte efecto negativo sobre SOCE (Brandman et al., 2007; Soboloff et al., 2006b). Por otro lado, la K_d de STIM2 para Ca^{2+} (aproximadamente $400 \mu M$) es dos veces superior a la de STIM1. Por lo tanto, STIM2 es más sensible a las pequeñas oscilaciones de los niveles de Ca^{2+} luminales (Brandman et al., 2007). La lenta velocidad de agregación de STIM2 parece estar relacionada con la lenta activación de los canales SOC por STIM2 (Soboloff et al., 2006b). Puesto que STIM2 es sensible a pequeños cambios de los niveles de Ca^{2+} del RE, y debido a la lenta activación y la baja eficacia de unión a ORAI1, STIM2 podría ser importante para evitar una activación incontrolada de los canales SOC.

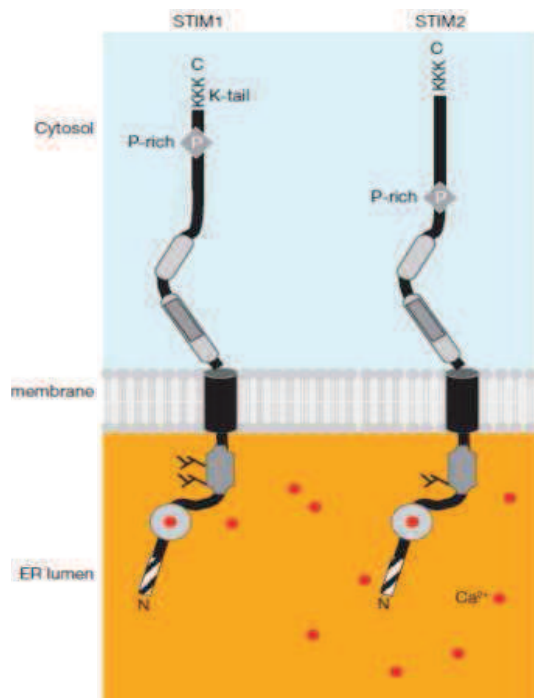


Figura 2. Dominios de las proteínas STIM. Las proteínas STIM humanas están situadas en la membrana del RE. Los dominios de STIM1 y STIM2 incluyen: (1) una región luminal formada por las manos-EF (unión a Ca^{2+}) y los dominios SAM; (2) una región transmembranal y (3) una región citosólica, que consta de los dominios coiled-coil (incluyen la región SOAR), los dominios ricos en prolina (P) y el dominio rico en lisina de la región C-terminal (Mignen et al., 2007; Williams et al., 2002). El color de fondo representa las concentraciones de Ca^{2+} basales de $50-100 \text{ nM}$ en el citosol y superiores a $400 \mu M$ en el lumen del RE. Los iones Ca^{2+} se muestran como puntos rojos, incluyendo el Ca^{2+} unido a los dominios de manos-EF. (Cahalan, M.D. (2009) *Nature Cell Biol* 11:669).

Investigaciones más recientes han demostrado que el vaciado de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares induce la oligomerización de STIM1 (Muik et al., 2008; Wu et al., 2006). Posteriormente, se produce la activación y translocación de STIM1 en forma

de agregados a regiones de 10-25 nm de distancia de la membrana plasmática, donde induce la apertura de canales SOC (Wu et al., 2006). Se ha demostrado que la oligomerización de STIM1 es el evento clave en su relocalización, puesto que permite la apertura de los canales de Ca^{2+} activados por depósitos intracelulares en la membrana plasmática (Luik et al., 2008) culminando con la entrada de Ca^{2+} al interior celular.

3.2. Dominios funcionales de la proteína STIM1.

STIM1 es una proteína de un solo segmento transmembranal que presenta una construcción modular (Roos et al., 2005), con una secuencia primaria polipeptídica de 685 aminoácidos (figura 3). STIM1 fue originalmente caracterizada como una fosfoproteína glicosilada que se expresa principalmente en el RE, con un 10-25% de expresión en la membrana plasmática (Manji et al., 2000; Williams et al., 2001; Williams et al., 2002). Se encuentra distribuida de forma homogénea por la membrana del RE, con su extremo N-terminal hacia el lumen del RE, donde se encuentran el dominio EF y el dominio SAM (*sterile alpha motif*). La unión del ión Ca^{2+} al dominio EF induce un cambio conformacional que es comunicado a otras proteínas dianas. Este dominio EF está relacionado con la oligomerización de la proteína tras la depleción de los niveles de Ca^{2+} en el lumen del RE (Luik et al., 2006; Roos et al., 2005) y es el sensor luminal de STIM1 para la activación de SOCE (Baba et al., 2006; Luik et al., 2006).

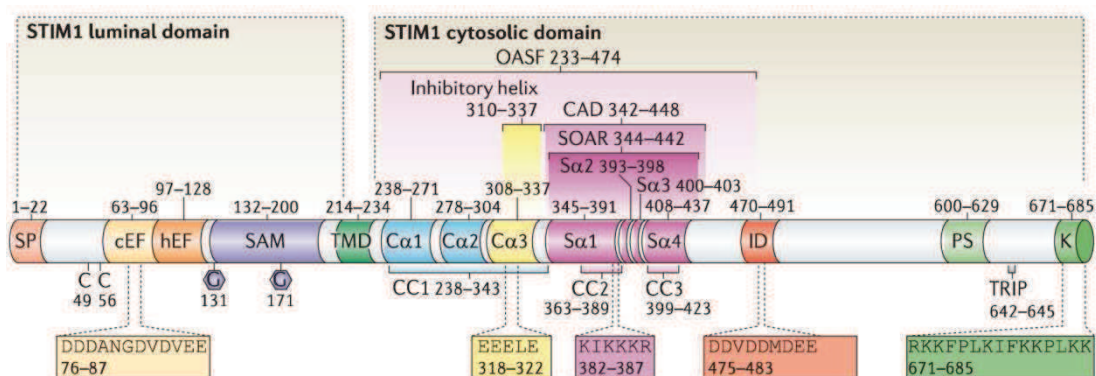


Figura 3. Esquema de los dominios de la proteína STIM1. Dominio luminal (extremo amino-terminal) que incluye las manos-EF: dominio de unión a Ca^{2+} ; y los dominios SAM: sterile alpha motif. Dominio transmembranal: TMD. Dominio citosólico (extremo carboxilo-terminal), formado por tres dominios coiled-coil (CC1, CC2 y CC3) que incluyen la región SOAR (STIM-ORAI activating region), una región rica en serinas y prolinas (PS) y una región rica en lisinas (K) (Sobolof, J. (2012) *Nature Molec Cell Biol* 13:549).

Entre el dominio EF y el transmembranal encontramos la región de 5 hélices compactas denominadas SAM, que está implicada en la interacción proteína-proteína. Este dominio se ha identificado en unas 1300 proteínas, lo que muestra el alto grado de versatilidad en sus propiedades funcionales. El dominio SAM puede interactuar con otros dominios SAM de otras proteínas de modo homotípico o heterotípico, formando dímeros u oligómeros, o pueden incluso unirse a proteínas que no contengan el dominio SAM. En este último caso la interacción proteína-proteína media un amplio grupo de procesos de señalización celular y regulación transcripcional.

La porción citosólica de STIM1 (figura 3) incluye tres dominios coiled-coil (Muik et al., 2011) llamados CC1, CC2 y CC3. La región CC1 está dividida en tres α -hélices (llamadas C α 1, C α 2 y C α 3) (Cole et al., 2008). La región C α 3 está formada por una hélice inhibidora que bloquea la región SOAR (STIM-Orai1 activating region) (Calloway et al., 2010; Korzeniowski et al., 2010; Yang et al., 2012). Esta región SOAR es la secuencia mínima necesaria para la activación de ORAI1 (Yuan et al., 2009) y está formada por cuatro α -hélices, denominadas S α 1, S α 2, S α 3 y S α 4 (Yang et al., 2012). Los segmentos CAD (Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) activation domain) (Park et al., 2009) y OASF (Orai1-activating small fragment) (Muik et al., 2009) son más largos que la región SOAR, incluyen a la región CC1 y también se ha descrito que activan a ORAI1. El extremo C-terminal contiene un dominio rico en prolinas y serinas (PS) susceptible de fosforilación, una región de interacción con microtúbulos (con secuencia Thr-Arg-Ile-Pro) y un dominio rico en lisinas responsable de la interacción con los fosfolípidos en la MP (Manji et al., 2000; Williams et al., 2001; Williams et al., 2002).

3.3. Localización celular de STIM1.

Ha existido inicialmente cierta controversia respecto a la localización exacta de STIM1 durante la depleción de los depósitos intracelulares de Ca²⁺. Como ya se ha comentado, la proteína STIM1 nativa está localizada principalmente en el RE, pero en algunos tipos celulares se ha detectado una proporción de STIM1 variable presente en la superficie celular (Manji et al., 2000; Spassova et al., 2006). Empleando microscopía TIRF se ha descrito su aproximación a la MP tras la depleción de los depósitos intracelulares por el tratamiento con tapsigargina como resultado de la fusión directa de túbulos del RE que contienen STIM1 en regiones de rafts lipídicos de la MP (Alicia et al., 2008).

3.4. Activación de STIM1.

En los últimos años se ha producido un aumento notable del número de observaciones con respecto a la implicación de STIM1 en la regulación de la entrada de Ca^{2+} activada por depósitos intracelulares. La caracterización de esta proteína confirma la hipótesis del “acoplamiento conformacional” que propone que la activación de los canales SOC de la membrana plasmática está regulada por la interacción entre proteínas del RE y componentes proteicos de los canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática (Berridge, 1995; Irvine, 1990). El papel de STIM1 en la secuencia de eventos que permiten la activación de canales SOC de la membrana plasmática en respuesta al vaciado de los depósitos intracelulares se resume en la figura 4. En reposo STIM1 se encuentra distribuido uniformemente en la membrana del RE formando dímeros, y actúa como sensor para detectar la depleción de Ca^{2+} en el lumen del RE. Tras una disminución de la concentración de Ca^{2+} dentro del RE, STIM1 oligomeriza (Liou et al., 2007) y relocaliza hacia regiones de yuxtaposición entre el RE y la MP (Liou et al., 2007; Muik et al., 2008; Smyth et al., 2008) donde interacciona con los canales SOC, activando la entrada de Ca^{2+} hacia el citosol.

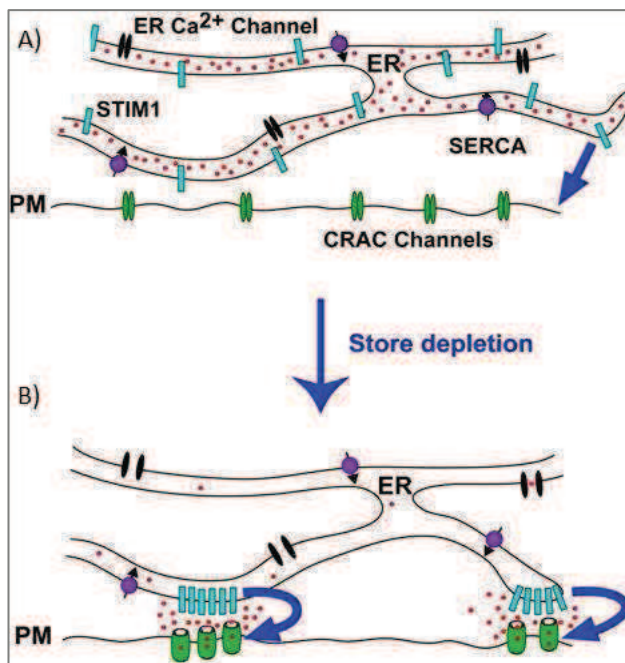


Figura 4. Modelo propuesto de la activación de los canales SOC mediada por STIM1 tras la depleción de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} . (A): STIM1 se localiza de forma dimérica y uniforme anclada en la membrana del RE en ausencia del estímulo. (B): tras la depleción de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} , STIM1 responde oligomerizándose y relocalizándose en regiones próximas a la membrana plasmática donde interacciona con canales SOC induciendo su apertura (Luik, R. et al. (2006) *J Cell Biol* 174:815).

El mecanismo molecular que regula este proceso ha sido descrito en los últimos años y se han propuesto numerosos modelos que explican la activación,

oligomerización y translocación de STIM1 hacia la MP. Cuando los depósitos de Ca^{2+} están suficientemente llenos el dímero de STIM1 se encuentra plegado e inactivo (figura 5). La activación de STIM1 se inicia con la disociación de Ca^{2+} de los dominios de manos-EF del dímero de STIM1. Esto provoca una interacción entre los dominios de manos-EF y dominios-SAM que induce un cambio conformacional en la región citosólica de la proteína para adquirir una configuración extendida en los dominios coiled-coil del citosol (Muik et al., 2011). La disociación de la hélice $\text{C}\alpha 3$ (inhibidora) del dominio SOAR (STIM1-Orai activating region) (Korzeniowski et al., 2010; Muik et al., 2011; Yang et al., 2012), junto con el retroceso del extremo flexible C-terminal dejan expuesta la región SOAR. STIM1 oligomeriza y migra hacia regiones de la MP ricas en canales SOC, mientras que el extremo polibásico de STIM1 (cargado positivamente) se une a fosfolípidos de la MP cargados negativamente (figura 5), anclando a STIM1 a la MP (Park et al., 2009) y dejando el dominio SOAR totalmente expuesto para su interacción con ORAI1. Grandes agregados de STIM1 anclados en regiones de la MP ricas en canales SOC son capaces de unirse a ORAI1 y activarlo.

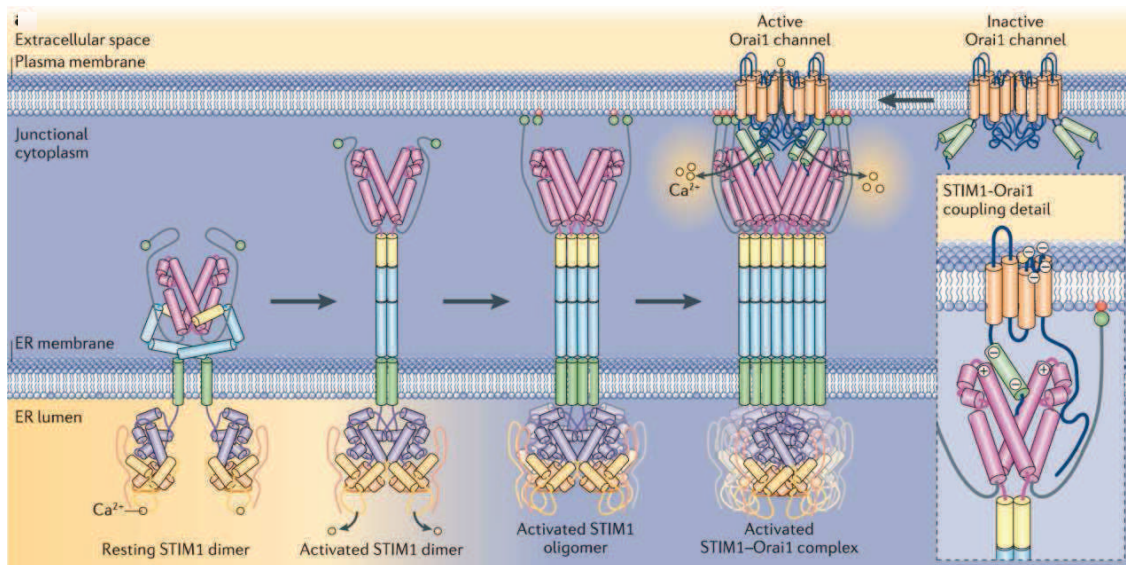


Figura 5. Mecanismo molecular de activación de STIM1. Modelo de activación de STIM1 y unión a ORAI1. En estado de reposo el dímero de STIM1 se encuentra plegado, con el dominio SOAR oculto. La disociación de Ca^{2+} induce un cambio conformacional en la región luminal de la proteína que acerca los dominios SAM y las manos-EF. Esto provoca un cambio conformacional en la región citosólica que da lugar al desplegamiento de los dominios coiled-coil de la proteína, dejando expuesta la región SOAR de activación del canal SOC. Además, el extremo flexible C-terminal de STIM1 (rico en lisinas) interacciona con los fosfolípidos de la MP acercando STIM1 al canal SOC. (Sobolof, J. (2012) *Nature Molec Cell Biol* 13:549).

4. ORAI1 Y TRPCs COMO CANALES SOC.

Un segundo componente implicado en SOCE es el canal SOC de la MP. Uno de los canales SOC mejor caracterizados es ORAI1 (también conocido como CRACM1), una proteína situada en la membrana plasmática con cuatro dominios transmembranales que constituyen el canal CRAC (Feske et al., 2006; Soboloff et al., 2006c; Vig et al., 2006; Zhang et al., 2006). Esta proteína ORAI1 es necesaria tanto para activar SOCE como para activar la corriente CRAC, una corriente de Ca^{2+} muy selectiva a este ión, que no está influenciada por el potencial de la membrana plasmática. Se conocen tres genes homólogos de ORAI en mamíferos: ORAI1, ORAI2 y ORAI3. La principal diferencia entre ellos está en la longitud del lazo de unión entre los dominios transmembranales 3 y 4 (S3-S4), así, el dominio S3-S4 de ORAI1 tiene un sitio de glicosilación y el de ORAI3 es el más largo (Cai, 2007; Gwack et al., 2007). De los tres representantes de la familia de proteínas ORAI en mamíferos, ORAI1 es el que mejor se asemeja a las propiedades requeridas para formar un canal CRAC (Feske et al., 2006; Feske et al., 2005). Las tres proteínas homólogas de ORAI pueden ser activadas por STIM1 y combinarse para formar canales SOC homoméricos o heteroméricos (DeHaven et al., 2007; Lis et al., 2007; Peinelt et al., 2006; Zhang et al., 2008).

Se han descrito también otros canales que pueden funcionar como canales SOC, los canales TRPC (transient receptor potential canonical). Existen 7 genes homólogos de TRPC en mamífero (TRPC 1-7). La proteína STIM1 puede unirse a los canales TRPC, excepto a TRPC7, para regular su función como canales SOC (Yuan et al., 2007) y las interacciones heteroméricas de TRPC1 con otros TRPCs pueden dar lugar a canales SOCs con diferentes propiedades. TRPC1 puede, así mismo, asociarse con ORAI1 para formar complejos ternarios TRPC1-ORAI1-STIM1 que actúan como canales SOCs (Ambudkar, 2007). Sin embargo, los canales TRPC pueden funcionar de manera dependiente o independiente de STIM1. El ratio STIM1/canales TRPC determina que el canal SOC actúe de forma dependiente o independiente de STIM1 (Lee et al., 2010).

Estudios recientes sugieren además la existencia de un complejo SOCIC (store-operated calcium influx complex) de entrada de Ca^{2+} operada por depósitos en el que participan los canales ORAI1 y TRPC1, SERCA y la proteína de unión a microtúbulos EB1. Este modelo sugiere que el ensamblaje del complejo SOCIC tiene lugar en

regiones especializadas de rafts lipídicos en la MP (Vaca, 2010) y que sólo dentro del raft lipídico el complejo SOCIC es activo. Esta activación está mediada por STIM1 y ocurre sólo cuando se ha producido un vaciado de los depósitos intracelulares. Este modelo sugiere también la posibilidad de un complejo SOCIC activo (dentro del raft lipídico) formado únicamente por ORAI1 y STIM1.

4.1. Dominios de ORAI1.

ORAI1 es una proteína monomérica (figura 6) que consta de cuatro segmentos transmembranales (TM1-TM4) que anclan a la proteína a la MP. ORAI1 tiene sus extremos amino y carboxilo orientados hacia la cara citosólica, donde interactúan con STIM1. La TM1 es la región que forma el poro, y en ella se encuentran los residuos que regulan la selectividad del canal (E106) y su activación/inhibición (R91).

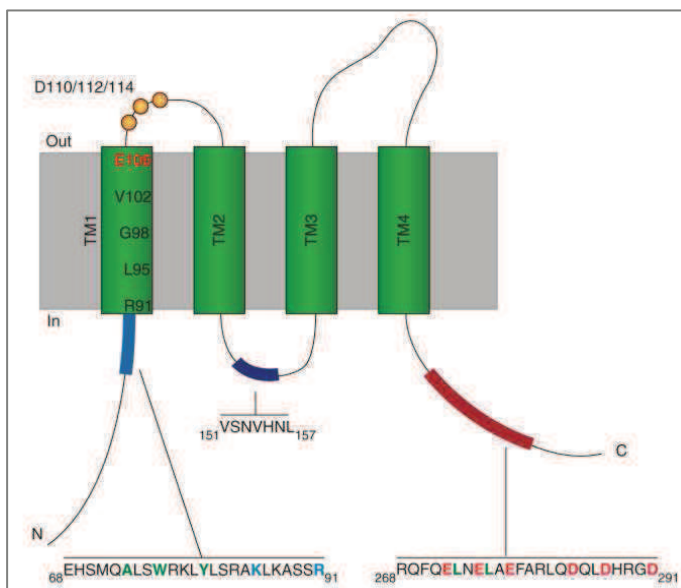


Figura 6. Dominios funcionales de ORAI1. La proteína ORAI1 consta de cuatro dominios transmembranales (TM1-TM4), los extremos carboxilo y amino terminal (orientados ambos hacia el citosol) y las regiones conectoras. (Lewis, R.S. (2011) *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*; 3:a003970).

En el extremo amino existe una región de unión a Ca^{2+} /CaM (residuos 68-91). Esta región también se une al dominio CAD de STIM1 y contiene residuos necesarios para la apertura del canal de Ca^{2+} , K85 y R91 (indicados en azul en la figura 6). Un dominio del fragmento intermedio parece estar implicado en la inactivación dependiente de Ca^{2+} (CDI) necesaria para volver al estado de reposo. Por último, en el extremo carboxilo aparecen una serie de residuos hidrofóbicos (marcados en verde) y ácidos (marcados en rojo) que son críticos para la unión al dominio CAD de STIM1, y por tanto para la activación del canal (Cai, 2007; Gwack et al., 2007).

La activación de ORAI1 implica la formación y apertura de un poro o canal de Ca^{2+} formado por cuatro moléculas de ORAI1. Este tetrámero de ORAI1 da lugar al canal funcional CRAC y su apertura está mediada por la interacción con STIM1 (Mignen et al., 2008; Penna et al., 2008).

4.2. Mecanismo de activación y estequiometría del complejo STIM1-ORAI1.

Mediante experimentos de co-inmunoprecipitación se ha probado que existe una interacción física entre STIM1 y ORAI1 (Yeromin et al., 2006). La porción C-terminal de STIM1 es suficiente para la activación de ORAI1 y el acoplamiento físico entre ambas proteínas está mediado por el dominio coiled-coil en el extremo N-terminal de ORAI1 (Muik et al., 2008). También se ha observado que la multimerización de STIM1 así como el acoplamiento entre STIM1 y ORAI1 son procesos reversibles una vez restaurados los niveles basales de Ca^{2+} en el lumen del RE (Muik et al., 2008; Roos et al., 2005). Aunque algunos detalles acerca de la apertura de los canales SOCs no se conocen, se acepta que la multimerización de STIM1 permite su unión a ORAI1 para formar canales activos (Cahalan et al., 2007; Yeromin et al., 2006).

En este sentido, se han descrito algunos aspectos moleculares de la activación de ORAI1 por STIM1 que implican al dominio de activación de la corriente CRAC, descrito en el apartado 3.2 de esta Introducción. Este dominio está altamente conservado en STIM1 y se denomina CAD (*CRAC activation domain*) o SOAR (*STIM1-ORAI1 activation region*) (Park et al., 2009; Yuan et al., 2009). Se trata de un segmento de unos 100 aminoácidos que se unen directamente a ORAI1 para activar el canal de Ca^{2+} .

Además, se han propuesto varios modelos de activación del canal SOC formado por ORAI1 que sugieren diferentes estequiometrías de activación del canal. En 2009 Cahalan (Cahalan, 2009) sugirió que el canal SOC activo está compuesto por cuatro moléculas de ORAI1, necesarias para formar el poro y que para la activación del canal se requieren 2 moléculas de STIM1 (figura 7). Por otro lado, en una revisión posterior (Soboloff et al., 2012) se propone que cada dímero SOAR interacciona con una molécula de ORAI1. Dado que el canal activo está formado por cuatro moléculas de ORAI1, este modelo propone que son necesarias ocho moléculas de STIM1 para activar el tetrámero de ORAI1 (véase figura 5).

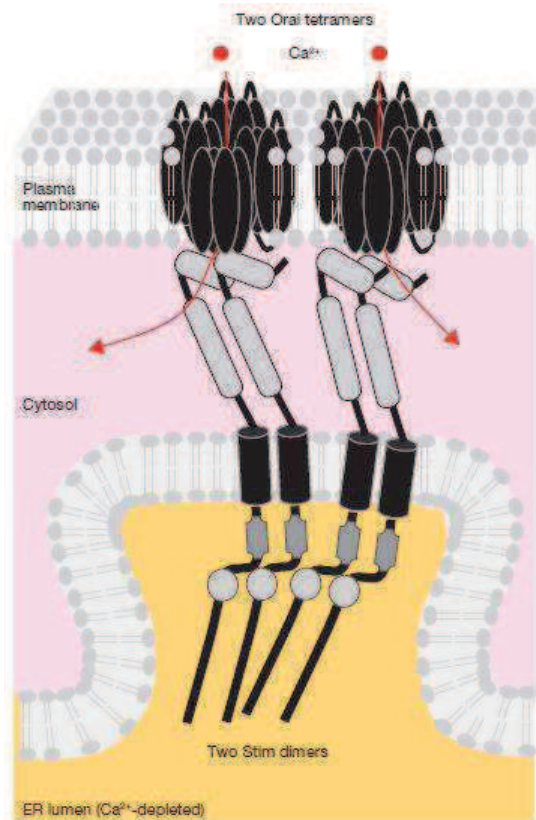


Figura 7. STIM1 media la organización de la unidad elemental de los canales ORAI1. La acumulación de STIM1 induce la multimerización de canales ORAI1 en la membrana plasmática. El dominio efector C-terminal de STIM1 induce la apertura de los canales ORAI1 por unión directa del dominio distal coiled-coil, y la entrada de Ca^{2+} (flechas rojas). Dos moléculas de STIM1 activan un único canal CRAC formado por un tetramero de ORAI1; la activación del canal ORAI1 puede requerir pasos preliminares de acoplamiento entre dímeros de ORAI1 para formar un tetramero funcional. Debido a la entrada de Ca^{2+} , la concentración citosólica de Ca^{2+} se incrementa desde 100 nM (estado basal) hasta más de 1 μM siendo la concentración de Ca^{2+} intraluminal próxima a 300 μM . (Cahalan, M.D. (2009) *Nature Cell Biol* 11:669).

4.3. Inactivación del complejo STIM1-ORAI1.

El cese de la activación de complejo STIM1-ORAI1 implica dos pasos fundamentales: (1) la rápida inactivación dependiente de Ca^{2+} (CDI, calcium dependent inactivation) del canal ORAI1, y (2) la consecuente y lenta disociación del complejo STIM1-ORAI1. La CDI está mediada por la interacción entre residuos de STIM1 del dominio citosólico (ID, inhibitory domain) y residuos del extremo amino terminal de ORAI1 (Derler et al., 2009; Lee et al., 2009; Mullins et al., 2009). Uno de los mediadores de este proceso es la proteína calmodulina, mediante su interacción directa con ORAI1 (Litjens et al., 2004). Por otro lado, la disociación lenta del complejo STIM1-ORAI1 está mediada básicamente por el incremento de los niveles de Ca^{2+} luminales, que provocan el desacoplamiento de STIM1 (Deng et al., 2009).

Se han propuesto además numerosas proteínas que podrían estar relacionadas con el control del cese de SOCE. Una de ellas es la proteína citosólica reguladora CRAC2A, asociada al complejo STIM1-ORAI1 (Srikanth et al., 2010). Esta proteína interacciona tanto con STIM1 como con ORAI1 estabilizando el complejo cuando los niveles de Ca^{2+} en las yuxtaposiciones de la MP-RE son bajos. De esta manera el

aumento de los niveles de Ca^{2+} favorece la disociación de CRACR2A del complejo STIM1-ORAI1, desestabilizándolo. Por otro lado, el factor regulador asociado a SOCE (SARAF) se ha relacionado también con el cese de SOCE. Esta proteína reside en la membrana del RE y se desplaza junto con STIM1 a las yuxtaposiciones MP-RE tras el vaciado de los depósitos intracelulares. Esta proteína parece ser crucial en el control del relleno de los depósitos y en proteger a la célula de un exceso de Ca^{2+} en el RE (Palty et al., 2012). En definitiva, la inactivación de SOCE y el desensamblaje de las uniones STIM1-ORAI1 es un proceso estrictamente controlado y en él están implicadas numerosas proteínas.

5. REGULACIÓN DE SOCE POR FOSFORILACIÓN DE STIM1.

Se han descrito modificaciones post-traduccionales de las proteínas STIM1 y ORAI1 que estarían regulando la activación de SOCE. En esta Tesis Doctoral centraremos nuestra atención en la proteína STIM1 y en algunas modificaciones postraduccionales de la misma. STIM1 ha sido definida como una fosfoproteína (Manji et al., 2000). Estudios de proteómica a gran escala desarrollados en el año 2006 revelaron diversos residuos fosforilados de STIM1 en células HeLa estimuladas con EGF (factor de crecimiento epidérmico) (Olsen et al., 2006). Sin embargo, estos trabajos no abarcaban un estudio de la ruta de señalización que controla esta fosforilación ni de sus posibles implicaciones fisiológicas.

5.1. Sitios de fosforilación de STIM1.

Análisis más detallados de los diversos sitios potenciales de fosforilación en STIM1 se han publicado tanto para células en mitosis/meiosis (Smyth et al., 2009; Yu et al., 2009) como en células en interfase (Pozo-Guisado et al., 2010). Aunque Yu *et al.*, mostraron que STIM1 se fosforila durante la meiosis en ovocitos, mutaciones en estos residuos para simular una fosforilación o defosforilación constitutiva no modulan la agregación de STIM1 en respuesta al vaciado de depósitos, lo que sugiere que la fosforilación de STIM1 durante la meiosis de ovocitos no tiene una función fisiológica relevante (Yu et al., 2009). De forma paralela, Smyth *et al.*, encontraron que la formación de agregados de STIM1 se encuentra inactiva durante la mitosis de células somáticas de mamíferos (Smyth et al., 2009) e identificaron residuos específicos, como la Ser602 o la Ser608, que se defosforilan en esta fase del ciclo celular. Por otro lado, las Ser486 y Ser668 se fosforilan durante la mitosis, pero no en interfase. La Ser668

pertenece a una secuencia diana de la CDK1 (ciclina dependiente de quinasa 1) y es fosforilada *in vitro* por esta quinasa. Sin embargo no existen ensayos *in vivo* que corroboren estos resultados. Además la expresión de mutantes simples a alanina (S486A o S668A) no restaura SOCE en células mitóticas. Sin embargo, la expresión del doble mutante S486A/S668A muestra SOCE en mitosis (Smyth et al., 2009), demostrando que la fosforilación de STIM1 en residuos diana de la actividad CDK1 en células HEK293 podría ser la causa de la supresión de SOCE durante mitosis (Smyth et al., 2009).

Por otro lado, datos de nuestro laboratorio han demostrado que las quinasas ERK1/2 fosforilan a STIM1 *in vitro* en las Ser575, Ser608 y Ser621 y que la fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2 regula SOCE (Pozo-Guisado et al., 2010). Para determinar si STIM1 es sustrato de ERK1/2, se llevaron a cabo ensayos quinasas *in vitro* utilizando como sustrato el dominio citosólico de STIM1 (GST-STIM1^{235-END}). Por otro lado, estos tres residuos se encontraron fosforilados *in vivo* en células HEK293 que sobre-expresan Flag-STIM1 de forma estable (Pozo-Guisado et al., 2010). Además, el análisis de STIM1 en células HEK293 presentó numerosos fosfopéptidos que contenían otros residuos fosforilados diferentes a las Ser575, Ser608 y S621, lo que sugiere que además de ERK1/2 existen otras quinasas, aún sin especificar, que fosforilan a STIM1 *in vivo*. En este estudio, los autores mostraron que la fosforilación de STIM1 en los sitios dianas de ERK1/2 regula la multimerización y activación de la proteína, así como la entrada de Ca²⁺ a través de ORAI1. Estos autores probaron además que la mutación a alanina de estos residuos bloquea SOCE (Pozo-Guisado et al., 2010). Estos resultados confirman el requerimiento de la fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2 para activar SOCE. Otros trabajos que describen una función fisiológica para la fosforilación de STIM1 han sido los publicados por Zhu-Mauldín y cols., que han permitido describir que la fosforilación de STIM1 podía ser inducida por taspigargina en miocitos ventriculares de ratas (Zhu-Mauldin et al., 2012). Por último, utilizando células C2C12 de mioblastos de ratón, Lee comprobó que la fosforilación de la Ser575 es crítica para la función miogénica de STIM1 (Lee et al., 2012).

Por tanto, entre los trabajos que han reportado información sobre residuos fosforilados en STIM1, se puede realizar el siguiente listado de sitios potenciales como diana de diferentes actividades quinasa: Ser468, Ser492, Ser553, Ser575, Ser602,

Ser608, Ser620, Ser621 y Ser668 (Olsen et al., 2006; Pozo-Guisado et al., 2010; Smyth et al., 2009). Sin embargo, los únicos residuos para los que se conoce la quinasa responsable de su fosforilación *in vivo* son los residuos Ser575, Ser608, Ser621 (Pozo-Guisado et al., 2010), objeto de estudio en esta Tesis doctoral.

5.2. STIM1 es una proteína de interacción con microtúbulos.

Un tema de intenso debate en la actualidad es la función del citoesqueleto y de los microtúbulos (MTs) en la regulación de SOCE y se ha sugerido que la localización y función de STIM1 está relacionada con la despolimerización de MTs (Berrueta et al., 1998; Morrison et al., 1998; Tirmauer and Bierer, 2000). En este sentido, se sabe que STIM1 se desplaza a través del RE asociada a MTs, y se ha demostrado que la inhibición de la despolimerización de MTs afecta a SOCE (Smyth et al., 2007). Otros estudios, sin embargo, no observaron ningún efecto sobre SOCE en células RBL-1 y células NIH-3T3 tratadas con nocodazol (Bakowski et al., 2001; Ribeiro et al., 1997).

En este sentido se ha descrito que STIM1 se une directamente a EB1 (end binding protein 1), un conocido regulador del crecimiento de los extremos (+) de los MTs (Grigoriev et al., 2008). Por ello se ha descrito a STIM1 como proteína de anclaje a extremos de MTs (+TIP, microtubule plus-end tracking protein), y se sabe que su localización celular depende de la formación de MTs (Grigoriev et al., 2008; Smyth et al., 2007). Sin embargo, no está claro cómo modulan los MTs la relocalización de STIM1 (y ORAI1) en yuxtaposiciones de la MP como resultado de la depleción de los depósitos de Ca^{2+} intracelulares. Trabajos posteriores han descrito un mecanismo que explica que cuando se produce la depleción de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares se induce la disociación de STIM1 y EB1 y la translocación de STIM1 hacia las yuxtaposiciones de MP-RE, donde STIM1 oligomeriza y se reorganiza en agregados que activan los canales SOC (Sampieri et al., 2009). Estos autores también observaron que STIM1 se reasocia con EB1 cuando los depósitos intracelulares de Ca^{2+} se rellenan, es decir, la asociación STIM1-EB1 es un proceso reversible.

Además, se ha probado que para la unión STIM1-EB1 es esencial una región de STIM1 que incluye a los residuos 642-645 (Thr-Arg-Ile-Pro o TRIP) (Grigoriev et al., 2008; Honnappa et al., 2009). Una secuencia similar (S/TxIP) se encuentra en otros +TIPs (Tamura and Draviam, 2012) y para algunas de las moléculas que interaccionan

con EB1, como CLASP y APC, es conocido que la fosforilación de las +TIPs regula la asociación a EB1 (Kumar et al., 2009; Watanabe et al., 2009; Zumbunn et al., 2001). Esta observación podría explicar por qué la fosforilación de STIM1 en regiones cercanas a esta secuencia regula su localización. En este sentido, estudios de nuestro laboratorio han probado que la fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2 regulan la unión STIM1-EB1 y consecuentemente la activación de SOCE (Pozoguizado et al., 2013). Dado que el rellenado de depósitos va acompañado de la desfosforilación de estos tres residuos, esta fosforilación reversible constituye un mecanismo que podría explicar la interacción reversible entre STIM1 y EB1. De hecho, los mutantes con sustituciones Ser/Ala de STIM1 no se disocian de EB1 tras el vaciado de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} , mientras que los mutantes Ser/Glu permanecen disociados de EB1 de forma constitutiva, incluso en condiciones de reposo.

Sin embargo, la fosfo-regulación de la interacción STIM1-EB1 podría ser más compleja, así la sustitución de Ser a Ala de 10 residuos de STIM1 provoca una deslocalización del RE que coloca a los MTs en el huso mitótico (Smyth et al., 2012). Estos resultados sugieren que la hiper-fosforilación de STIM1 es necesaria para mantener la estructura normal del RE en mitosis. Sin embargo, sería necesario monitorizar cada residuo por separado para determinar su implicación en este proceso.

6. STIM1 Y MIGRACIÓN CELULAR.

La migración celular es un proceso muy complejo y fuertemente regulado que requiere la coordinación de diversas moléculas señalizadoras, incluyendo algunas quinasas y fosfatasa (Lauffenburger and Horwitz, 1996; Webb et al., 2002). Para que la migración celular sea eficiente es necesaria la coordinación entre el frente de migración y la cola de retracción (Le Clainche and Carlier, 2008; Webb et al., 2002). Esto implica la formación de lamelipodios y protrusiones en el frente de avance, ciclos de adhesión-separación, contracción del cuerpo celular y retracción de la parte posterior de la célula en movimiento (Ridley et al., 2003).

La migración celular está implicada en numerosos procesos biológicos. Así, por ejemplo, durante la embriogénesis es esencial para el acoplamiento de algunos eventos morfogénicos clave, mientras que en los organismos adultos participa en procesos tanto fisiológicos, como es la respuesta inflamatoria o el cierre de heridas, como patológicos como es la metástasis en tumores.

6.1. Polaridad y migración celular.

Para algunos procesos fisiológicos y patológicos, como la morfogénesis embrionaria, el tráfico leucocitario o la invasión de células tumorales es necesaria la polarización de la migración. Esta polarización viene dada por el establecimiento de la protrusión de un frente de avance. En este sentido se ha descrito también que en este proceso existe una polarización del RE. La importancia de la localización del complejo RE/Golgi en el frente de avance se debe a su participación en la síntesis proteica, que suministra receptores y otras moléculas relevantes al frente de avance que optimizan la protrusión de la membrana. De hecho, el RE es un orgánulo móvil y dinámico dentro de la célula y tiene diversos roles, incluyendo no sólo la regulación de la homeostasis de Ca^{2+} , sino la dinámica de las adhesiones focales (Bola and Allan, 2009).

El flujo de Ca^{2+} es uno de los reguladores de la migración polarizada. Este flujo de Ca^{2+} está implicado en la direccionalidad del frente de avance de las células móviles (Wei et al., 2012) y existen evidencias sustanciales que respaldan la idea de que existe un elevado gradiente de Ca^{2+} en el eje frente/cola (Brundage et al., 1991; Gilbert et al., 1994; Lee et al., 1999; Wei et al., 2009).

6.2. Implicación de SOCE en la migración celular.

Además del establecimiento de la polaridad de la migración, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ regula otros procesos relacionados con la migración celular, como son la formación de adhesiones focales (FA) o la dinámica del citoesqueleto (Pettit and Fay, 1998). En este sentido, se han propuesto varios mecanismos relacionados con la entrada de Ca^{2+} que controlan eventos en el frente y en la cola de células en migración (Chen et al., 2010; Fabian et al., 2008; Lee et al., 1999; Tian et al.), siendo SOCE uno de ellos. Yang, S. *et al* probaron que el tratamiento con SKF96365, un inhibidor de SOCE, inhibe la migración de las células de cáncer de mama humanas MDA-MB-231, así como de las células tumorales de mama de ratón 4T1, lo que sugiere que la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos es necesaria para la migración celular (Yang et al., 2009).

En este sentido se sabe que STIM1 regula la señalización celular implicada en la migración (Tsai et al., 2014) y proliferación de células no tumorales (Li et al., 2012b; Rodriguez-Moyano et al., 2013; Somasundaram et al., 2014). Así mismo, se ha propuesto que la entrada de Ca^{2+} participa en la adhesión celular, migración y

proliferación de algunas células tumorales (Chen et al., 2011; Liu et al., 2011; Motiani et al., 2013; Yang et al., 2009).

Inicialmente STIM1 fue considerado como un gen supresor de tumores para inducir la muerte celular (Sabbioni et al., 1997). El RNAm de STIM1 se expresa en un gran número de tejidos humanos, especialmente en células linfoides y mieloides (Feske, 2009) y se ha comprobado que el nivel de expresión de STIM1 en tejidos tumorales se incrementa en más de un 70% de casos (Chen et al., 2011). Por otro lado, Yang *et al* (Yang et al., 2009) demostraron que el silenciamiento de STIM1 u ORAI1 inhibe la migración y la metástasis en células de cáncer de mama al bloquear el desensamblaje de adhesiones focales. Estudios posteriores han demostrado que STIM1 tiene una función crítica en la migración de cáncer cervical y que la sobre-expresión de STIM1 incrementa la migración e invasión de las células tumorales (Chen et al., 2011).

Además, también se ha observado que el silenciamiento de STIM1 o de ORAI1 reduce la migración en células de melanoma (Umemura et al., 2014). En contraste con estos resultados, otro estudio muestra que ORAI1 puede regular la tumorigénesis mamaria a través de una ruta independiente de STIM1 (Feng et al., 2010). Por otro lado se ha probado que STIM1 y ORAI1, pero no STIM2, ORAI2 u ORAI3, participan en la migración celular en células de músculo liso (Bisaillon et al., 2010; Potier et al., 2009).

7. EL Ca^{2+} REGULA LA FORMACIÓN DE ADHESIONES FOCALES.

El ensamblaje y desorganización de adhesiones focales (FAs) así como la dinámica del citoesqueleto son procesos imprescindibles para la migración celular (Berridge et al., 2000; Clark and Weaver, 2008; Howe, 2011; Webb et al., 2002). La formación de nuevas FAs en las protrusiones del frente de avance de células en migración confieren a la célula puntos de anclaje para que la red de actina genere fuerzas de tracción que muevan el cuerpo celular hacia delante, mientras que la desorganización de FAs en las zonas de retracción es necesaria para la retracción de la cola (Webb et al., 2002).

La formación de FAs está mediada por la interacción de integrinas con la matriz extracelular (ECM) (Webb et al., 2002) (figura 8). La unión de las células a la ECM requiere el agrupamiento de varias moléculas de integrinas en la superficie celular. La región citosólica que participa en el agregado de integrinas funciona como una

plataforma para el reclutamiento de otras proteínas que participan en la formación de FAs (Liu et al., 2000; Petit and Thiery, 2000; Webb et al., 2002). Algunas de las proteínas implicadas en la formación de FAs son talina, paxilina, zixina, tensina, p130Cas o α -actinina. En conjunto, estas moléculas proporcionan el anclaje entre el esqueleto de actina y la ECM (Burrige et al., 1992a; Burrige et al., 1992b; Geiger et al., 2001; Gluck and Ben-Ze'ev, 1994; Horwitz et al., 1986; Humphries et al., 2007).

En células en migración, las protrusiones celulares se forman por la polimerización de actina en el frente de avance (Webb et al., 2004; Webb et al., 2002) y por la señalización mediada por múltiples quinasas y fosfatasas. En particular, se han descrito dos tirosinas quinasas bien caracterizadas, (1) la quinasa de adhesiones focales (FAK) y (2) Src, que tienen una función central en las cascadas de señalización mediadas por integrinas (Frame, 2002; Frame et al., 2002; Mitra et al., 2005; Mitra and Schlaepfer, 2006). FAK sirve como regulador principal del ensamblaje/desorganización de las FAs y es una proteína organizadora del frente de avance. Las FAs nacientes se forman en la periferia celular mediante la interacción integrinas-ECM (Nagano et al., 2012)(Figura 8).

Otras proteínas importantes en la formación de FAs son paxilina y zixina, que son reclutadas al inicio del ensamblaje de FAs nacientes en el frente de avance. Ambas proteínas son necesarias para el reciclaje de FAs durante la migración celular. El mecanismo preciso que controla la dinámica de FAs aún no está del todo esclarecido, pero potencialmente implica la interacción de paxilina con el complejo FAK-Src, ya que éste último media la fosforilación de paxilina (Bellis et al., 1995; Cary et al., 1998; Schaller et al., 1995). Paxilina participa a su vez en el reclutamiento de otras moléculas para la regulación de la organización y el ensamblaje de las FAs. Estudios previos han sugerido que el incremento en el número y tamaño de las FAs en células que no expresan FAK y Src podría deberse a la inhibición del reciclaje de FAs (Ilic et al., 1995). Se ha visto también que la inhibición de varios componentes de señalización, que incluyen a las quinasas FAK, Src y ERK detienen el reciclaje de FAs, lo que sugiere una función importante de la fosforilación de los componentes de las FAs (Webb et al., 2004).

8. CORTACTINA Y MIGRACIÓN CELULAR.

Tal y como se ha comentado en el apartado anterior, un factor determinante en la migración celular es el establecimiento de protrusiones en la MP. Molecularmente estas protrusiones se forman por la polimerización y ramificación de moléculas de actina en el frente de avance. En este proceso es clave la participación de cortactina (CTTN), una proteína de unión a filamentos de actina, diana de múltiples quinasas y que ha sido propuesta como elemento central en la comunicación entre la señalización celular y la reestructuración del citoesqueleto (Wu and Parsons, 1993; Wu et al., 1991). CTTN participa en diversos procesos celulares que incluyen cambios en la MP, contribuyendo así a la organización del esqueleto de actina y a la morfología celular (von Holleben et al., 2011). Estos cambios son dependientes de la ramificación de actina-F (actina filamentosa) que a su vez regula la movilidad celular a través de lamelipodios, la endocitosis dependiente e independiente de clatrina, las interacciones hospedador-patógeno, el mantenimiento de la integridad de la barrera endotelial y la invasión celular mediada por invadopodios (Cosen-Binker and Kapus, 2006).

8.1. Estructura molecular de CTTN.

Estructuralmente, CTTN es una proteína monomérica de 80 kDa cuyo nombre deriva de su colocalización celular con la actina cortical situada en la periferia de la célula (Wu and Parsons, 1993). El extremo amino de CTTN incluye un dominio rico en aminoácidos ácidos (NTA, N-terminal acidic domain) que interacciona con el complejo Arp2/3 que promueve la dinámica de las ramificaciones de los filamentos de actina (Mullins et al., 1998). El dominio NTA de CTTN contiene un dominio DDW (Asp-Asp-Trp) que se ha observado en los sitios de unión a Arp2/3 de otros factores promotores de la nucleación o ramificación de actina (NPFs) como WASP y N-WASP (Weed et al., 2000).

Los NPFs se dividen en dos tipos en base a su función en la promoción de la ramificación de filamentos de actina (actina-F) mediada por Arp2/3 (Goley and Welch, 2006). Los NPFs de Clase I dirigen y promueven la activación de Arp2/3 que da lugar a la ramificación de filamentos de actina, mientras que los NPFs de Clase II como CTTN, participan en la formación y estabilización de las ramificaciones del ensamblaje dinámico de ramificaciones de actina (Egile et al., 2005; Weaver et al., 2001). Aunque CTTN puede activar directamente la formación de ramificaciones de F-actina a través

de la activación de Arp2/3, esta actividad es mucho más débil que la de los NPFs de Clase I (Weaver et al., 2001). Esto se debe en parte, a que CTTN bloquea los sitios de unión a actina globular (actina-G) de los NPFs de Clase I (Goley and Welch, 2006). En concordancia con la función de actina en la estabilización de las ramificaciones de filamentos, ésta tiene un dominio central que se une a actina-F (Weed et al., 2000; Wu and Parsons, 1993). Este dominio va seguido de una región en hélice y un dominio rico en prolina, que contiene múltiples sitios dianas de modificaciones postraduccionales (PTMs). A continuación encontramos un dominio SH3 (Src homology domain 3) que sirve para el reclutamiento de otras proteínas, incluyendo a los NPF de Clase I como N-WASP, en los puntos de ramificación de los filamentos de actina (Kirkbride et al., 2011) (figura 9).

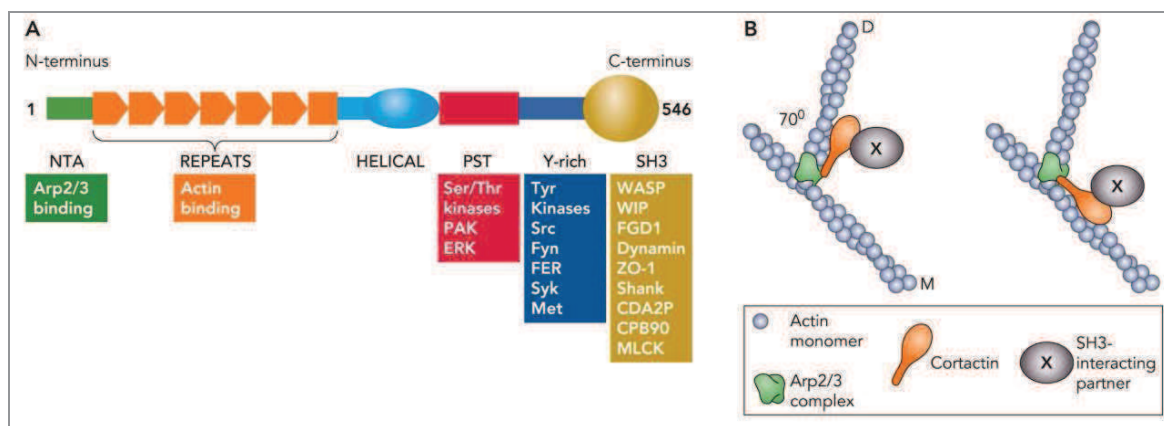


Figura 9: Estructura e interacciones de CTTN. (A) Principales dominios funcionales de CTTN (parte superior) y diferentes proteínas de unión a CTTN y quinasas que fosforilan a CTTN (parte inferior). (B) Formación de ramificaciones de actina. El complejo Arp2/3 activado se une al filamento madre (M) para dar lugar a la nucleación o formación de un filamento hijo (D). Los esquemas muestran dos posibles configuraciones no exclusivas de reorganización de CTTN cerca del punto de ramificación. En ambos casos, el extremo N-terminal de CTTN se une al complejo Arp2/3, mientras que la unión con actina-F tiene lugar tanto con el filamento madre (Uruno et al., 2003) como con el filamento hijo (Weaver et al., 2002). Por su parte el dominio SH3 del extremo C-terminal puede asociarse con diversas proteínas (X). (Cosen-Binker, LI *et al.* (2006) *Physiology* 21: 352-361).

8.2. Modificaciones postraduccionales de CTTN.

La regulación de cortactina mediante modificaciones postraduccionales (PTMs) es muy compleja y existen numerosas evidencias que sugieren un entrecruzamiento entre diferentes PTMs. La fosforilación de los residuos de serina S405, S418, S298 y S348 por varias quinasas diferentes como ERK, PAK o PKD1 regulan la actividad de

CTTN (Kirkbride et al., 2011). La fosforilación por ERK en las serinas S405/S418 en el dominio rico en prolina de CTTN induce un cambio conformacional que expone el dominio SH3, permitiendo el acoplamiento y la unión de los NPFs de Clase I como N-WASP o WASP que promueven la formación de ramificaciones de filamentos de actina (Martinez-Quiles et al., 2004). Por el contrario, la fosforilación de las tirosinas Y421, Y466 e Y482 por quinasas de la familia Src y probablemente otras tirosinas quinasas cuyos sitios dianas coinciden con estos residuos (Boyle et al., 2007; Sangrar et al., 2007), dan lugar a una inhibición de la formación de ramificaciones de actina-F mediada por Arp2/3 (Huang et al., 1997; Martinez-Quiles et al., 2004). Esta fosforilación recíproca entre la fosforilación de serinas y treoninas se conoce como el "intercambio S-H" (Lua and Low, 2005).

Existen también otras modificaciones postraduccionales que regulan la actividad de CTTN como la ubiquitinación o la acetilación. Toda este conjunto de modificaciones dan una visión de la complejidad en la comunicación cruzada entre las PTMs de CTTN y de cómo convergen las diferentes vías de señalización para regular la actividad de CTTN en los puntos de ramificación de los filamentos de actina.

8.3. Implicaciones fisiológicas de CTTN.

Las protrusiones celulares ricas en actina-F, conocidas como invadopodios, fueron identificadas originalmente en líneas celulares de cáncer humano y se denominaron así por su naturaleza invasiva (Chen, 1989). Los invadopodios son extensiones de la MP de 0,8-1 μm de diámetro y entre 2-5 μm de longitud y se encuentran en la zona basal de las extensiones de la MP que están en contacto con la ECM (Artym et al., 2006). La CTTN es esencial por su papel en la formación de invadopodios y por participar en la liberación de metaloproteasas, implicadas en la degradación de la ECM y la consecuente invasión de tejidos colindantes (Artym et al., 2006; Clark and Weaver, 2008; Clark et al., 2007). Se ha visto que en varios tipos de cáncer humano presentan un aumento en los niveles de expresión de CTTN, incluyendo cáncer de mama, colorrectal, ovárico, hepático, gástrico, esofágico, melanomas y glioblastomas (Kirkbride et al., 2011; MacGrath and Koleske, 2012). Consecuentemente CTTN se ha convertido en un importante biomarcador para los cánceres con metástasis malignas y su elevada expresión se asocia frecuentemente con pacientes con un mal pronóstico.

8.4. CTTN, migración y tumorigénesis.

Como hemos mencionado más arriba, se ha descrito que CTTN se localiza en zonas periféricas de la célula y en estructuras formadas por filamentos de actina, como lamelipodios y ruffles (ondulaciones) de membrana, participando en el entramado del citoesqueleto de actina. Además, CTTN regula varios aspectos de la dinámica celular, incluyendo la señalización de integrinas, el transporte vesicular, el direccionamiento de axones o la migración celular. Además, la sobre-expresión de CTTN en tumores humanos da lugar a un incremento en la migración celular y en el potencial metastático (Schuurin, 1995). En concordancia con este modelo, se ha visto que la sobre-expresión de CTTN en células NIH 3T3 da lugar a una mayor migración en comparación con células control que no sobre-expresan la proteína (Patel et al., 1998). De manera similar, cuando se transfectan células de cáncer de mama para la sobre-expresión de GFP-cortactina se produce un incremento significativo en la formación de metástasis en ratones. Además la inyección de células que sobre-expresan mutantes negativos de fosforilación de CTTN induce una reducción en el número de metástasis osteolíticas en ratones (Li et al., 2001). Otros estudios realizados con diferentes líneas de células de carcinoma hepatocelular con diferente capacidad metastática mostraron una correlación entre la expresión de CTTN y el potencial metastático (Chuma et al., 2004). En otro estudio, Rothschild y cols. examinaron la relación entre la amplificación de CTTN y la movilidad celular en células escamosas primarias de carcinomas de cabeza y cuello. Estos autores probaron que la sobre-expresión de CTTN está relacionada con la aparición de metástasis en nódulos linfáticos. Además, la reducción de la expresión de CTTN mediante el uso de siRNA bloqueaba la migración celular y la invasión (Rothschild et al., 2006).

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

Un paso previo a la invasión y a la formación de metástasis es la migración y se ha probado que la sobre-expresión de CTTN produce un incremento de la migración celular (Patel et al., 1998). Para iniciar la migración celular es necesaria la protrusión de la MP en forma de lamelipodios, que están asociadas a la dinámica de formación de ruffles de membrana (Yamaguchi et al., 2005). Estructuralmente los ruffles de membrana están formados por el entrecruzamiento de filamentos de actina mediado por CTTN (Pollard and Borisy, 2003; Small et al., 2002). Así mismo, CTTN participa en el

ensamblaje/desorganización de FAs. Como ya se ha comentado, la dinámica de FAs es dependiente de la señalización por Ca^{2+} y especialmente de la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos intracelulares (Franco et al., 2004; Giannone et al., 2004; Tsai and Meyer, 2012). Dado que CTTN participa en la comunicación entre la señalización celular y la reestructuración del citoesqueleto (Wu and Parsons, 1993; Wu et al., 1991) en este trabajo estudiaremos la posible relación entre SOCE, y más concretamente STIM1 y la dinámica de CTNN que subyace a la formación de ruffles en el frente de avance de células en migración.

OBJETIVOS

El Ca^{2+} es un segundo mensajero universal que regula un amplio número de procesos celulares. La diversidad de respuestas celulares radica en las diferencias temporales y espaciales de la señalización mediada por Ca^{2+} , así como en la participación de diferentes moléculas sensibles a las variaciones de la concentración citosólica de este ion. En este sentido, se sabe que los canales SOC están implicados en este proceso de señalización en el que participan, entre otras, las proteínas STIM1 y ORAI1. Estudios previos de nuestro grupo de investigación han mostrado que la fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2 podría estar relacionada con la modulación de SOCE. La relevancia de la modulación del transporte de Ca^{2+} es determinante para varias funciones fisiológicas, por lo que en esta Tesis Doctoral nos hemos planteado como objetivo determinar el efecto de la fosforilación de STIM1 en sitios dianas de ERK1/2 en la modulación de SOCE y los efectos fisiológicos de esta fosforilación. Por todo ello los objetivos de este trabajo son:

1. Definir la cinética de la entrada de calcio operada (regulada) por depósitos intracelulares (SOCE) en células HEK293 tras inhibición de la bomba de Ca^{2+} de retículo sarcoendoplasmático. Definir la cinética de la multimerización de STIM1 y su aproximación hacia regiones próximas a la membrana plasmática en respuesta al vaciado de depósitos intracelulares, así como la reversión de este proceso en respuesta al llenado de depósitos.
2. Determinar el patrón de fosforilación de STIM1 en HEK293 tras estimulación con IGF-1 y su efecto sobre los procesos de multimerización de STIM1 y activación de SOCE, así como sobre la translocación nuclear del factor de transcripción NFAT.
3. Estudiar la posible función de la fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2 en la migración celular en mioblastos C2C12.
4. Estudiar la función de STIM1 sobre la cinética del ensamblaje/desorganización de adhesiones focales en mioblastos C2C12 estimulados con IGF-1.

RESULTADOS

1. LA FOSFORILACIÓN DE STIM1 MODULA SOCE.

Como se ha descrito ampliamente en el apartado de Introducción, SOCE es un mecanismo de influjo de Ca^{2+} a través de canales localizados en la membrana plasmática que se activan en función del estado de llenado de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares, principalmente el retículo endoplasmático (RE). Por otra parte está bien documentado que la inhibición de la Ca^{2+} -ATPasa del retículo endoplasmático (SERCA) con tapsigargina (Tg) permite la depleción de los depósitos intracelulares (Lytton et al., 1991; Thastrup et al., 1990) induciendo así la activación de SOCE. En este proceso es clave la participación de STIM1, una fosfoproteína que tras el vaciado de depósitos multimeriza y relocaliza a regiones cercanas a la membrana plasmática donde interacciona con canales SOC como ORAI1 o canales de la familia TRPC activando la entrada de Ca^{2+} . En este sentido, estudios recientes de nuestro grupo de investigación revelan que la fosforilación de STIM1 en sitios dianas de ERK1/2 modula su actividad (Pozo-Guisado et al, 2010).

Con el objetivo de determinar el papel de la fosforilación de STIM1 en los residuos diana de ERK1/2 se generaron líneas celulares HEK293 transfectadas de forma estable para la expresión inducible de STIM1-GFP y Flag-STIM1 mediante la adición de doxiciclina (Dox) al medio de cultivo. En este trabajo hemos utilizado células HEK293 que sobre-expresan diferentes mutantes de STIM1 para emular una fosforilación constitutiva de la proteína (STIM1-S575E/S608E/S621E) o una desfosforilación constitutiva de la proteína (STIM1-S575A/S608A/S621A). Con estas herramientas se ha estudiado el efecto de la fosforilación de STIM1 en residuos diana de ERK1/2 durante los procesos de (I) entrada de calcio operada por depósitos (SOCE), (II) multimerización, (III) relocalización, (IV) e interacción de STIM1 con canales SOC tras inducir el vaciado de los depósitos intracelulares con Tg.

1.1. Medida de la entrada de calcio operada por depósitos intracelulares (SOCE).

La medida de SOCE se llevó a cabo mediante el protocolo estándar que se indica en el apartado de Materiales y Métodos. De forma abreviada, las células HEK293 se cargaron con fura-2-AM y se trataron con tapsigargina (Tg) en medio libre de Ca^{2+} para inducir el vaciado de los depósitos intracelulares. Tras 10 minutos de tratamiento con Tg se añadió CaCl_2 2 mM al medio extracelular y se cuantificó el incremento de la

concentración de Ca^{2+} libre citosólico (figura 10). El tratamiento con Tg produjo un incremento rápido y transitorio del ratio F340:F380, que es indicador de la salida de Ca^{2+} del RE. La rápida disminución posterior de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hasta niveles basales puede ser explicada por la extrusión de Ca^{2+} al espacio extracelular por la PMCA (Plasma Membrane Ca^{2+} ATPasa), insensible a Tg. La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ observada en estas condiciones tras añadir CaCl_2 2 mM al medio extracelular es debida principalmente a la apertura de los canales SOCs. Sin embargo, el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es el resultado de la actividad combinada de SOCE junto con canales de Ca^{2+} intracelular, bombas, intercambiadores y moléculas tamponadoras.

Cuando se midió SOCE en células HEK293 se observó un aumento en el ratio F340:F380 en aquellas células que sobre-expresaban Flag-STIM1-WT frente a aquellas que sólo expresaban STIM1 endógeno, lo que demuestra que la sobre-expresión de STIM1 induce un mayor nivel de SOCE en células HEK293 (figura 10A), en respuesta al vaciado de depósitos. Por otro lado, el pico transitorio de Ca^{2+} que se observa justo tras la adición de Tg sugiere que la liberación de Ca^{2+} desde el RE no se ve alterada por la sobre-expresión de STIM1.

Cuando medimos SOCE en células que sobre-expresaban Flag-STIM1 con los residuos S575, S608 y S621 mutados a Ala, que simula una desfosforilación constitutiva de estos residuos, se observó una disminución de SOCE hasta niveles similares a los observados en células que expresan exclusivamente STIM1 endógeno. Estos datos sugieren que la fosforilación de STIM1 en los residuos S575, S608 y S621 es necesaria para la completa activación de SOCE.

En este trabajo se ha estudiado el efecto de la fosforilación constitutiva de estos residuos de STIM1 sobre SOCE. Para ello se han generado líneas celulares que sobre-expresan de forma estable STIM1 con los residuos S575, S608 y S621 mutados a Glu, mimetizando así una fosforilación constitutiva de estos residuos. Siguiendo el protocolo descrito previamente por nuestro grupo (Pozo-Guisado et al., 2010) se midió SOCE en células que expresan Flag-STIM1-WT y células que expresan Flag-STIM1-S575E/S608E/S621E (figura 10B). En este caso, al contrario de lo ocurre para el mutante con sustituciones Ser/Ala, el incremento de Ca^{2+} citosólico generado por la entrada de Ca^{2+} a través de canales SOC es similar en células que sobre-expresan STIM1-WT y células que sobre-expresan STIM1 con mutaciones Ser/Glu. Esto indica

que la fosforilación de STIM1 en los residuos Ser575, Ser608 y Ser621 permite la activación de los canales SOC y la consecuente entrada de Ca^{2+} .

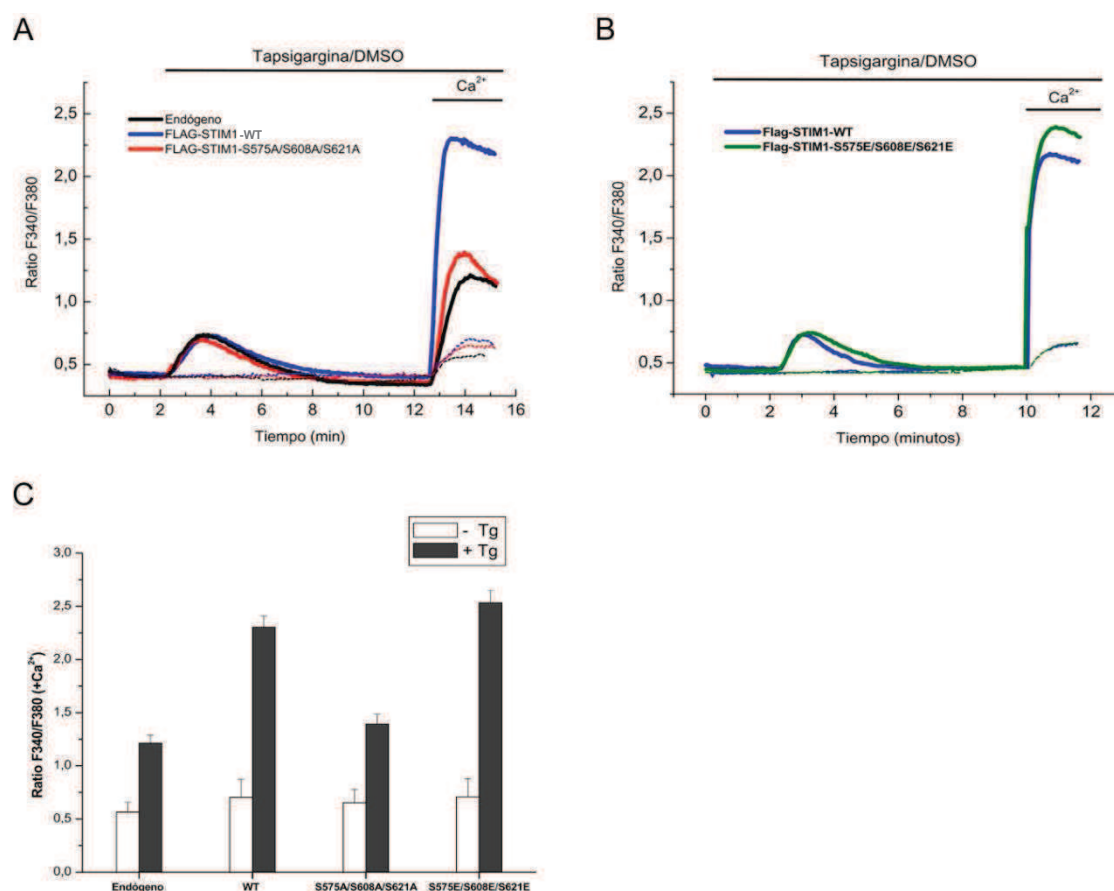


Figura 10. Medida de SOCE en células HEK293 que sobre-expresan Flag-STIM1-WT, Flag-STIM1-S575A/S608A/S621A y Flag-STIM1-S575E/S608E/S621E. *Panel A:* los cultivos celulares se incubaron con medio DMEM sin suero durante 12-16 horas con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Dox (líneas rojas y azules) o sin Dox, es decir, sólo expresan STIM1 endógeno (líneas negras). Para evaluar SOCE células HEK293 que sobre-expresan Flag-STIM1-WT o STIM1-S575A/S608A/S621A se cargaron con fura-2 y se les añadió Tg 1 μM (líneas sólidas) o DMSO (líneas discontinuas) en medio sin Ca^{2+} seguida de la adición de Ca^{2+} 2 mM. El ratio F340:F380 se monitorizó por epifluorescencia como se describe en Materiales y Métodos. *Panel B:* Igual que en panel A pero en este caso se midió SOCE en líneas celulares que sobre-expresan Flag-STIM1-WT y Flag-STIM1-S575E/S608E/S621E. *Panel C:* se muestran los resultados obtenidos para las tres líneas de estudio en el momento de la adición de Ca^{2+} extracelular, las barras blancas representan el ratio F340/F380 en ausencia de Tg (DMSO), las barras negras representan el aumento del ratio en células tratadas con Tg.

Tal y como se ha comentado previamente, STIM1 es una proteína localizada en la membrana del RE que sirve de sensor de Ca^{2+} dentro de este orgánulo. Cuando la concentración de Ca^{2+} intraluminal disminuye por debajo de un determinado umbral, STIM1 multimeriza y relocaliza en yuxtaposiciones RE-MP donde interacciona con

canales SOC. Para determinar cuáles son las diferencias funcionales producidas por la fosforilación de STIM1 nos dispusimos a estudiar el proceso de activación de la proteína STIM1 tras el vaciado de los depósitos de Ca^{2+} . De esta manera se pretende determinar el origen de las diferencias observadas en la activación de SOCE entre células que sobre-expresan Flag-STIM1-WT, Flag-STIM1-S575A/S608A/S621A y Flag-STIM1-S575E/S608E/S621E, para así determinar el papel que tiene la fosforilación de estos residuos en el proceso de activación de los canales SOC.

2. MULTIMERIZACIÓN DE STIM1 EN RESPUESTA AL VACIADO DE DEPÓSITOS INTRACELULARES DE Ca^{2+} .

2.1. Fenotipo de la multimerización de STIM1.

Para estudiar la multimerización de STIM1 se utilizaron células HEK293 que sobre-expresan de forma estable e inducible STIM1-GFP. La distribución de STIM1 se determinó mediante microscopía de fluorescencia en células en reposo o tras el vaciado de depósitos intracelulares. Estos experimentos se llevaron a cabo siguiendo el protocolo estándar descrito en Materiales y Métodos. Para ello se trataron las células con Tg 1 μM durante 5 minutos en HBSS libre de Ca^{2+} y como control negativo de la multimerización se utilizaron células incubadas con HBSS libre de Ca^{2+} en ausencia de Tg.

En la figura 11 podemos observar la distribución homogénea de STIM1-WT-GFP en estado basal y la agregación en multímeros de la proteína tras el tratamiento con Tg. Por otro lado, las proteínas mutantes STIM1-S575A/S608A/S621A-GFP y STIM1-S575E/S608E/S621E-GFP presentan un comportamiento similar a STIM1-WT-GFP, formándose agregados en todos los casos tras inducir el vaciado de depósitos intracelulares.

Estos resultados sugieren que la fosforilación de STIM1 por ERK1/2 no es en principio esencial para la agregación de STIM1 inducida por el vaciado de depósitos, puesto que los dos mutantes presentan un fenotipo similar al wild-type.

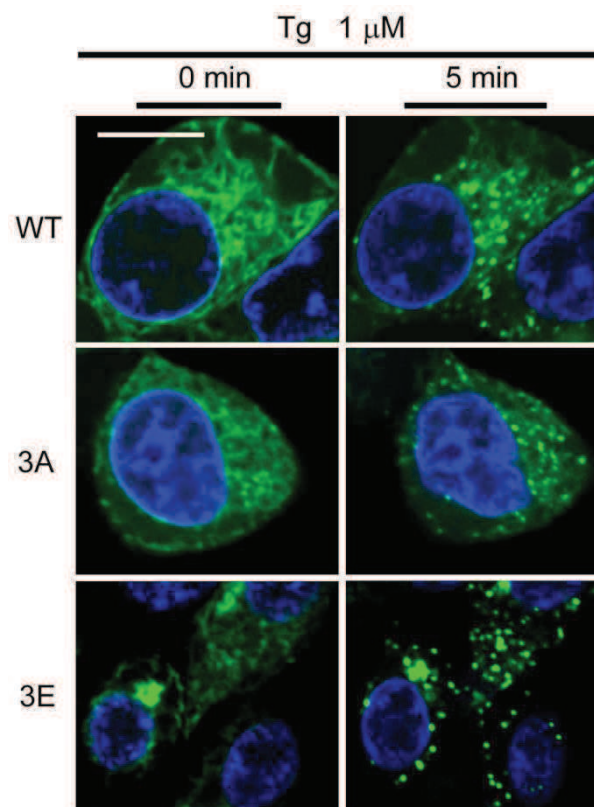


Figura 11. Multimerización de STIM1 en células HEK293 tras vaciado de depósitos. Células HEK293 que sobre-expresan STIM1-WT-GFP (WT), STIM1-S575A/S608A/S621A-GFP (3A) o STIM1-S575E/S608E/S621E-GFP (3E) se incubaron en HBSS libre de Ca^{2+} en ausencia (izquierda) o presencia de Tg $1 \mu\text{M}$ (derecha). Tras cinco minutos de tratamiento las células fueron fijadas con paraformaldehído 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente y se visualizaron bajo microscopía confocal. En reposo la proteína presenta una distribución homogénea. Barra de escala = $10 \mu\text{m}$.

2.2. Estudio de la cinética de multimerización de STIM1.

Una vez observado el comportamiento de las tres líneas celulares en reposo y tras el tratamiento con Tg, se realizó un seguimiento de la cinética de la multimerización. Para ello se trataron las distintas líneas celulares con Tg y se siguió la multimerización de STIM1 mediante la obtención de imágenes de epifluorescencia a distintos tiempos de tratamiento.

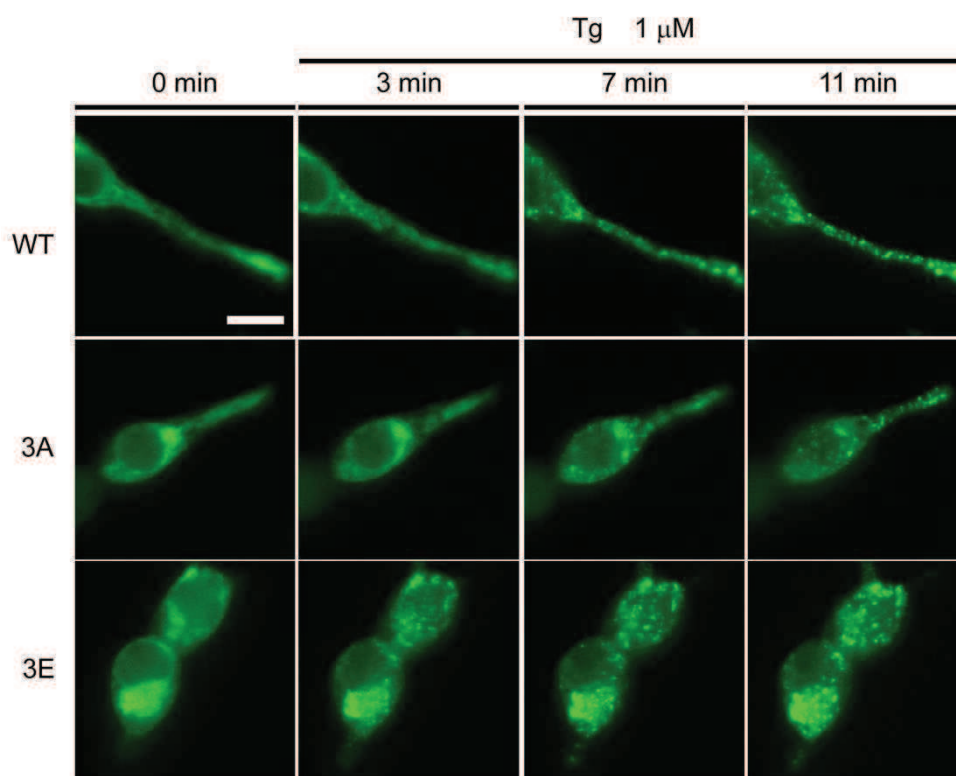


Figura 12. Cinética de la multimerización de STIM1 en células HEK293 tras el vaciado de depósitos intracelulares de Ca^{2+} . Las células que sobre-expresan STIM1-WT-GFP (WT), STIM1-S575A/S608A/S621A-GFP (3A) o STIM1-S575E/S608E/S621E-GFP (3E) se trataron con Tg $1 \mu\text{M}$ durante 11 minutos, a 30°C , y la multimerización se analizó registrando las imágenes de epifluorescencia. Barra de escala = $10 \mu\text{m}$.

Los resultados obtenidos muestran una cinética de multimerización más lenta para las células que sobre-expresan STIM1-S575A/S608A/S621A-GFP que en el caso de las células que sobre-expresan STIM1-WT-GFP, al menos durante los 5 primeros minutos tras la adición de Tg. A medida que transcurre el tiempo de tratamiento con la droga el número de multímeros va aumentando, siendo máximo en el minuto 11 de tratamiento. Por otro lado, las células que sobre-expresan STIM1-S575E/S608E/S621E-GFP presentan una cinética de multimerización mucho más rápida, observándose multímeros tras sólo 3 minutos de tratamiento con Tg. En este caso el tiempo de máxima multimerización se alcanza en el minuto 8, permaneciendo invariable hasta el final del tratamiento (minuto 11). La figura 12 muestra las imágenes de este ensayo en reposo y tras 3, 7 y 11 minutos con Tg.

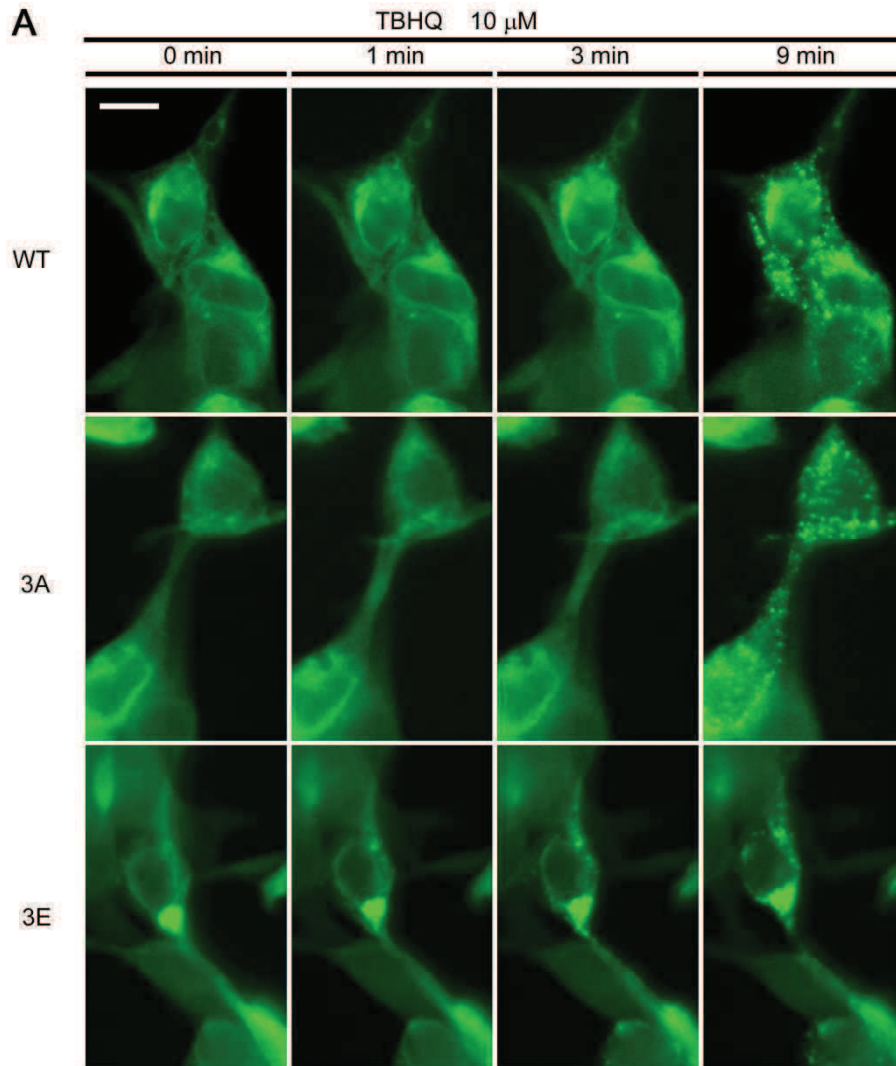
2.3. Cinética y reversibilidad de la multimerización de STIM1.

Tras la depleción de la concentración de Ca^{2+} intraluminal STIM1 oligomeriza y relocaliza en agregados, produciéndose un acercamiento entre la membrana del RE y la membrana plasmática (Liou et al., 2007; Muik et al., 2008). Por este motivo, se llevaron a cabo experimentos que nos permitieron determinar la reversibilidad del proceso de multimerización de STIM1 tras el rellenado de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} . Para ello se indujo el vaciado de Ca^{2+} del RE con un inhibidor reversible de la SERCA, 2,5-di-tert-butilhidroquinona (TBHQ) (Kass et al., 1989), que puede ser lavado con mayor facilidad que la tapsigargina. De esta manera, tras inducir la multimerización de STIM1 con TBHQ, la droga se lavó con HBSS, que contiene 1.5 mM de Ca^{2+} , permitiéndose así la activación de la SERCA, el rellenado de Ca^{2+} del RE y por tanto la reversión de la multimerización de STIM1. Para ello se utilizaron nuevamente las tres líneas celulares transfectadas de forma estable con STIM1-GFP: (1) STIM1-WT, (2) STIM1-S575A/S608A/S621A y (3) STIM1-S575E/S608E/S621E.

La figura 13A muestra las imágenes obtenidas para las 3 líneas celulares a diferentes tiempos de tratamientos con TBHQ. A tiempo cero las células muestran una distribución homogénea de la proteína recombinante (células en HBSS libre de Ca^{2+} suplementado con EGTA 100 μM) y de la misma forma que habíamos observado con Tg, el tratamiento con TBHQ 10 μM indujo un proceso de multimerización de STIM1 más lento para la línea STIM1-S575A/S608A/S621A-GFP (3A) y mucho más rápido para la línea celular STIM1-S575E/S608E/S621E-GFP (3E), ambos comparados con la línea que sobre-expresa STIM1-WT-GFP (WT). Cabe destacar que a tiempo final (9 minutos) del tratamiento el grado de multimerización de STIM1-S575E/S608E/S621E-GFP y STIM1-WT-GFP es similar, mientras que las células STIM1-S575A/S608A/S621A-GFP presentan un menor grado de multimerización.

Una vez alcanzado el máximo grado de multimerización de STIM1 en presencia de TBHQ se procedió a la eliminación de esta droga lavando las células con HBSS cada 10 segundos durante 1 minuto (figura 13B). De este modo se consigue eliminar la inhibición de la SERCA y se permite el rellenado de los depósitos intracelulares. Esto provoca que la multimerización de STIM1 revierta. En el caso de la proteína recombinante STIM1-WT la reversión de la multimerización es patente a partir del minuto 3 en la solución de lavado. En el caso de STIM1-S575A/S608A/S621A-GFP se

observa una cinética de reversión de la multimerización más rápida, de forma que tras sólo 3 minutos en solución de lavado desaparecen todos los multímeros. Sin embargo, en el caso de STIM1-S575E/S608E/S621E-GFP la cinética de reversión es más lenta. Además, en ningún caso se llega a una reversión completa, permaneciendo algunos agregados al final de los lavados.



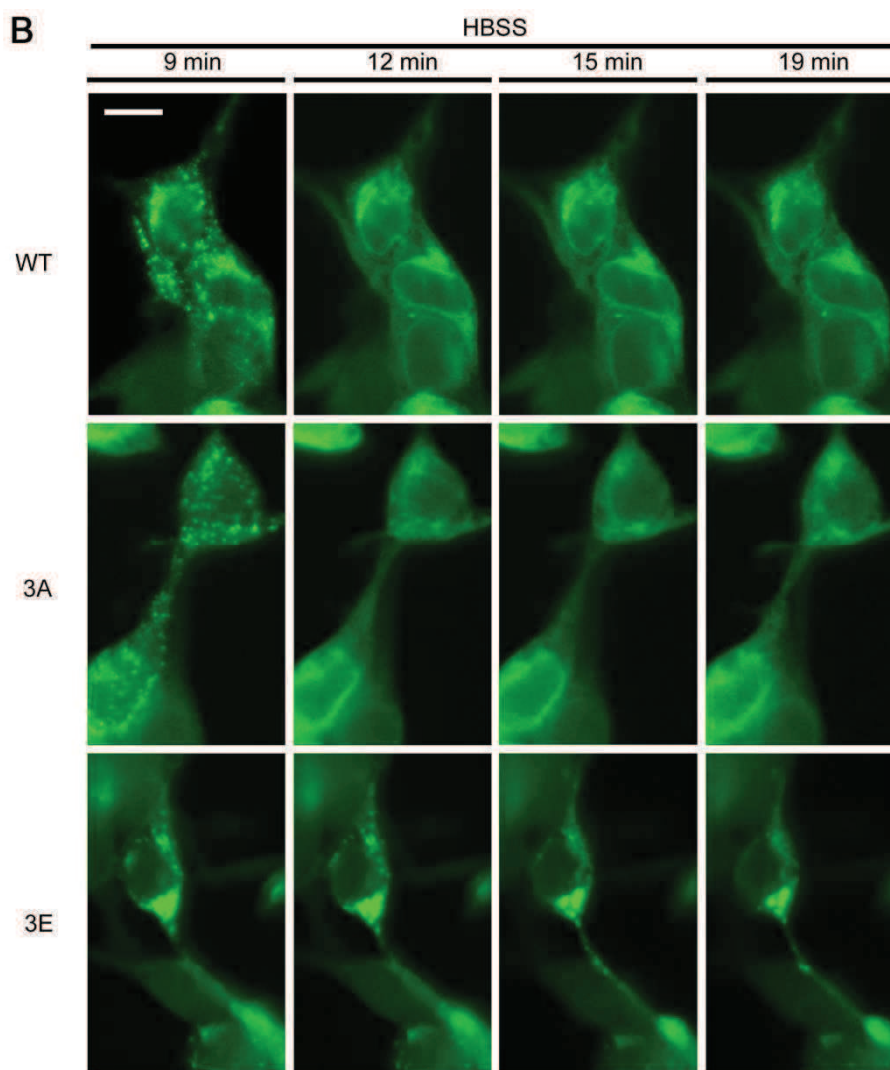


Figura 13. Cinética de multimerización y reversión de la multimerización de STIM1-GFP. Las células que expresan STIM1-GFP de manera inducible (STIM1-WT-GFP (WT), STIM1-S575A/S608A/A621A-GFP (3A) o STIM1-S575E/S608E/S621E (3E)) se trataron con TBHQ 10 μ M en HBSS libre de Ca^{2+} para inducir el vaciado de los depósitos intracelulares y se visualizaron con un microscopio de fluorescencia. *Panel A*: fotogramas correspondientes a los minutos de tratamiento: 0 (reposo), 1, 3 y 9 (multimerización máxima). *Panel B*: tras alcanzarse el máximo de multimerización de STIM1-GFP en presencia de TBHQ, la droga se lavó con HBSS para inducir la reversión de la multimerización. El panel B muestra los fotogramas correspondientes a los minutos: 9 (máxima multimerización), 12, 15 y 19 (máxima reversión). Barra de escala = 10 μ m.

Para cuantificar el porcentaje de células que presentaban multímeros de STIM1-GFP se realizó un ensayo similar al mostrado en el párrafo anterior, pero fijando las células a diferentes tiempos (minutos 0, 2, 3, 4, 9, 11, 12, 13 y 19) con paraformaldehído al 4% y cuantificando el número de células que mostraban una multimerización patente de STIM1-GFP. Las células se trataron con TBHQ de 0 a 9 minutos (máxima multimerización) y a partir del minuto 9 se lavaron con HBSS como

en el caso anterior, hasta alcanzar los 10 minutos de lavado. Se realizaron al menos cinco observaciones de campos aleatorios en los que se hizo un recuento de al menos 200 células por ensayo.

El análisis del recuento de células con multimerización de STIM1-GFP se muestra en la figura 14. Estos resultados indican que el 70% de las células que sobreexpresan STIM1-GFP muestran una multimerización de esta proteína a tiempo final de tratamiento con TBHQ (9 min), mientras que sólo el 40% de las células que expresan STIM1-S575A/S608A/S621A-GFP presentan multimerización de la misma tras el tiempo de incubación con el inhibidor de la SERCA, TBHQ. Por otro lado STIM1-S575E/S608E/S621E-GFP se encuentra multimerizada en el 80% de las células al final del tratamiento con TBHQ, resultado similar al observado para la proteína silvestre; sin embargo, esta mutación hace que STIM1 muestre una mayor dificultad para revertir la multimerización de forma completa. En definitiva, y a partir de los resultados mostrados en la figura 14, podemos afirmar que la multimerización de STIM1-S575E/S608E/S621E presenta una cinética de reversión de la multimerización más lenta que la proteína nativa.

En resumen podemos decir que la fosforilación constitutiva de STIM1 en los residuos S575, S608 y S621 (STIM1-S575E/S608E/S621E) provoca algún cambio en la proteína STIM1 que ralentiza o dificulta la reversibilidad de la multimerización una vez que se han llenado los depósitos intracelulares de Ca^{2+} . Por el contrario, la desfosforilación constitutiva de estos residuos (STIM1-S575A/S608A/S621A) conduce a un menor número de células con multimerización que la obtenida para el caso del wild-type. En el caso de STIM1-S575A/S608A/S621A el proceso de reversión de la multimerización presenta un patrón muy similar al obtenido para la línea wild-type. Así, estos resultados indican que la fosforilación/desfosforilación de estos residuos está implicada de alguna forma en el proceso de multimerización de STIM1. De esta manera podemos sugerir que es necesaria una fosforilación reversible de la proteína para obtener una cinética similar a la de la proteína wild-type, ya que tanto la fosforilación como la desfosforilación constitutiva de estos tres residuos dan lugar a patrones de multimerización de STIM1 que se alejan del comportamiento de la línea wild-type. Es más, nuestros resultados sugieren que la fosforilación es necesaria para la agregación de las moléculas de STIM1 mientras que la desfosforilación de estos residuos parece estar implicada la reversión de la multimerización.

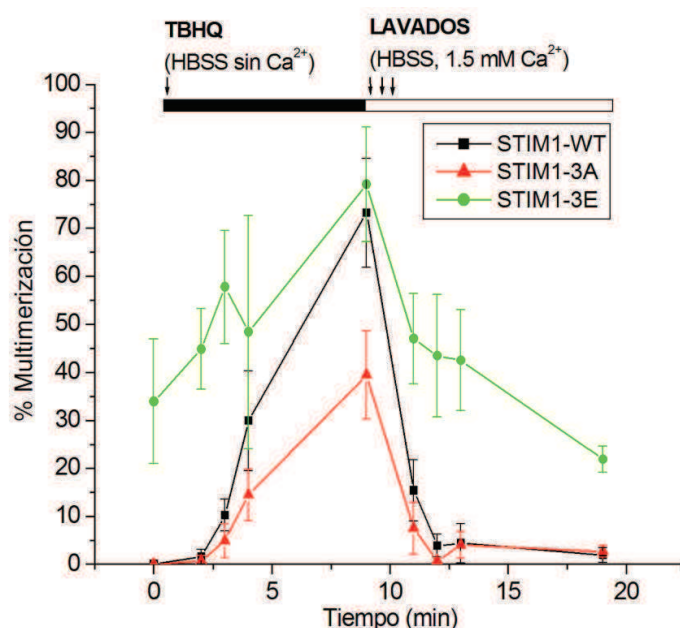


Figura 14. Cinética de la multimerización y reversión de la multimerización de STIM1-GFP. Células HEK293 que sobre-expresaban STIM1-WT-GFP (STIM1-WT), STIM1-S575A/S608A/S621A-GFP (STIM1-3A) o STIM1-S575E/S608E/S621E-GFP (STIM1-3E) se incubaron en HBSS sin Ca^{2+} con $10 \mu\text{M}$ TBHQ a 30°C . El porcentaje de células que presentaban multimerización de STIM1-GFP se analizó en las diferentes líneas celulares fijadas con paraformaldehído y marcadas con Hoechst 33342 tras 0, 2, 3, 4 y 9 minutos de tratamiento con TBHQ y tras el lavado de la droga con HBSS con Ca^{2+} (minutos 11, 12, 13 y 19). Para ello se realizaron al menos cinco observaciones de campos aleatorios y se hizo un recuento de al menos 200 células por ensayo a partir de tres cultivos diferentes.

2.4. Fosforilación reversible de STIM1 en sitios dianas de ERK1/2.

Estudios previos demuestran que STIM1 se fosforila en sitios dianas de ERK1/2 tras el bloqueo de la SERCA con Tg (Pozo-Guisado et al., 2010) y que esta fosforilación activa la multimerización de STIM1. Decidimos, por tanto, estudiar el patrón de fosforilación de STIM1 que subyace a la cinética de multimerización/reversión inducida por el tratamiento con TBHQ. Es decir, queríamos estudiar si la fosforilación de STIM1 en sitios dianas de ERK1/2 discurre en paralelo a la multimerización de la proteína. Para estudiar si la fosforilación de STIM1 se revierte con la inhibición de SOCE se trataron con TBHQ $10 \mu\text{M}$ células HEK293 que sobre-expresan STIM1-GFP en HBSS sin Ca^{2+} durante 10 min. A continuación el TBHQ se eliminó lavando con HBSS con Ca^{2+} durante 5-15 min adicionales para facilitar el rellenado de los depósitos intracelulares. Los lisados totales se utilizaron para monitorizar la fosforilación de STIM1 utilizando para ello anticuerpos específicos anti-fosfo-Ser575-STIM1, anti-fosfo-Ser608-STIM1 y anti-fosfo-Ser621-STIM1.

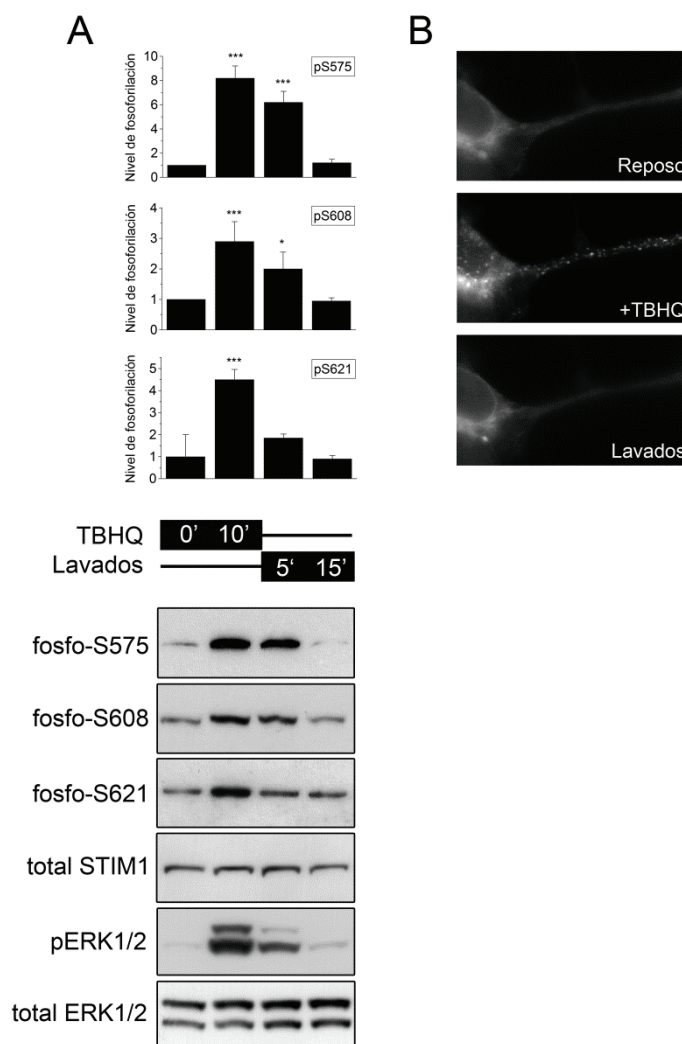


Figura 15. Fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2. *Panel A:* las células HEK293 que expresan de forma estable STIM1-GFP se incubaron en HBSS sin Ca^{2+} , con o sin la adición de TBHQ 10 μM durante 10 min. A continuación, las células se lavaron (tres lavados) con HBSS con Ca^{2+} y se incubaron en este medio durante 5-15 min. Los lisados totales se utilizaron para detectar los fosfo-residuos con los anticuerpos fosfo-específicos (fosfo-S575, fosfo-S608 y fosfo-S621). La cantidad total de STIM1 se evaluó utilizando un anticuerpo anti-GFP. La activación de ERK1/2 se monitorizó con un anticuerpo anti-fosfo-(pThr202/pTyr204) ERK1/2 (rotulado como pERK1/2). La cuantificación del nivel de fosforilación se realizó por densiometría utilizando el software ImageJ. Los blots son representativos de tres experimentos diferentes; los datos corresponden a los cálculos de la media \pm s.d. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ en comparación con el control (TBHQ 0 min). *Panel B:* las células HEK293 que expresan establemente STIM1-GFP se trataron como se describe en (A): con TBHQ 10 μM en HBSS sin Ca^{2+} y se observaron con un microscopio de fluorescencia. A continuación, se lavaron las células con HBSS con Ca^{2+} para eliminar el TBHQ. Las imágenes fueron tomadas cada 10 segundos utilizando longitudes de onda de excitación/emisión para GFP. La figura muestra el estado inicial de reposo (parte superior), multimerización de STIM1-GFP tras el tratamiento con TBHQ (panel central), y reversión de la

multimerización tras el lavado de TBHQ y la adición de Ca^{2+} (panel inferior). ((*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$)).

La figura 15 muestra cómo el tratamiento con TBHQ induce la fosforilación de STIM1 en los sitios diana de la actividad quinasa ERK1/2. Los resultados obtenidos muestran, además, cómo el relleno de los depósitos intracelulares ocurre en paralelo a la desfosforilación de STIM1 en los residuos Ser575, Ser608 y Ser621. Una explicación sencilla para este resultado podría ser la inhibición de la actividad de ERK1/2 por fosfatasas específicas durante el relleno de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} . Para probar esta hipótesis se monitorizó el nivel de fosfo-ERK1/2 bajo las mismas condiciones experimentales, y se observó que ERK1/2 se desfosforila rápidamente tras la entrada de Ca^{2+} y el relleno de los depósitos intracelulares. Aunque la identificación molecular de las fosfatasas implicadas en este proceso no es objetivo de este trabajo, se demuestra aquí la correlación entre la desfosforilación de ERK1/2, es decir, la inactivación de esta quinasa, y la desfosforilación de STIM1 en condiciones de relleno de depósitos de Ca^{2+} .

3. ESTUDIO DE LA RELOCALIZACIÓN DE STIM1 MEDIANTE MICROSCOPIA TIRF.

Como ya se ha comentado en esta memoria, la activación de los canales SOC lleva asociadas tres etapas previas bien diferenciadas: la multimerización de la proteína STIM1, la relocalización de estos multímeros hasta zonas próximas a la membrana plasmática y finalmente la interacción con los canales SOCs que conduce a su activación. Por tanto, una vez estudiado cómo afecta la fosforilación de los residuos Ser575, Ser608 y Ser621 a la multimerización de STIM1, se analizó la relocalización de la proteína STIM1 hacia zonas próximas a la membrana plasmática, tras inducir el vaciado de depósitos con Tg, empleando para ello células que sobre-expresan STIM1-GFP y STIM1-S575E/S608E/S621E-GFP.

Mediante microscopía TIRF se puede seguir la distribución de la proteína recombinante en una sección de la célula distante unos 200 nm de la membrana plasmática. Esta técnica permite por ello monitorizar la aproximación de STIM1 a la membrana plasmática que se produce al inducir el vaciado de depósitos por la adición de Tg, en célula viva. Siguiendo el protocolo estándar descrito en Materiales y Métodos, se trataron las células con Tg 1 μM en HBSS libre de Ca^{2+} . En la figura 16 podemos

observar que en reposo (tiempo 0) la distribución de la proteína es homogénea. Tras un minuto de tratamiento con Tg apenas se observan cambios, es decir, la célula presenta una distribución de la proteína muy similar al estado inicial no estimulado, pero transcurridos 3 minutos comienzan a observarse los primeros multímeros de STIM1-GFP, y tras 12 minutos con Tg se observan con claridad multímeros a una distancia inferior a 200 nm de la membrana plasmática. Cabe destacar que los agregados de STIM1 se hacen muy patentes a partir del minuto 5 del ensayo, dos minutos más tarde que en la observación de la multimerización por epifluorescencia. Esto es debido a que con microscopía TIRF se selecciona una sección próxima a la periferia celular, y por tanto los multímeros sólo son visibles cuando alcanzan este plano, mientras que con epifluorescencia pueden verse los agregados de toda la célula y no sólo cuando estos se desplazan hacia la membrana plasmática para activar los canales SOCs.

Por otra parte, se tomaron también imágenes de microscopía confocal (figura 16, panel B) al inicio del experimento (reposo) y al final del ensayo (vaciado de depósitos por adición de Tg) con el objetivo de conocer la distribución de la proteína en secciones más distantes de la membrana plasmática. STIM1 presentó una distribución homogénea antes de la adición de la droga, y tras 12 minutos de tratamiento se observó un elevado grado de multimerización de la proteína (figura 16B).

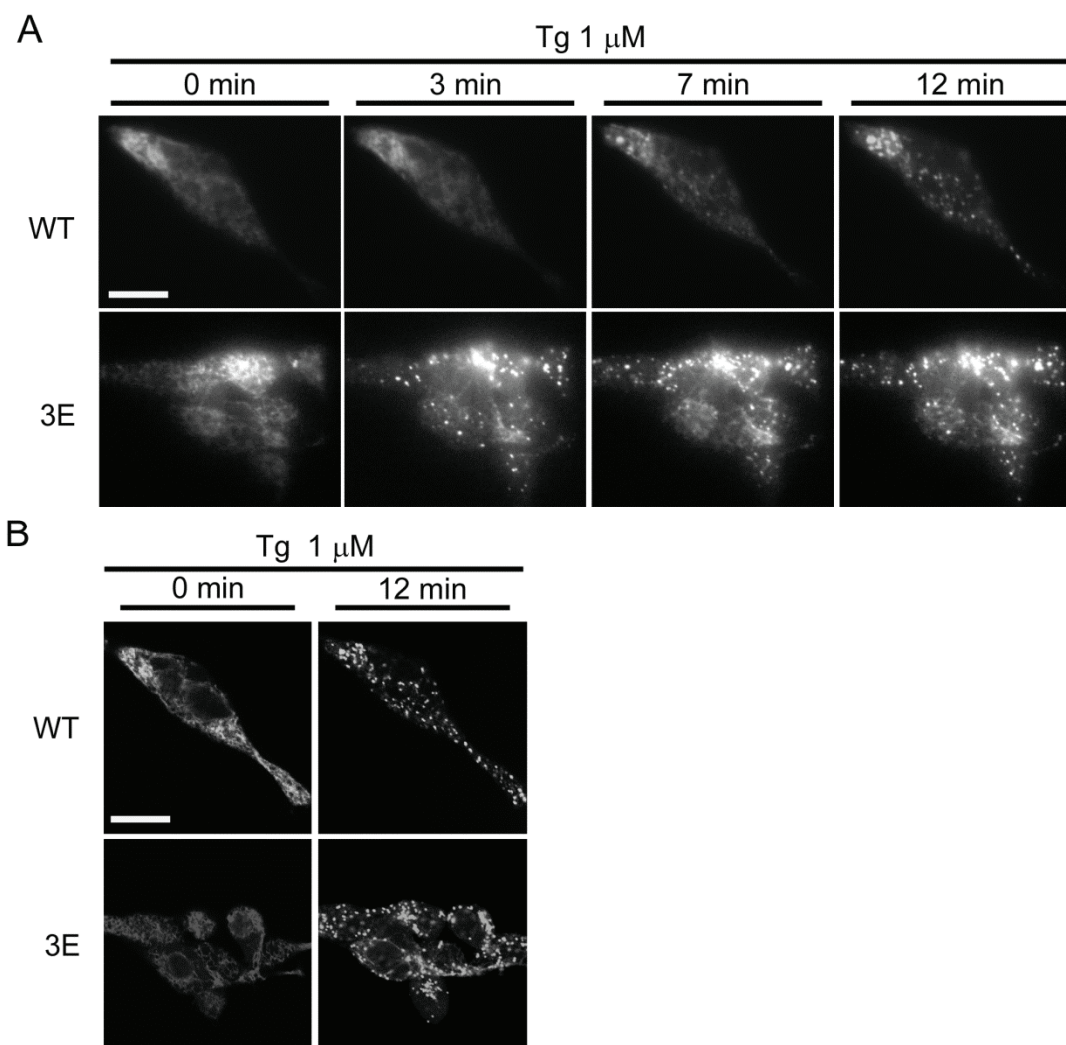


Figura 16. Observación de STIM1 con TIRFM tras el vaciado de depósitos intracelulares de Ca^{2+} . *Panel A:* las células que sobre-expresan STIM1-GFP se incubaron en HBSS libre de Ca^{2+} (tiempo 0) y después se añadió Tg 1 μM durante 12 minutos. El panel muestra los fotogramas correspondientes a los minutos 0 (reposo), 3, 7 y 12 (final del tratamiento) bajo observación de las células con microscopía TIRF. *Panel B:* Igual que en el panel anterior, pero las imágenes fueron tomadas con microscopía confocal. Barra de escala = 10 μm .

4. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE STIM1 Y ORAI1 MEDIANTE FRET.

El mecanismo por el que STIM1 desfosforilado no activa SOCE completamente en respuesta al vaciado de depósitos se estudió en mayor profundidad mediante la monitorización de la unión de STIM1 a ORAI1. Hemos comprobado que la fosforilación de STIM1 en sitios diana de la actividad ERK1/2 afecta significativamente al proceso de multimerización de STIM1 en respuesta al vaciado de depósitos, lo que sugiere que podría estar afectando a procesos posteriores que son necesarios para activar

los canales SOC. Los datos de TIRFM revelan, además, que la relocalización de STIM1 se encuentra modulada por la fosforilación en estos mismos residuos, por lo que siguiendo una secuencia temporal lógica, hemos estudiado el último de los pasos en el proceso de activación de SOCE, la unión entre STIM1 y ORAI1, en este caso mediante FRET (análisis de transferencia de energía por resonancia de Förster). Como se explica en el apartado de Materiales y Métodos, esta técnica permite cuantificar el grado de interacción entre dos proteínas. En nuestro caso se cuantificó la transferencia de energía en áreas de la membrana plasmática entre la proteína STIM1-GFP, expresada de forma estable y ORAI1-CFP, expresada mediante transfección transitoria (figura 17). De esta forma, tomando las células que expresaban ambas proteínas, se cuantificó la eficiencia de FRET en reposo y tras el tratamiento con Tg 1 μM en un medio libre de Ca^{2+} para inducir el vaciado de los depósitos intracelulares.

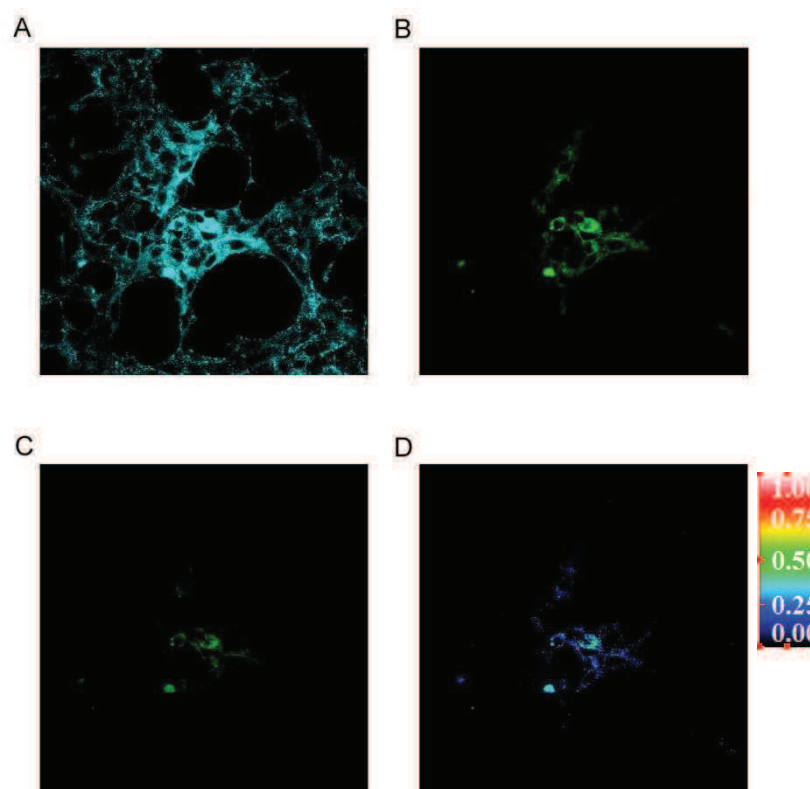


Figura 17. Análisis de la eficiencia de FRET. Las células HEK293 se transfectaron con ORAI1-WT-CFP y se incubaron con Dox durante 8h para inducir la expresión de STIM1-WT-GFP. Los paneles A-D corresponden a las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal en las condiciones: (A) excitación del donador y emisión del donador, (B) excitación del aceptor y emisión del aceptor, (C) excitación del donador y emisión del aceptor y (D) representación de los valores de eficiencia de FRET en una escala de pseudocolor.

Siguiendo este protocolo procedimos a estudiar la eficiencia de FRET en células HEK293 que expresan de forma estable: STIM1-WT-GFP, STIM1-3A-GFP o STIM1-3E-GFP cotransfectadas para la expresión de ORAI1-CFP antes y después del tratamiento con Tg. El análisis de FRET revela que existe una disminución significativa de la unión STIM1-ORAI1 cuando STIM1 está desfosforilado de forma constitutiva en los residuos mencionados anteriormente, mientras que la fosforilación constitutiva de estos residuos (simulada por la mutación Ser → Glu) conduce a un incremento de los niveles de FRET, es decir de interacción STIM1-ORAI1, por encima de los niveles encontrados para la proteína wild-type (figura 18).

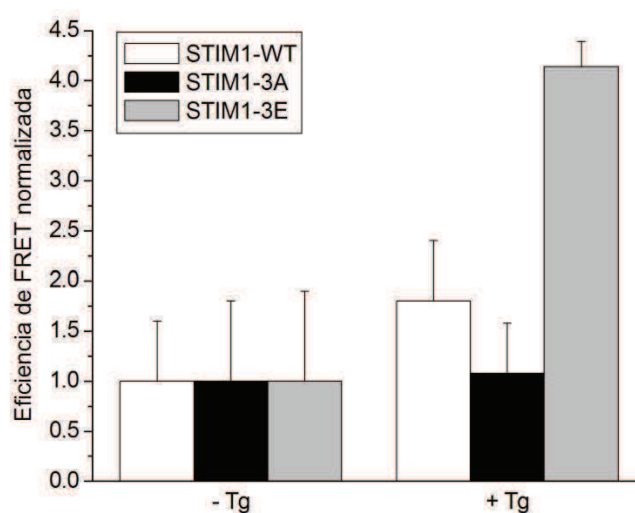


Figura 18. Eficiencia de FRET entre ORAI1-CFP y STIM1-GFP. Células que sobre-expresan STIM1-GFP-WT, STIM1-S575A/S608A/S621A-GFP o STIM1-S575E/S608E/S621E-GFP de forma estable y bajo el control de un promotor sensible a Dox, se transfectaron para la expresión transitoria de ORAI1-CFP. Se evaluó la eficiencia de FRET entre estas dos proteínas en situación de reposo (-Tg) y tras 10 min en HBSS libre de Ca^{2+} con Tg $1 \mu\text{M}$ (+Tg). Para la cuantificación de FRET se analizaron áreas de la membrana plasmática exclusivamente. Los valores de eficiencia de FRET se han normalizado con respecto a los valores obtenidos en reposo. Los resultados corresponden a 4 experimentos diferentes.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Pozo-Guisado *et al.* (Pozo-Guisado *et al.*, 2010), donde se estudió el nivel de ORAI1 endógeno que co-immunoprecipita con Flag-STIM1 en células HEK293. En este trabajo los autores muestran un incremento de los niveles de Flag-STIM1-WT y ORAI1 co-immunoprecipitado tras el tratamiento con Tg. Así mismo, el estudio revela que no se observó este incremento en los niveles de ORAI1 cuando se inmunoprecipitó Flag-STIM1-S575A/S608A/S621A en células tratadas con Tg. Estos resultados demostraron que la fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2 es necesaria para una correcta

interacción entre STIM1 y ORAI1, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por FRET mostrados en este trabajo.

5. ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.

Existen trabajos recientes que proponen que STIM1 y la actividad de los canales de Ca^{2+} asociada a esta proteína podrían estar estrechamente relacionados con el control del ciclo celular (El Boustany et al., 2010; Kuang et al., 2010), por lo que decidimos comprobar si la fosforilación/desfosforilación de STIM1 en los sitios diana de la actividad ERK1/2 afecta a la proliferación de las células HEK293. Para ello se utilizaron dos estrategias metodológicas diferentes. Por un lado se empleó la sonda fluorescente carboxifluoresceína diacetato succinil éster (CFSE) y por otro se empleó el método de reducción de MTT a formazán.

5.1. Bases moleculares y utilización de la sonda CFSE.

El CFSE es una sonda fluorescente que se utiliza para marcar de forma inespecífica las proteínas celulares, que son heredadas por las siguientes generaciones de células tras cada división celular. De esta forma se puede seguir la proliferación celular cuantificando la disminución de fluorescencia con el tiempo, es decir, con el progreso de sucesivas divisiones celulares.

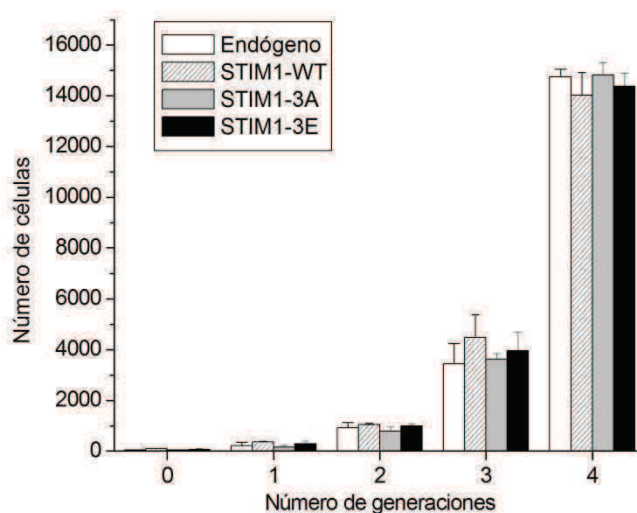


Figura 19: Medida de la proliferación celular mediante CFSE. Las células se sembraron en DMEM suplementado y se marcaron con la sonda CFSE. Pasados 4 días se cuantificó, mediante citometría de flujo, el número de células en las distintas generaciones (0-4) utilizando CFSE como marcador. Las 3 líneas celulares sobre-expresaban respectivamente Flag-STIM1-WT(STIM1-WT), Flag-STIM1-S575A/S608A/S621A (STIM1-3A), o Flag-STIM1-S575E/S608E/S621E (STIM1-3E).

Utilizando esta sonda se hizo un estudio de la proliferación de tres líneas celulares: Flag-STIM1-WT, Flag-STIM1-S575A/S608A/S621A y Flag-STIM1-S575E/S608E/S621E. Así mismo, se utilizaron como control células que no habían sido tratadas con doxiciclina, es decir que sólo expresaban la proteína STIM1 endógena. En todos los casos las células se sembraron y fueron marcadas con la sonda CFSE y a continuación se cultivaron durante 4 días. Pasado este tiempo se analizaron las muestras mediante citometría de flujo. Como control del máximo de fluorescencia se utilizaron células marcadas con la sonda en el momento de pasarlas por el citómetro de flujo, que presentan una fluorescencia del 100%.

Los resultados obtenidos (figura 19) muestran que en las tres líneas el comportamiento es similar, es decir, el número de células va en aumento en cada generación sin diferencias significativas entre las 3 líneas celulares.

5.2. Utilización de MTT.

Otro método para medir la proliferación celular es la reducción del MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazolio) a formazán, que depende fundamentalmente de la actividad metabólica, así como del número de células presentes en el cultivo. De esta forma, se puede hacer una aproximación de la velocidad de crecimiento de un cultivo celular a través de las medidas espectrofotométricas realizadas a distintos tiempos tras la incubación con MTT.

Para adaptar este método a las células HEK293, se empleó la línea celular que sobre-expresa Flag-STIM1. Para ello se sembraron concentraciones crecientes de células en placas de 35 mm de diámetro y se trataron con 150 µg/ml MTT en HBSS durante un periodo variable de 0-40 minutos. Los resultados mostraron que la mejor relación absorbancia/número de células se obtiene con 30 minutos de incubación con MTT (figura 20), ya que empleando este tiempo de incubación es posible obtener una relación lineal del número de células sembradas (en el intervalo $1-5 \times 10^5$ células totales) con respecto a la absorbancia del formazán generado.

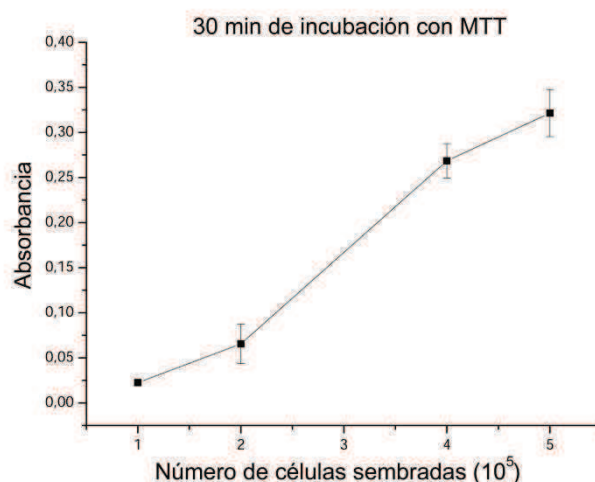


Figura 20: Relación absorbancia-número de células empleando el ensayo de proliferación con MTT. Se sembró un número variable de células HEK293 ($1-5 \times 10^5$ células/placa) que se crecieron en DMEM, y tras 24 horas en cultivo se trataron con MTT durante 30 minutos. La figura muestra la relación entre el número de células y el aumento de la absorbancia para un tiempo de ensayo con MTT de 30 minutos.

Empleando este protocolo con una incubación con MTT de 30 minutos, se estudió la proliferación celular de células que sobre-expresaban Flag-STIM1-WT, Flag-STIM1-S575A/S608A/S621A, o Flag-STIM1-S575E/S608E/S621E. Como se puede ver en la figura 21, con el tiempo de cultivo aumenta la cantidad de formazán y, por tanto, la absorbancia a 490 nm, indicativo de un aumento del número de células en el cultivo. De esta forma pudimos comprobar que en el tiempo de cultivo estudiado (24-96 horas) y en nuestras condiciones experimentales, no existen diferencias significativas en cuanto al nivel de proliferación celular entre las 3 líneas mencionadas, lo que sugiere que la fosforilación constitutiva y la desfosforilación constitutiva de STIM1 no presenta en este tipo celular un efecto significativo sobre la proliferación.

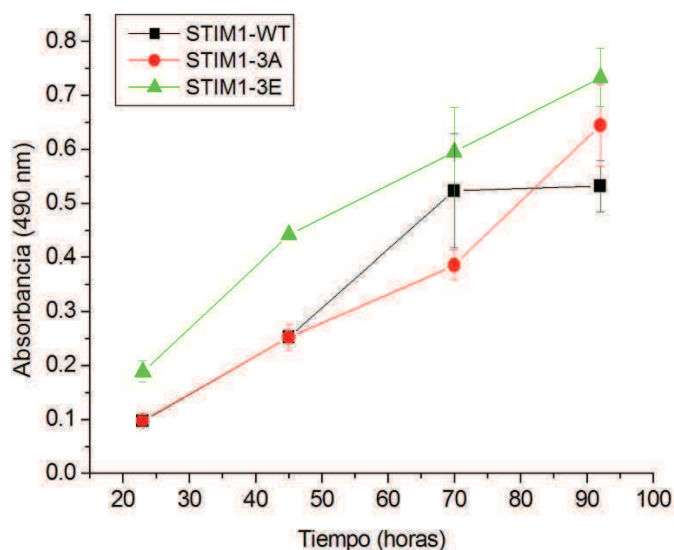


Figura 21. Proliferación celular determinada con el ensayo de reducción de MTT. Las células se sembraron en placas de 35 mm de diámetro (2.5×10^5 células/placa) y se cultivaron durante 12 horas en DMEM, posteriormente se añadió doxiciclina para inducir la expresión de Flag-STIM1-WT (STIM1-WT), Flag-STIM1-S575A/S608A/S621A (STIM1-3A) y Flag-STIM1-S575E/S608E/S621E (STIM1-3E). Finalmente las células se incubaron con 150 $\mu\text{g/ml}$ de MTT a 37°C durante 30 minutos a los tiempos indicados. El formazán generado se determinó midiendo la diferencia de absorbancia entre 490 nm y 650 nm.

6. IGF-1 INDUCE LA FOSFORILACIÓN DE STIM1 EN SITIOS DIANA DE ERK1/2 EN CÉLULAS HEK293.

La participación de STIM1 en la señalización celular ha sido estudiada ampliamente y se ha propuesto una función de esta proteína en procesos de adhesión celular, migración, diferenciación y control de la expresión génica (Chen et al., 2013; Elvers et al., 2012; Martin-Romero et al., 2012; Phuong et al., 2013; Shinde et al., 2013; Somasundaram et al., 2014; Tsai et al., 2014; Yang et al., 2009). Tal y como hemos descrito ampliamente, es conocido que la actividad de STIM1 está regulada por fosforilación. Así, la fosforilación de STIM1 en la Ser575 promueve la diferenciación de mioblastos C2C12 a miotubos (Lee et al., 2012) y la mutación Ser/Ala de los residuos Ser575, Ser608 y Ser621 bloquea la agregación plaquetaria (Elvers et al., 2012). Además, ya hemos visto que la fosforilación de STIM1 en estos residuos estimula la unión de STIM1 a ORAI1, incrementando así la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos intracelulares (SOCE). Sin embargo, estos resultados han sido obtenidos utilizando Tg o TBHQ, que son estímulos no fisiológicos, por lo que nos planteamos determinar si en condiciones más próximas a las fisiológicas también se produce la

fosforilación de STIM1 en sitios diana de la actividad ERK1/2 (Ser575, Ser608 y Ser621) y si este patrón de fosforilación está implicado en la activación y multimerización de STIM1.

En este sentido está descrito que el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) es una estimulación fisiológica que induce la activación de ERK1/2 a través de la ruta RAF-MEK-ERK (Foncea et al., 1997; Foncea et al., 2000). Por otro lado, IGF-1 activa a los receptores de inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3R), impulsando el vaciado de Ca^{2+} del retículo endoplasmático e induciendo un incremento transitorio de Ca^{2+} citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) (Ibarra et al., 2004). Además, IGF-1 activa otras rutas de señalización relacionadas con las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), p38 y JNK (O'Connor, 2003).

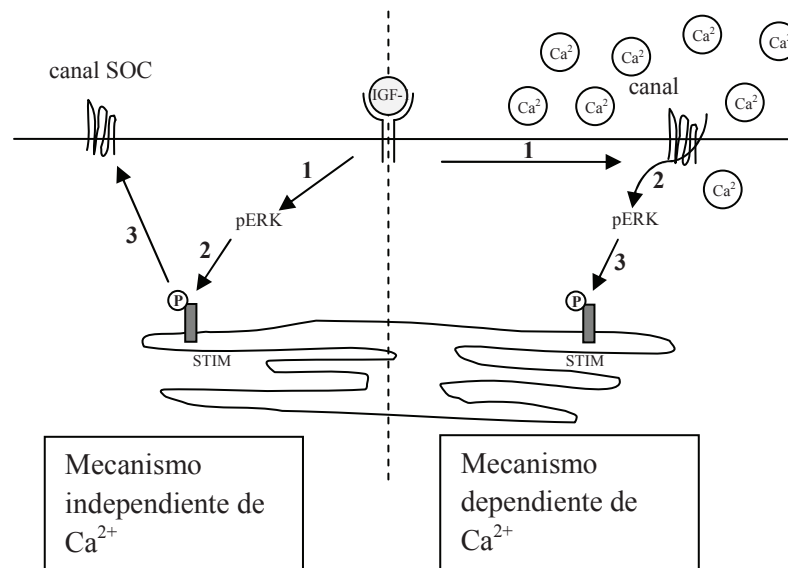


Figura 22. Posibles rutas de señalización para la fosforilación STIM1 tras el tratamiento con IGF-1. (Izquierda: mecanismo independiente de Ca^{2+}) IGF-1 activa la fosforilación de ERK1/2 (1) que a su vez fosforila a STIM1 (2), el cual activa SOCE (3). (Derecha: mecanismo dependiente de Ca^{2+}) IGF-1 activa los canales SOC induciendo la entrada de Ca^{2+} (SOCE) (1); SOCE activa la fosforilación de ERK1/2 (2) que a su vez fosforila a STIM1 (3).

Dado que IGF-1 induce la activación de ERK1/2 y que STIM1 es sustrato de la actividad quinasa ERK1/2, nos planteamos determinar si IGF-1 activa la fosforilación de STIM1 en sitios dianas de ERK1/2 (Figura 22. izquierda). En este sentido, se ha sugerido que la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos intracelulares (SOCE) es un paso previo y necesario para la activación de ERK1/2 en células de melanoma, de manera que la fosforilación de STIM1 tendría lugar siguiendo el esquema representado en la

figura 22, panel derecho (Umemura et al., 2014). De este modo, si la activación de SOCE es indispensable para la activación de ERK1/2, entonces la presencia de Ca^{2+} extracelular sería indispensable para que tenga lugar este proceso. De esta manera, para determinar si la activación de SOCE es o no un paso previo a la activación de ERK1/2, y a la fosforilación de STIM1, analizamos en primer lugar la fosforilación de ERK1/2 en presencia y ausencia de Ca^{2+} extracelular.

6.1. Estudio de la fosforilación de ERK1/2 en presencia o ausencia de Ca^{2+} extracelular.

Para estudiar la fosforilación de ERK1/2 en presencia o ausencia de Ca^{2+} extracelular se utilizaron como modelo las células HEK293. Las células se trataron con IGF-1 50 ng/ml durante diferentes tiempos (0-60 min) en HBSS con o sin Ca^{2+} extracelular, a 37°C. En la figura 23.A se muestra la fosforilación de ERK1/2 en presencia de Ca^{2+} extracelular. Esta fosforilación aumenta con el tiempo de tratamiento con IGF-1 alcanzando su máximo a los 5 minutos y decae hasta niveles basales tras 60 min de tratamiento. En la figura 23.B se muestra la fosforilación de ERK1/2 en ausencia de Ca^{2+} tras el tratamiento con IGF-1. El máximo de fosforilación se alcanza tras 3-5 min de tratamiento y transcurrido este tiempo la fosforilación decae hasta niveles basales.

En este experimento se muestra que IGF-1 activa la fosforilación de ERK1/2 tanto en presencia como en ausencia de Ca^{2+} extracelular, observándose un incremento transitorio de fosforilación de ERK1/2 entre los minutos 3 y 10. Así, los resultados obtenidos en este ensayo sugieren que la entrada de Ca^{2+} , ya sea por SOCE o por cualquier otro mecanismo, no es esencial para la activación de ERK1/2.

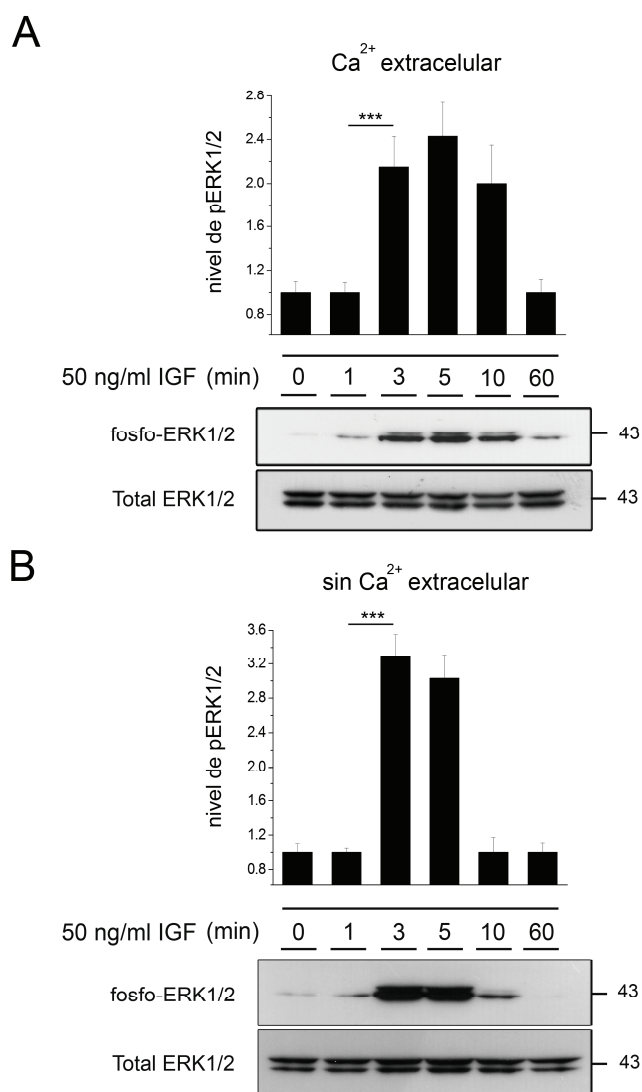


Figura 23. IGF-1 activa la fosforilación de ERK1/2 en presencia y ausencia de Ca²⁺ extracelular. Las células HEK293 se trataron con IGF-1 50 ng/ml en HBSS con Ca²⁺ (A) o HBSS sin Ca²⁺ (B). La fosforilación de ERK1/2 se determinó con un anticuerpo anti-fosfo-Thr202/Tyr204-ERK1/2. La presencia de ERK1/2 en todas las condiciones ensayadas se determinó con un anticuerpo anti-total-ERK1/2. Los inmunoblots son representativos de 3 experimentos independientes. El nivel de fosfo-ERK1/2 se cuantificó por densitometría utilizando el software ImageJ. Los datos corresponden a la media \pm desviación estándar. ((*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$)).

6.2. Estudio de la fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2.

Dado que IGF-1 activa las quinasas ERK1/2, nos propusimos estudiar si STIM1 es también una diana de estas quinasas en la señalización celular mediada por IGF-1. Para este propósito se utilizaron células HEK293 establemente transfectadas para la expresión inducible de STIM1-GFP mediante adición de Dox. La fosforilación de STIM1 en los residuos dianas de ERK1/2 se analizó en ausencia o presencia de IGF-1

50 ng/ml en HBSS sin Ca^{2+} (figura 24). Para determinar si las quinasas ERK1/2 son responsables de la fosforilación de STIM1 inducida por el tratamiento con IGF-1, se inhibió la activación de ERK1/2 con PD0325901 (la activación de esta quinasa está mediada por MEK1/2, por lo que se bloqueó la activación de ERK1/2 mediante la inhibición de MEK1/2 con PD0325901). Para ello se pre-incubaron las células con PD0325901 0.5 μM en DMEM durante 10 min y a continuación se añadió el tratamiento con IGF-1. Como control negativo del inmunoblot se utilizó una línea celular que expresa un mutante de STIM1, STIM1-S575A/S608A/S621A-GFP. Esta proteína mutada permanece desfosforilada constitutivamente en los residuos mencionados y puede utilizarse para evaluar la señal de fondo del inmunoblot. En paralelo, y como control positivo de este experimento, monitorizamos el nivel de fosforilación de STIM1 bajo tratamiento con tapsigargina, condiciones ya conocidas que inducen la fosforilación de STIM1 en estos residuos.

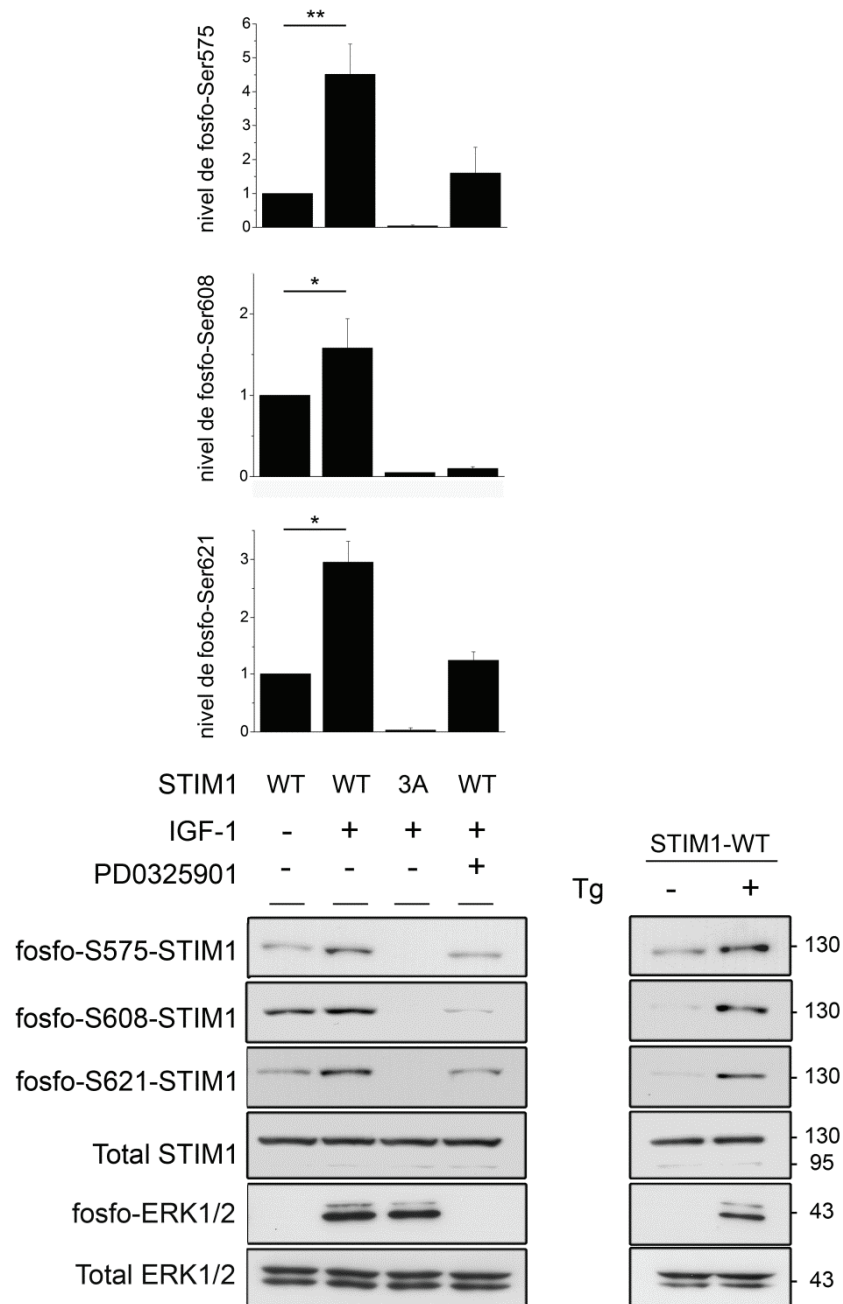


Figura 24. IGF-1 activa la fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2. Las células HEK293 que sobre-expresan STIM1-GFP se trataron con IGF-1 50 ng/ml en HBSS sin Ca^{2+} durante 10 min. Los lisados totales (40 μg) se utilizaron para evaluar el nivel de fosfo-Ser575-STIM1, fosfo-Ser608-STIM1 y fosfo-Ser621-STIM1 por inmunoblot. El nivel total de STIM1-GFP se evaluó con un anticuerpo anti-GFP. Como control negativo se utilizaron lisados de células HEK293 que sobre-expresan STIM1-S575A/S608A/S621A-GFP y para bloquear la activación de ERK1/2 se utilizó PD0325901 (0.5 μM). Como control positivo se utilizaron lisados de células HEK293 tratadas con tapsigargina (Tg, 1 μM). Los inmunoblots son representativos de 4 experimentos diferentes. La cuantificación del nivel de fosforilación de STIM1 se realizó por densitometría. Los datos corresponden a la media \pm desviación estándar. ((* $p < 0,05$; (** $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$)).

La fosforilación de STIM1 se evaluó mediante inmunoblot de lisados de proteína totales utilizando para ello anticuerpos específicos diseñados para detectar los sitios de fosforilación de STIM1 descritos anteriormente: fosfo-Ser575-STIM1, fosfo-Ser608-STIM1 y fosfo-Ser621-STIM1. Los resultados obtenidos (figura 24) muestran que la adición de IGF-1 provoca un incremento en la fosforilación de STIM1 en los tres residuos citados. Además, el tratamiento con PD0325901 inhibe completamente la activación de ERK1/2 y bloquea la fosforilación de STIM1 en estos residuos durante el tratamiento con IGF-1, de forma similar a los resultados descritos utilizando Tg. Estos resultados sugieren que las quinasas ERK1/2 están implicadas en la fosforilación de STIM1 mediada por la ruta de señalización de IGF-1.

Por tanto, podemos concluir que IGF-1 induce la fosforilación de STIM1 en las Ser575, Ser608 y Ser621 en ausencia de Ca^{2+} extracelular y que esa fosforilación está mediada por la actividad quinasa ERK1/2.

6.3. Estudio de la fosforilación de STIM1 por JNK y p38.

IGF-1 es un estímulo fisiológico útil para estudiar la fosforilación de STIM1 mediada por ERK1/2. Sin embargo, IGF-1 activa otras cascadas de quinasas MAPK que podrían estar implicadas en la fosforilación de STIM1, como las rutas de p38 y JNK (c-Jun N-terminal kinase) (O'Connor, 2003). En este sentido, hemos monitorizado la activación de p38 MAPK examinando la fosforilación de p38 en los residuos Thr180/Tyr182 por inmunoblot. Para estudiar la activación de JNK1/2 hemos examinado la fosforilación de su sustrato c-Jun (Ser63).

La especificidad de los inhibidores, las concentraciones y los tiempos de incubación que evitan la activación cruzada entre diferentes rutas de señalización se optimizaron para nuestro modelo de estudio. Para determinar las condiciones de los tratamientos se estimularon las células HEK293 con IGF-1 y se pre-trataron a diferentes tiempos (10, 15 y 30 min) con el inhibidor BIRB0796 0.1 μM , que bloquea la actividad quinasa p38MAPK. Por otro lado, se inhibió la actividad JNK1/2 tratando con JNK-IN-8 (JNK-Inhibitor-8) 1 μM durante los tiempos 30 min, 1h y 3h.

La figura 25A muestra que la inhibición de p38 MAPK tiene lugar desde los primeros 10 min de preincubación con BIRB0796. En el caso de JNK1/2 la máxima inhibición se produce tras 3h de preincubación con JNK-IN-8 (figura 25B). Así, las

condiciones seleccionadas para la inhibición de p38 MAPK y JNK1/2 fueron 10 minutos y 3 horas respectivamente.

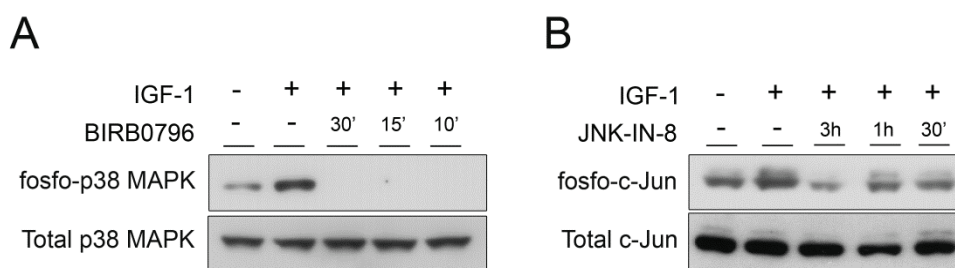


Figura 25. Inhibición de p38 MAPK y JNK1/2. Las células HEK293 se trataron con IGF-1 en presencia o ausencia de 0.1 μ M BIRB0796 (Panel A) o 1 μ M de JNK-IN-8 (Panel B) durante diferentes tiempos de preincubación. La activación de p38 se determinó utilizando un anticuerpo anti fosfo-p38 (Thr180/Tyr182). Para determinar la activación de c-Jun se utilizó un anticuerpo anti-fosfo-c-Jun (Ser63). La cantidad total de p38 y c-Jun se determinó utilizando anticuerpos que reconocen el nivel total de p38MAPK o c-Jun, respectivamente.

Una vez establecidas las condiciones de los tratamientos se estudió la implicación de estas quinasas en la fosforilación de STIM1. Para ello, se trataron las células con IGF-1 en HBSS sin Ca^{2+} durante 10 min en presencia o ausencia de los inhibidores y se estudió la fosforilación de STIM1 en los sitios dianas de ERK1/2. En la figura 26A se muestran los resultados obtenidos tras tratar las células con BIRB0796 y JNK-IN-8 conjuntamente. Como se puede observar, la incubación con los dos inhibidores inhibe tanto a p38 MAPK como a JNK1/2, sin embargo este tratamiento no bloquea la activación de la quinasa ERK1/2. Por otro lado, el tratamiento con BIRB0796 y JNK-IN-8 inhibe la fosforilación de STIM1 en la Ser575 tras el tratamiento con IGF-1, sin embargo la fosforilación de los otros dos residuos (Ser608 y Ser621) no se ve afectada en presencia de estos inhibidores (figura 26A). Estos resultados sugieren que tanto la actividad p38 MAPK como las actividades JNK1/2 podrían estar implicadas en la fosforilación de STIM1 en la Ser575, pero no en los residuos Ser608 y Ser621. Como control de este experimento se determinó la cantidad total de STIM1, así como la cantidad total de las diferentes quinasas estudiadas (p38 MAPK, JNK1/2 y ERK1/2), confirmándose que los niveles totales de proteína se mantienen constantes para los distintos tratamientos.

A continuación estudiamos con mayor detalle la fosforilación de STIM1 en la Ser575 y para ello se trataron las células con los inhibidores BIRB0796 y JNK-IN-8 por

separado (Figura 26B). Los resultados muestran que la inhibición de la fosforilación de STIM1 en la Ser575 ocurre tanto utilizando los inhibidores individualmente como en combinación (figura 26A-B), lo que sugiere que además de la quinasa ERK1/2, tanto p38 MAPK como JNK1/2 están implicadas en la fosforilación de STIM1 en este residuo específico (Ser575) durante la estimulación de células HEK293 con IGF-1.

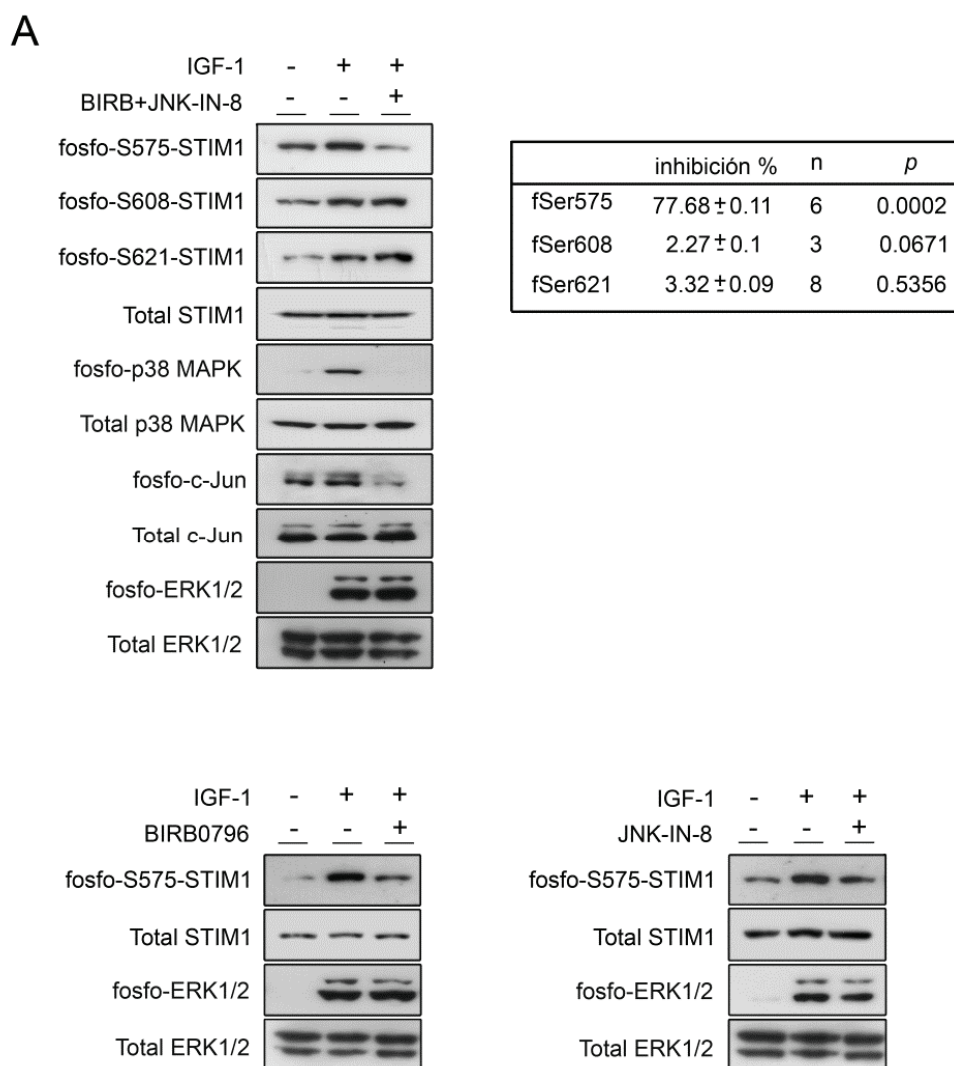


Figura 26. La fosforilación de STIM1 en la Ser575 es dependiente de la actividad p38 MAPK, JNK1/2 y ERK1/2. (A) Las células HEK293 se trataron con IGF-1 en presencia o ausencia de 0.1 μ M BIRB0796 o 1 μ M de JNK-IN-8. Los lisados totales de células estimuladas con IGF-1 se utilizaron para evaluar el nivel de fosfo-Ser575-STIM1, fosfo-Ser608-STIM1 y fosfo-Ser621-STIM1. BIRB0796 (0.1 μ M) y JNK-IN-8 (1 μ M) se utilizaron en combinación para bloquear la activación de p38 MAPK y JNK1/2. Los inmunoblots son representativos de al menos 3 experimentos diferentes. La cuantificación de la inhibición de la fosforilación de STIM1 para cada residuo se muestra en la tabla. Los datos corresponden al cálculo de la media \pm desviación estándar; n, número de duplicados; p, nivel de significatividad estadística. (B) El efecto individual de BIRB0796 o JNK-IN-8 en la fosforilación de

STIM1 en la Ser575 se estudió por inmunoblot. Los blots son representativos de 3 experimentos independientes.

7. STIM1-GFP SE ACUMULA EN MULTÍMEROS TRAS LA ESTIMULACIÓN CON IGF-1.

Tal y como se ha descrito anteriormente, STIM1 se activa tras una bajada transitoria de la concentración de Ca^{2+} intraluminal. Esta bajada de Ca^{2+} conlleva la disociación de Ca^{2+} de los dominios intraluminales de manos-EF de STIM1, provocando un cambio conformacional que permite su activación. Este cambio de conformación de la proteína facilita su oligomerización en agregados o multímeros y este es el primer paso necesario para su activación.

Para evaluar si STIM1 se acumula en multímeros tras la estimulación con IGF-1 se utilizaron células HEK293 que expresan STIM1-GFP de manera estable y se trataron con IGF-1 en medio sin Ca^{2+} , tal y como se hizo para la detección de fosfo-STIM1 por inmunoblot. En paralelo y como control positivo, las células se trataron con Tg 1 μM , para evaluar el máximo porcentaje de multimerización de STIM1 en estas células, ya que Tg inhibe irreversiblemente a la SERCA y no permite el llenado del RE. En la figura 27 podemos observar la distribución homogénea de STIM1 por todo el retículo endoplasmático cuando las células están en reposo, es decir en medio DMEM completo y en presencia de Ca^{2+} extracelular. Por otro lado, cuando tratamos las células con IGF-1 o Tg se observa la distribución de STIM1 en agregados. Estos resultados sugieren que IGF-1 activa la multimerización de STIM1 de forma similar a lo observado con Tg. Sin embargo, en un recuento de células que presentan multímeros se puede observar que el número total de células que presentan multímeros tras el tratamiento con Tg (85%) es superior al número de células que presentan multímeros tras el tratamiento con IGF-1 (50%) (figura 27). Este resultado es lógico dado que, tal y como se ha indicado más arriba, Tg bloquea el relleno de los depósitos intracelulares (RE) manteniendo la multimerización de STIM1 de forma permanente, mientras que IGF-1 puede inducir un vaciado de depósitos transitorio sin bloquear el llenado del RE por la SERCA.

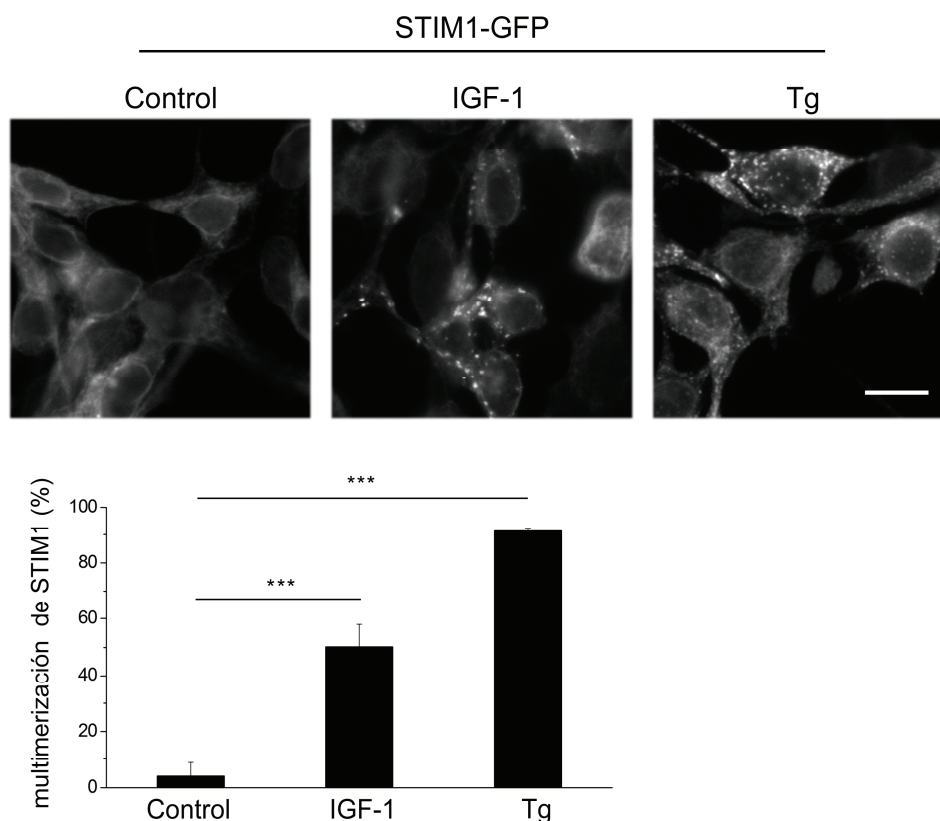


Figura 27. IGF-1 induce la multimerización de STIM1-GFP en células HEK293. Las células que expresan STIM1-GFP se trataron con 50 ng/ml de IGF-1 o con Tg 1 μ M en HBSS sin Ca^{2+} durante 10 min. El porcentaje de células con multimerización patente de STIM1 se calculó a partir de un mínimo de 10 campos de microscopía de epifluorescencia (más de 120 células por condición de 6 cultivos independientes). La figura muestra imágenes representativas del porcentaje de multimerización con cada tratamiento. Barra de escala = 10 μ m. ((*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$)).

Dado que IGF-1 induce la fosforilación de STIM1 en sitios dianas de ERK1/2 y que además IGF-1 activa la multimerización de STIM1, nos propusimos determinar la localización de fosfo-STIM1 en células HEK293 mediante inmunolocalización, utilizando para ello los anticuerpos fosfo-específicos descritos anteriormente (fosfo-Ser575, fosfo-Ser608 y fosfo-Ser621). Las células HEK293 que sobre-expresan Flag-STIM1 se trataron con IGF-1 en medio sin Ca^{2+} y se fijaron con paraformaldehído al 4%. Por otro lado, las células control (en reposo) se fijaron directamente tras retirar el medio de cultivo. La figura 28 muestra que STIM1 fosforilado se encuentra principalmente en multímeros tras el tratamiento con IGF-1. Además, observamos que el porcentaje de células que presentan multímeros de STIM1, detectado con los 3 anticuerpos fosfo-específicos (figura 28), fue muy similar al porcentaje de células que presentan multímeros observado con STIM1-GFP (total-STIM1) en la figura 27. Este

resultado sugiere que en todas las células en las que STIM1 está multimerizado podemos encontrar fosforilación de STIM1 en los residuos Ser575, Ser608 y Ser621. Como control positivo de este experimento se analizó la presencia de células con STIM1 multimerizado en células tratadas con Tg. Estos resultados indican que IGF-1 activa la fosforilación de STIM1 y que la mayor parte de fosfo-STIM1 se encuentra en multímeros.

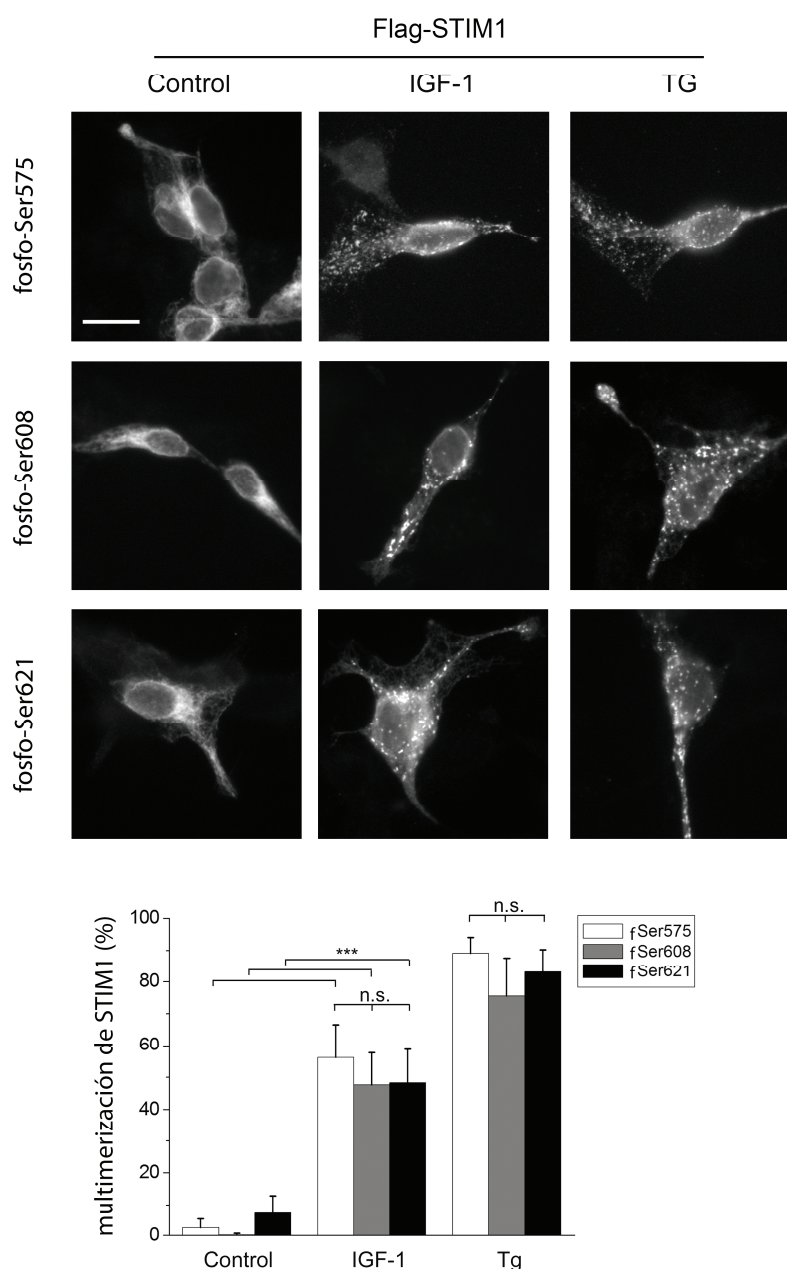


Figura 28. Inmunolocalización de fosfo-STIM1. Las células que expresan Flag-STIM1 se trataron con 50 ng/ml de IGF o Tg 1 μ M durante 10 min. La inmunolocalización con los anticuerpos fosfo-Ser575-STIM1, fosfo-Ser608-STIM1 o fosfo-Ser621-STIM1 se realizó siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Barra de escala = 10 μ m. La cuantificación de la multimerización de fosfo-STIM1

se evaluó de la misma forma que en la figura 27 (más de 120 células por condición a partir de 4 experimentos independientes). Barra de escala = 10 μ m. ((*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$)).

8. LA FOSFORILACIÓN DE STIM1 INDUCIDA POR IGF-1 REGULA SU MULTIMERIZACIÓN.

Los resultados expuestos anteriormente sugieren que STIM1 es una proteína diana de la cascada de señalización iniciada por IGF-1. Por tanto, para determinar si STIM1 es un efector de IGF-1 y si la fosforilación de sitios dianas de ERK1/2 está relacionada con la actividad de la proteína, se monitorizó la multimerización de STIM1 por epifluorescencia en células que expresan de forma estable STIM1-GFP o STIM1-S575A/S608A/S621A-GFP. Las células se estimularon con 50 ng/ml de IGF-1 y como control positivo del experimento se estimularon las células con Tg 1 μ M (figura 29). Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con IGF-1 activa la multimerización de STIM1 de forma menos acusada que el tratamiento con Tg. Como ya se ha explicado en apartados anteriores, este resultado es consecuencia del bloqueo irreversible de la SERCA por parte de Tg, lo que impide el relleno del RE. En el caso del tratamiento con IGF-1 no se bloquea el relleno de los depósitos intracelulares, obteniéndose, por tanto, un porcentaje menor de multimerización.

Por otro lado este análisis confirmó que IGF-1 dispara una multimerización significativa de STIM1 y que la desfosforilación constitutiva de STIM1 en sitios diana de la actividad quinasa ERK1/2 reduce significativamente esta multimerización, sugiriendo que la fosforilación de STIM1 media la activación de STIM1 en células HEK293 estimuladas con IGF-1.

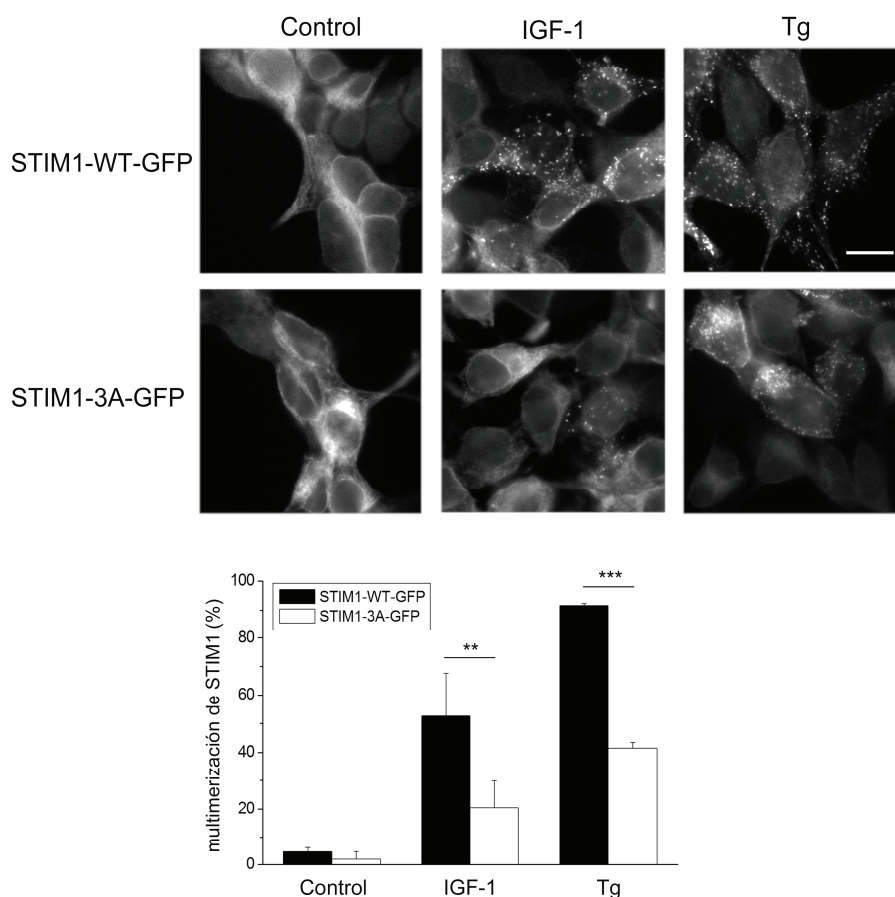


Figura 29. La multimerización de STIM1 inducida por IGF-1 es dependiente de la fosforilación en sitios diana de ERK1/2. Las células HEK293 que expresan STIM1-GFP (barras negras), o STIM1-S575A/S608A/S621A (barras blancas) se trataron con IGF-1 50 ng/ml durante 10 min, o con Tg 1 μ M durante 5 min. El porcentaje de células con multimerización patente de STIM1 se calculó a partir de un mínimo de 10 campos diferentes (más de 120 células por condición) de tres cultivos diferentes. Las imágenes son representativas de las condiciones experimentales descritas anteriormente. Barra de escala = 10 μ m. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

9. IGF-1 INDUCE LA DISOCIACIÓN ENTRE STIM1 Y EB1.

Existen numerosas evidencias experimentales que confirman que la activación de STIM1 va precedida de la disociación entre STIM1 y EB1 y que dicha separación posibilita la agregación de STIM1 en multímeros (Casas-Rua et al., 2013; Pozo-Guisado et al., 2013; Pozo-Guisado and Martin-Romero, 2013). Esta disociación está regulada por la fosforilación de STIM1, de manera que en una célula en reposo STIM1 estaría principalmente desfosforilado en los residuos dianas de ERK1/2 y permanecería unido a EB1. Por el contrario, tras un vaciado de depósitos intracelulares, STIM1 se fosforilaría en dichos residuos, disociándose de EB1, permitiendo que STIM1 se localizara en

multímeros. Este mecanismo de activación de STIM1 ha sido descrito en células tratadas con taspigargina (Pozo-Guisado et al., 2013). Sin embargo la disociación entre STIM1 y EB1 en condiciones más próximas a las fisiológicas aún no ha sido descrita.

Para abordar este estudio, las células HEK293 que sobre-expresan de forma estable Flag-STIM1 se transfectaron de forma transitoria para la expresión de EB1-GFP y se trataron con IGF-1. A continuación se llevó a cabo un ensayo de precipitación de GFP para precipitar EB1-GFP y se analizó la cantidad de Flag-STIM1 co-precipitada en células en reposo y células tratadas con IGF-1 (figura 30, calles 3 y 4 respectivamente). Nuestros resultados muestran que la cantidad total de Flag-STIM1 co-precipitado con EB1-GFP es significativamente menor en las células tratadas con IGF-1, es decir, existe una disociación significativa del complejo STIM1-EB1 tras el tratamiento con IGF-1. Esta disociación fue similar a la obtenida en células tratadas con Tg, control positivo del experimento. Como control negativo del experimento se utilizaron células que expresaban EB1-GFP sin sobre-expresar Flag-STIM1 (calle 1) y células transfectadas con Flag-STIM1 y con un vector GFP-vacío (calle 2). En ninguno de estos casos se co-precipitó STIM1. Por último, se comprobó que la cantidad total de EB1-GFP precipitada era similar en todas las condiciones ensayadas.

Por otro lado en la figura 30 (panel inferior) se muestra que los niveles de expresión de EB1-GFP son homogéneos en todos los lisados transfectados con esta construcción. Lo mismo ocurre para la expresión de Flag-STIM1, es decir, sólo aquellas células en las que se ha inducido la expresión de la proteína presentan niveles altos de STIM1, mientras que en los lisados sin sobre-expresión se detecta únicamente STIM1 endógeno. Como control de la estimulación con IGF-1 se determinó el nivel de fosfo-ERK1/2 y además se comprobó que el nivel total de ERK1/2 no se veía afectado por el tratamiento con IGF.

Por tanto, nuestros resultados confirman que STIM1 se activa en células HEK293 tras el tratamiento con IGF-1 y que dicha activación implica la disociación entre STIM1 y EB1.

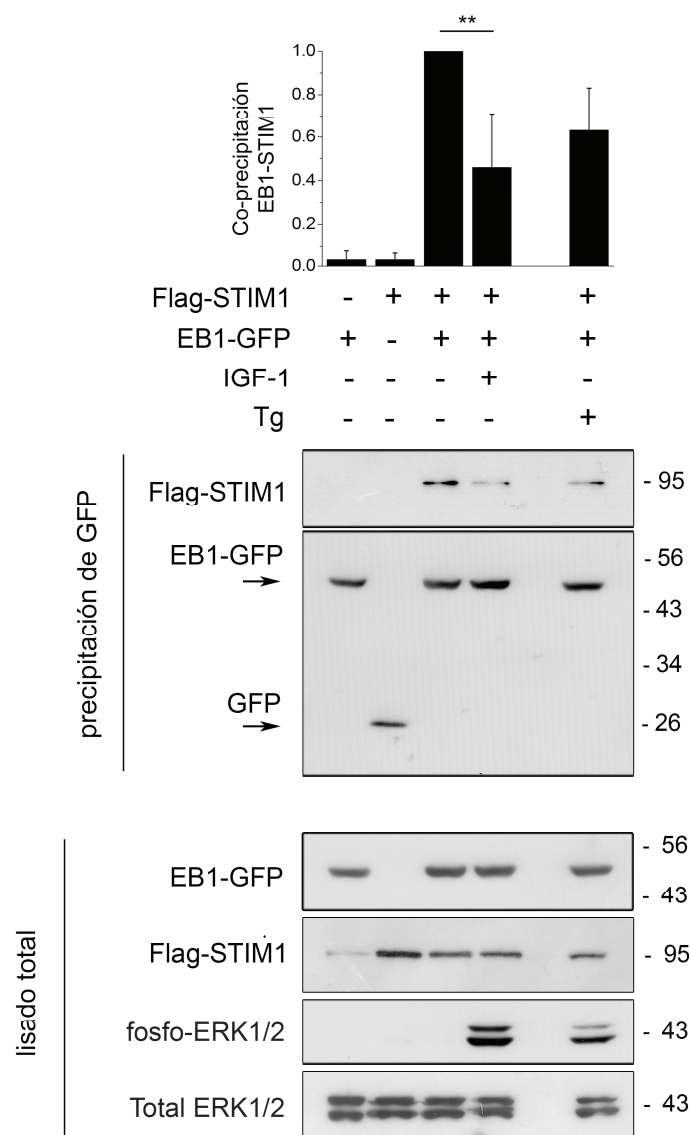


Figura 30. IGF-1 induce la disociación de STIM1 y EB1. Las células HEK293 se transfectaron para la expresión de Flag-STIM1 y EB1-GFP. Las células se trataron con 50 ng/ml de IGF en HBSS sin Ca^{2+} durante 10 min. EB1-GFP se precipitó utilizando una resina de agarosa con afinidad por GFP (GFP-Trap, Chromotek), y el nivel de STIM1 unido a EB1 se evaluó por inmunoblot. La cantidad total de EB1-GFP y Flag-STIM1 de los lisados de cada condición se verificaron por inmunoblot de lisados totales. La cuantificación de la cantidad de STIM1 co-precipitado se llevó a cabo por densitometría. Los inmunoblots son representativos de 3 experimentos diferentes con 3 cultivos diferentes. Los datos corresponden a la media \pm desviación estándar. ((*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$)).

10. LA FOSFORILACIÓN DE STIM1 REGULA LA TRANSLOCACIÓN DE NFAT AL NÚCLEO.

NFAT (nuclear factor of activated T cells) es un factor de transcripción regulado por los niveles de Ca^{2+} citosólico. Cuando está fosforilado, NFAT permanece inactivo en el citosol, siendo necesaria la desfosforilación del factor de transcripción para su translocación al núcleo. Esta desfosforilación es llevada a cabo por la fosfatasa

calcineurina, cuya actividad es dependiente de Ca^{2+} (Hogan et al., 2003). Así, tras un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular, la calcineurina se activa y desfosforila a NFAT, induciendo su translocación y acumulación en el núcleo, así como la activación de la transcripción de determinados genes mediante la unión a sus elementos promotores diana (Hogan et al., 2003). De esta manera se puede utilizar la translocación de NFAT al núcleo como una medida indirecta de la concentración de Ca^{2+} citosólico, esto es, cuando aumenta la concentración de Ca^{2+} intracelular se produce una acumulación de NFAT en el núcleo.

Por otro lado, está descrito que IGF-1 estimula la translocación nuclear de NFAT en diversos tipos celulares (Alfieri et al., 2007; Arantes et al., 2012; Valdes et al., 2013). Hemos visto también que STIM1 activa la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos intracelulares y que la fosforilación de STIM1 en sitios dianas de ERK1/2 es necesaria para su activación y multimerización. Esta activación de STIM1 conlleva además la disociación entre STIM1-EB1. Por todo ello y para determinar la relevancia fisiológica de los datos obtenidos anteriormente, se monitorizó la translocación desde el citosol al núcleo de NFAT inducida por IGF-1 como medida indirecta de un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular mediado por STIM1.

Para determinar el tiempo necesario para inducir la translocación nuclear de NFAT en células HEK293 se hizo una titulación a diferentes tiempos de incubación (0, 10 y 30 min) en HBSS con o sin IGF-1. Las células HEK293 que expresan Flag-STIM1-WT se transfectaron para la expresión de NFAT-GFP y se monitorizó la translocación de NFAT al núcleo en los diferentes tiempos de incubación a 37 °C. Pasado este tiempo las células se fijaron con PFA 4% y se contabilizó el número de células que presentaban NFAT con localización nuclear. Los resultados mostrados en la figura 31 indican que tras 10 min de incubación con IGF-1 la translocación de NFAT es prácticamente despreciable, mientras que con 30 minutos de tratamiento ésta incrementa hasta casi un 40% (figura 31). Por tanto se tomó un tiempo de incubación de 30 minutos para el estudio del efecto de los diferentes mutantes sobre la translocación nuclear de NFAT. Los resultados muestran que esta translocación nuclear es sensible a la desfosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2, monitorizada con la línea celular que expresa establemente Flag-STIM1-S575A/S608A/S621A (figura 32). Este resultado indica que la fosforilación de STIM1 media la señalización celular inducida por IGF-1.

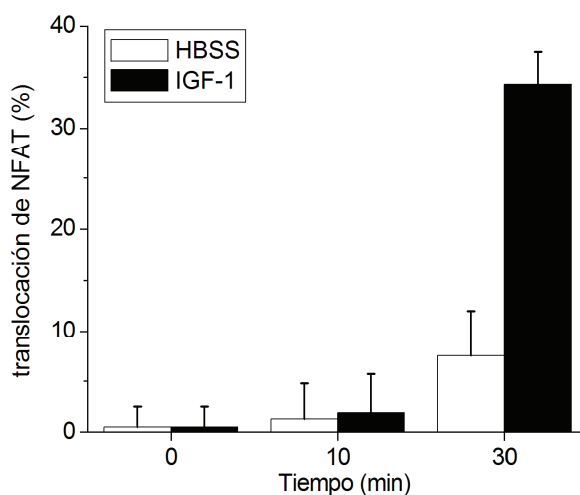


Figura 31. Optimización del tiempo de incubación con IGF-1 en células HEK293 para inducir la translocación nuclear de NFAT. Las células HEK293 transfectadas de manera estable con Flag-STIM1 se transfectaron para la expresión transitoria de NFAT-GFP. Las células se incubaron con o sin IGF-1 50 ng/ml en HBSS con Ca^{2+} durante diferentes tiempos (0, 10 y 30 min). Se evaluó la translocación nuclear de NFAT de un mínimo de 20 campos de 5 cultivos diferentes (más de 150 células). Los datos corresponden al cálculo de la media \pm desviación estándar.

Como ya se ha comentado, la fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2 modula además la disociación de STIM1 y EB1 (Pozo-Guisado et al., 2013). En concordancia con este hecho, la sobre-expresión de la proteína de fusión STIM1-EB1 inhibe la entrada de Ca^{2+} , resultado descrito en trabajos anteriores de nuestro laboratorio (Pozo-Guisado et al., 2013). Por lo tanto, se evaluó el efecto de la sobre-expresión de Flag-STIM1-EB1 sobre la translocación de NFAT y se observó que la expresión de esta proteína inhibe la translocación de NFAT al núcleo (figura 32). Estos resultados confirman que la fosforilación de STIM1 y la disociación entre STIM1 y EB1 son necesarias para la activación de STIM1 tras la estimulación con IGF-1.

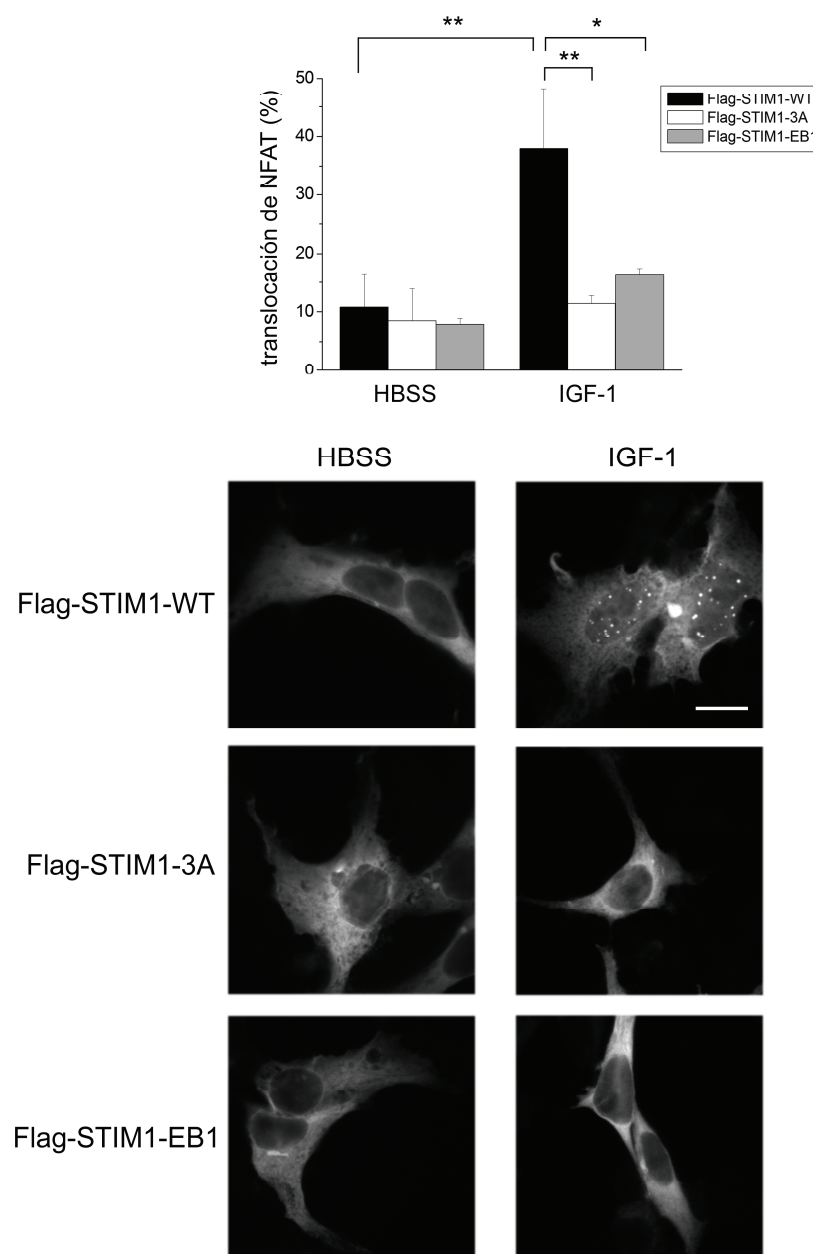


Figura 32. La desfosforilación constitutiva de STIM1 inhibe la translocación de NFAT al núcleo. Las células HEK293 transfectadas de manera estable con Flag-STIM1, Flag-STIM1-S575A/S608A/S621A o Flag-STIM1-EB1 se transfectaron para la expresión transitoria de NFAT-GFP. Las células se trataron con IGF-1 50 ng/ml en HBSS con Ca^{2+} durante 30 min. Pasado este tiempo se fijaron en paraformaldehído 4% y se analizaron con microscopía de fluorescencia. Se evaluó la translocación nuclear de NFAT de un mínimo de 20 campos de 5 cultivos diferentes (más de 150 células). Los datos corresponden al cálculo de la media \pm desviación estándar. Barra de escala = 10 μm . ((*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$)).

La figura 33 muestra un esquema del mecanismo propuesto de activación de STIM1 mediante su estimulación con IGF-1. Según esta propuesta, IGF-1 se une a su receptor en membrana (IGF-1-R) activando las rutas de PI3K (fosfatidilinositol 3-quinasa) y de Ras-Raf-MEK-ERK1/2. Por un lado, la ruta de PI3K activa a la fosfolipasa C- γ (PLC- γ) que activa la liberación de IP3 (inositol-1,4,5-trisfosfato) a partir de la escisión de PIP2 (fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato) en IP3 y DAG (diacilglicerol). El IP3 se une a su receptor (IP3R), situado en el retículo endoplasmático, activando así la liberación de Ca^{2+} hacia el citosol. Este vaciado de depósitos activa a STIM1 a través de la disociación de Ca^{2+} del dominio de manos-EF situadas en el extremo luminal de la proteína. Por su parte, la activación de la ruta Ras-Raf-MEK-ERK1/2, objeto de estudio del presente trabajo, activa la fosforilación de STIM1 en los residuos Ser575, Ser608 y Ser 621. Estos dos procesos tienen como consecuencia la activación de STIM1, que multimeriza, se disocia de EB1 y activa la entrada de Ca^{2+} a través de los canales SOC situados en la membrana plasmática. El aumento de la concentración de Ca^{2+} citosólico tiene como consecuencia la translocación nuclear de NFAT, que finalmente activa la expresión de genes diana.

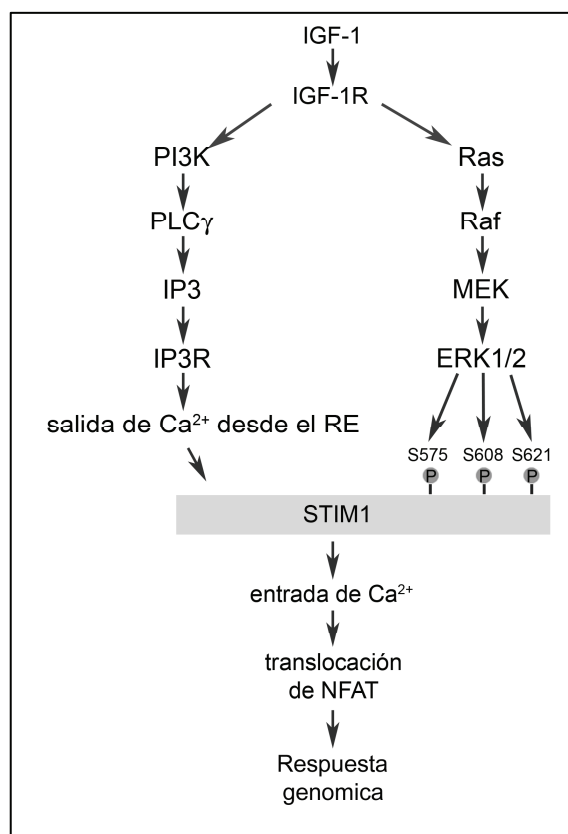


Figura 33. Ruta propuesta para la señalización dependiente de STIM1 inducida por IGF-1. IGF-1R, receptor del factor de crecimiento 1 similar a insulina; PI3K, fosfatidilinositol 3-quinasa; PLC, fosfolipasa C.

11. IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS DE LA FOSFORILACIÓN DE STIM1 EN SITIOS DIANAS DE ERK1/2

11.1. Fosforilación de STIM1 y migración celular.

Hemos comprobado hasta ahora que la fosforilación de STIM1 en los residuos Ser575, Ser608 y Ser621 está relacionada con la activación de la proteína: multimerización, liberación de EB1, interacción con ORAI1 y finalmente activación de SOCE, con el consecuente aumento de Ca^{2+} citosólico. Hemos visto además que esta activación ocurre tanto con estímulos no fisiológicos: Tg y TBHQ, como con estímulos fisiológicos: IGF-1. Sin embargo, hemos pretendido determinar además la posible implicación fisiológica de la fosforilación de STIM1 en los residuos citados. En este sentido, está descrito que STIM1 es un regulador de la migración celular (Chen et al., 2010; Yang et al., 2009), un proceso que se encuentra controlado básicamente por los niveles de Ca^{2+} citosólicos.

Por todo ello, nos planteamos estudiar si la fosforilación de STIM1 en sitios dianas de ERK1/2 está relacionada con la migración celular utilizando como modelo de estudio mioblastos C2C12 de ratón.

Para estudiar la migración en mioblastos C2C12 se realizaron ensayos de cierre de heridas en monocapas celulares. Para determinar el efecto de la fosforilación de STIM1 sobre la migración celular se transfectaron las células con las siguientes variantes de STIM1: Flag-STIM1-S575A, Flag-STIM1-S608A, Flag-STIM1-S621A, Flag-STIM1-S575E, Flag-STIM1-S608E, Flag-STIM1-S621E, Flag-STIM1-WT, Flag-STIM1-S575A/S608A/S621A y Flag-STIM1-S575E/S608E/S621E. Como control de la transfección se utilizaron células C2C12 transfectadas con un vector para la expresión de Flag-(empty). Tras el ensayo de migración se lisaron las células y los lisados obtenidos se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa para determinar el nivel de transfección en cada caso. En la figura 34 se muestra que el nivel de expresión de los diferentes mutantes fue similar en todas las condiciones ensayadas.

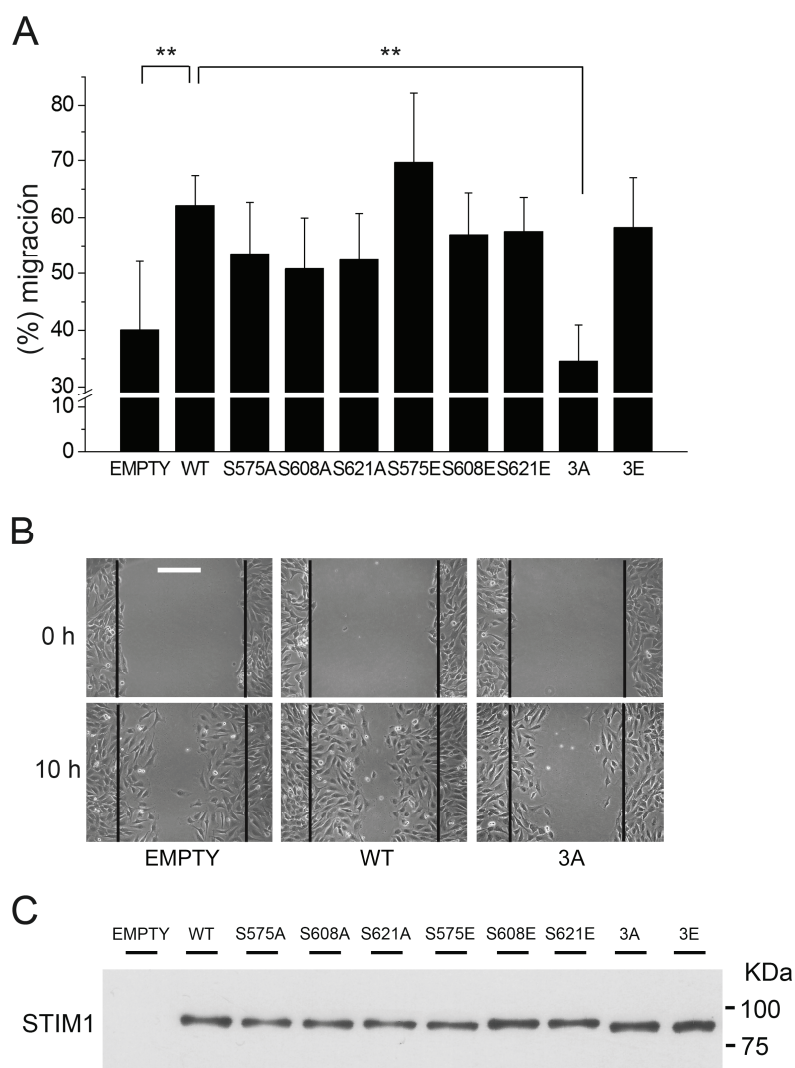


Figura 34. Migración de mioblastos C2C12 transfectedos con variantes de STIM1. Los mioblastos C2C12 se transfectoron con Flag-STIM1 mutado a alanina (A) o a glutamato (E) en los residuos de estudio (EMPTY: Flag-empty; WT: Flag-STIM1-wild-type; S575A: Flag-STIM1-S575A; S608A: Flag-STIM1-S608A; S621A: Flag-STIM1-S621A; S575E: Flag-STIM1-S575E; S608E: Flag-STIM1-S608E; S621E: Flag-STIM1-S621E; WT; 3A: Flag-STIM1-S575A/S608A/S621A y 3E: Flag-STIM1-S575E/S608E/S621E); *Panel A*: Porcentaje de cierre, se cuantificó utilizando el software ImageJ; *Panel B*: Imágenes de las heridas a tiempo inicial (0 h) y tiempo final (10 h) del experimento para los mutantes con diferencias significativas con respecto a la línea silvestre. Los resultados corresponden a los valores medios de 3 experimentos diferentes. Barra de escala = 200 μ m. *Panel C*: Inmunoblot anti-STIM1, los lisados correspondientes a cada una de las condiciones estudiadas se sometieron a electroforesis y se revelaron con un anticuerpo anti-STIM1 para determinar el nivel de transfección. ((*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$)).

Las células se cultivaron hasta alcanzar una confluencia del 80% y se hizo una herida de unas 500 μ m utilizando una punta de pipeta (ver Métodos). En este momento

se tomaron imágenes de la herida, continuándose el cultivo durante 10-12 horas adicionales, momento en el que se cuantificó el porcentaje de cierre para cada condición experimental.

Los resultados obtenidos (figura 34) muestran que la desfosforilación constitutiva de STIM1 en sitios dianas de ERK1/2 (Flag-STIM1-S575A/S608A/S621A) reduce significativamente el porcentaje de migración en mioblastos C2C12 hasta niveles inferiores (30%) a los obtenidos en células transfectadas con el vector vacío (Flag-). La migración obtenida con el resto de variantes de STIM alcanza valores más elevados, entre el 50-70% de sellamiento, que no suponen diferencias significativas con respecto a los resultados obtenidos para STIM1-WT. Los resultados sugieren que la fosforilación de STIM1 en los tres residuos diana de ERK1/2 es necesaria para estimular la migración de mioblastos C2C12 en cultivo.

11.1.1. Los canales SOC están implicados en migración celular.

Es conocido que los niveles de Ca^{2+} citosólico regulan la migración celular (Berridge et al., 2003; Berridge and Tan, 2000a; Pettit and Fay, 1998) y que los incrementos de los niveles de Ca^{2+} se generan tanto por la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares, como en RE, como por el influjo de Ca^{2+} a través de la MP. Para determinar si este proceso está mediado por la entrada de Ca^{2+} a través de diversos canales de la MP o si, por el contrario, se debe mayoritariamente a la entrada de Ca^{2+} a través canales SOC (canales operados por depósitos) se trataron las células con: (1) SKF96365, que es un inhibidor de los canales SOC; (2) BAPTA-AM, que es un quelante de Ca^{2+} .

Para determinar la concentración de BAPTA necesaria para quelar la mayor parte del Ca^{2+} citosólico en mioblastos C2C12 se hizo una titulación con diferentes concentraciones de BAPTA (5, 10 y 20 μM). Las células C2C12 se cargaron con fura2-AM durante 1 h, añadiendo el BAPTA en los últimos 20 minutos de incubación. A continuación se estimularon las células con 100 μM de ATP y 100 de μM carbachol (CCh) durante 1 min en HBSS con Ca^{2+} y se analizaron los niveles de Ca^{2+} citosólicos a las diferentes concentraciones de BAPTA utilizadas (Figura 35).

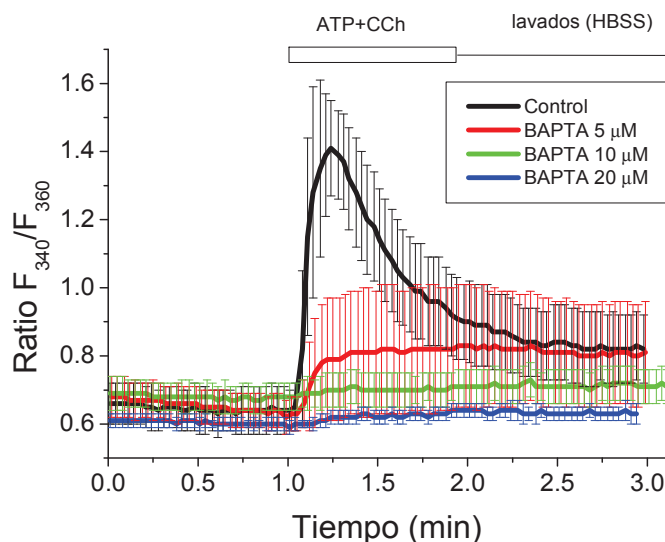


Figura 35. Optimización de la concentración de BAPTA necesaria para inhibir la entrada de Ca^{2+} en células C2C12. Células cargadas con fura2-AM se incubaron con diferentes concentraciones de BAPTA (0, 5, 10 y 20 μM) y se midió la concentración de Ca^{2+} citosólica tras la activación con ATP/carbacol (CCh) en medio con HBSS con Ca^{2+} . Los resultados corresponden a dos experimentos diferentes.

Los resultados muestran una fuerte inhibición del incremento de la concentración de Ca^{2+} libre citosólico en respuesta a ATP+CCh con 5 μM de BAPTA, mientras que a partir de 10 μM de BAPTA el incremento en los niveles de Ca^{2+} citosólico es prácticamente despreciable. Seleccionamos por tanto 5 μM de BAPTA ya que ésta es la concentración más baja, y por tanto la menos agresiva para la célula, que tampona significativamente los niveles de Ca^{2+} citosólico.

De manera similar, para optimizar la concentración de SKF96365 capaz de inhibir los canales SOC en mioblastos C2C12 estimulados con Tg, se ensayaron las concentraciones 1, 5 y 10 μM de SKF96365. Como se puede ver en la figura 36, el tratamiento con SKF96365 1 μM reduce el incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólica en respuesta a Tg de forma muy leve. Por otro lado, los tratamientos con SKF96365 5 y 10 μM son más efectivos, reduciéndose considerablemente el incremento de la concentración de Ca^{2+} citosólica por el bloqueo de canales SOC. Seleccionamos en este caso la concentración SKF96365 10 μM para los siguientes experimentos.

Una vez establecidas las concentraciones de SKF96365 y BAPTA-AM se llevó a cabo un ensayo de sellamiento de heridas. Para ello se cultivaron los mioblastos C2C12, se hicieron las heridas y se añadió al medio SKF96365 10 μM o BAPTA-AM 5 μM . En

la Figura 37 se muestra una imagen de las heridas a tiempo inicial (Ti), que corresponde a tiempo 0 y tiempo final (Tf), que corresponde a 6 horas de tratamiento.

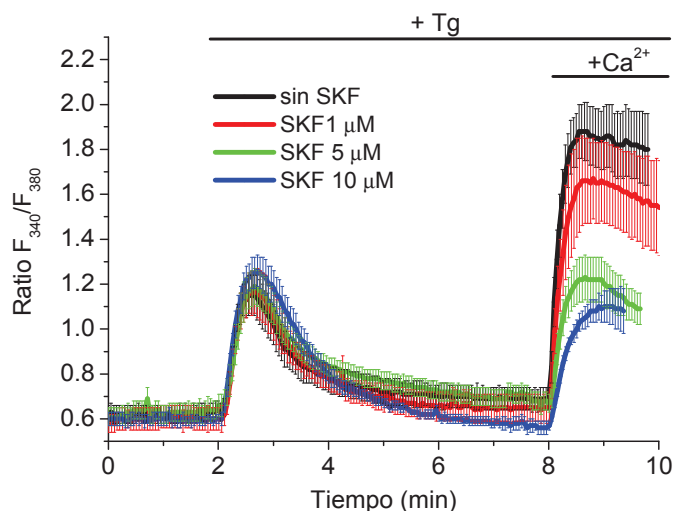


Figura 36. Optimización de la concentración de SKF96365 necesaria para inhibir los canales SOC en células C2C12. Las células cargadas con fura2-AM se trataron con Tg 1 μM para inducir el vaciado de los depósitos intracelulares y activar los canales SOC. Además, se añadieron al medio diferentes concentraciones de SKF96365 y se midió la concentración de Ca^{2+} citosólico. Los resultados corresponden a dos experimentos independientes.

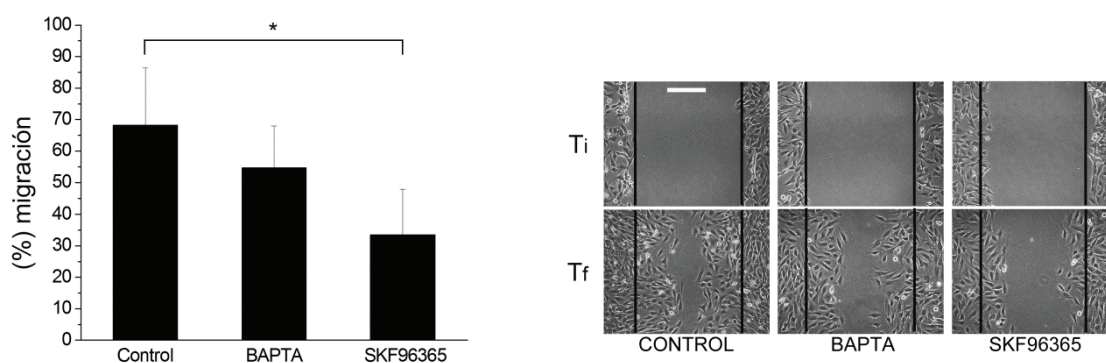


Figura 37. Migración de mioblastos C2C12 tratados con BAPTA 5 μM y SKF96365 10 μM . Los mioblastos C2C12 se cultivaron en medio completo hasta alcanzar una confluencia del 80%. En ese momento se hicieron las heridas (Ti) y se siguió el sellamiento de la herida durante 6 h (Tf). El sellamiento de la herida se cuantificó para los diferentes tratamientos utilizando el software ImageJ. Los resultados corresponden a cuatro experimentos diferentes. Barra de escala 200 μm . ((*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$)).

Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con BAPTA y el tratamiento de SKF96365 reducen el cierre de la herida, aunque sólo de forma estadísticamente significativa en el caso de SKF96365. De esta forma, el porcentaje de

migración en células sin tratar es del 70%, frente al 50% de migración obtenido en células tratadas con BAPTA. Finalmente, el porcentaje de migración obtenido tras el tratamiento con SKF96365 es del 35%. En su conjunto los resultados sugieren que la entrada de Ca^{2+} a través de canales SOC podría estar modulando la migración celular.

11.2. La fosforilación de STIM1 en sitios dianas de ERK1/2 regula el reciclaje de adhesiones focales en mioblastos C2C12.

La migración celular es un proceso secuencial que incluye varios pasos interrelacionados entre sí. Entre estos pasos se encuentran la formación de lamelipodios y protrusiones de la MP en el frente de avance, ciclos de adhesión y separación al sustrato, contracción de la célula y retracción de la cola de migración (Ridley et al., 2003). En el proceso de migración el reciclaje de adhesiones focales tiene una función crucial. Las pequeñas adhesiones focales emergentes en el frente de avance sirven como puntos de tracción para las fuerzas que mueven el cuerpo celular hacia delante. Por otra parte, la desorganización de adhesiones focales en la cola de migración permite la retracción de ésta y la ulterior translocación de la célula en la dirección del movimiento (Webb et al., 2002).

En este proceso es clave la señalización mediada por Ca^{2+} (Pettit and Fay, 1998) y se ha descrito que uno de los mecanismos implicados en esta señalización podría ser la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos intracelulares (Berridge and Tan, 2000b; Clark and Weaver, 2008; Chen et al., 2010; Fabian et al., 2008; Lee et al., 1999; Tian et al., 2010). En este sentido, ya hemos visto que la fosforilación de STIM1 en sitios dianas de ERK1/2 modula la migración celular. Dado que SOCE y consecuentemente STIM1, regula también el ensamblaje/desensamblaje de adhesiones focales, nos planteamos determinar si la fosforilación de STIM1 en las Ser575, Ser608 y Ser621 podría influir en el reciclaje de adhesiones focales.

Para estudiar las adhesiones focales los mioblastos C2C12 se cotransfectaron con proteínas marcadoras de adhesiones focales (paxilina y zixina) y con mutantes de STIM1 que emulan la desfosforilación o la fosforilación constitutiva de STIM1 en los residuos de estudio. De esta forma, se transfectaron las células con paxilina-GFP (PXN-GFP) o zixina-GFP (ZXN-GFP) y con Flag-STIM1-WT, Flag-STIM1-S575A/S608A/S621A (STIM1-3A) o Flag-STIM1-S575E/S608E/S621E (STIM1-3E) y se cultivaron en medio completo hasta alcanzar una confluencia del 50-60%.

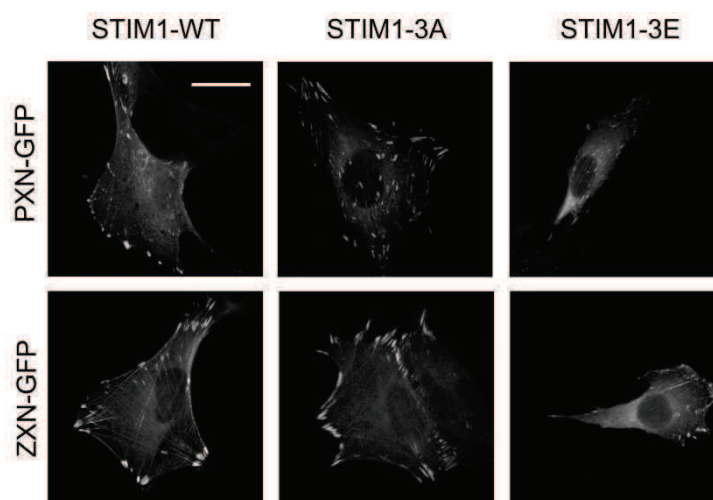


Figura 38. Adhesiones focales en mioblastos C2C12. Los mioblastos C2C12 se cotransfectaron para la expresión de paxilina-GFP (PXN-GFP) o zixina-GFP (ZNX-GFP) y Flag-STIM1-WT (STIM1-WT), Flag-STIM1-S575A/S608A/S621A (STIM1-3A) o Flag-STIM1-S575E/S608E/S621E (STIM1-3E). Se cultivaron en medio completo y tras 20-24 horas en cultivo se fijaron, tomando fotografías de PXN-GFP (*fila superior*) o ZNX-GFP (*fila inferior*). Los resultados son representativos de tres experimentos diferentes. Barra de escala 20 μ m.

Una vez alcanzada esta confluencia los mioblastos C2C12 se fijaron con PFA 4% y se observaron con un microscopio de fluorescencia invertido. Se tomaron imágenes de las células que sobre-expresan PXN-GFP o ZNX-GFP y que están cotransfectadas con cada uno de los mutantes de STIM1 indicados (figura 38). Las imágenes obtenidas muestran un menor número y tamaño en las adhesiones focales formadas en los mioblastos que sobre-expresan Flag-STIM1-S575E/S608E/S621E (en la figura, STIM1-3E) mientras que el número y tamaño de éstas es semejante en las células que sobre-expresan la proteína silvestre (en la figura, STIM1-WT) o Flag-STIM1-S575A/S608A/S621A (en la figura, STIM1-3A). Lo que indica que la fosforilación de STIM1 podría estar relacionada con el desensamblaje de adhesiones focales.

Este análisis cualitativo se confirmó cuantificando el número y tamaño de adhesiones focales, utilizando para ello el software ImageJ (figura 39). Para el análisis cuantitativo se evaluaron tres parámetros diferentes: el número total de adhesiones focales por célula (gráficos A y D), el área total de adhesiones focales por célula (entendida como la suma del área individual de cada adhesión focal; gráficos B y E) y, por último el área individual de cada adhesión focal (gráficos: C y F).

Con relación al número de adhesiones totales por célula (figura 39.A y D), los resultados obtenidos indican que, de manera significativa, hay un menor número de adhesiones focales por célula en aquellos mioblastos que sobre-expresan STIM1-S575E/S608E/S621E (aproximadamente 10 adhesiones por célula) y esto ocurre tanto con paxilina como con zixina. Además, en el caso del marcador zixina (figura 39.D) se observan también diferencias significativas entre STIM1-WT (20 adhesiones/célula) y STIM1-S575A/S608A/S621A (33 adhesiones/célula), de manera que el mutante Ser/Ala es el que presenta el mayor número de adhesiones por célula.

Respecto al área total de adhesiones focales por célula (figura 39.B y E), los resultados son similares a los descritos anteriormente, de forma que el área total en células que sobre-expresan Flag-STIM1-S575E/S608E/S621E es de unas $5 \mu\text{m}^2$, un valor significativamente menor al obtenido en células que expresan la proteína wild type tanto con paxilina ($20 \mu\text{m}^2$) como con zixina ($15 \mu\text{m}^2$). Además, al igual que ocurre para el número de adhesiones totales, se observa que en el caso del marcador zixina (figura 39.E), las células transfectadas con el mutante Ser/Ala presentan un mayor área total de adhesiones focales por célula ($35 \mu\text{m}^2$).

Finalmente, al estudiar el tamaño de las adhesiones focales individuales (figura 39.C y F) marcadas con paxilina o zixina encontramos que, en ambos casos, las adhesiones de menor tamaño se encuentran en los mioblastos C2C12 transfectados con Flag-STIM1-S575E/S608E/S621E. De esta forma, para las adhesiones marcadas con paxilina (figura 39.C) encontramos que el área por adhesión focal es mayoritariamente de entre $0,5-1 \mu\text{m}^2$ para las líneas WT y 3A, aunque podemos llegar a encontrar adhesiones de $2 \mu\text{m}^2$ y $3,5 \mu\text{m}^2$ respectivamente. Como se puede ver en los gráficos de la figura 39, en las células que sobre-expresan Flag-STIM1-S575E/S628E/S621E este área es inferior a $0,5 \mu\text{m}^2$ y el tamaño máximo se queda por debajo de $1 \mu\text{m}^2$. Por otro lado, en el caso de zixina (figura 39.F) las adhesiones focales alcanzan las $4 \mu\text{m}^2$ (línea Flag-STIM1-S575A/S608A/S621A), llegando sólo hasta $3 \mu\text{m}^2$ en la línea wild type, mientras que la emulación de una fosforilación constitutiva de STIM1 da como resultado adhesiones de menos de $1 \mu\text{m}^2$.

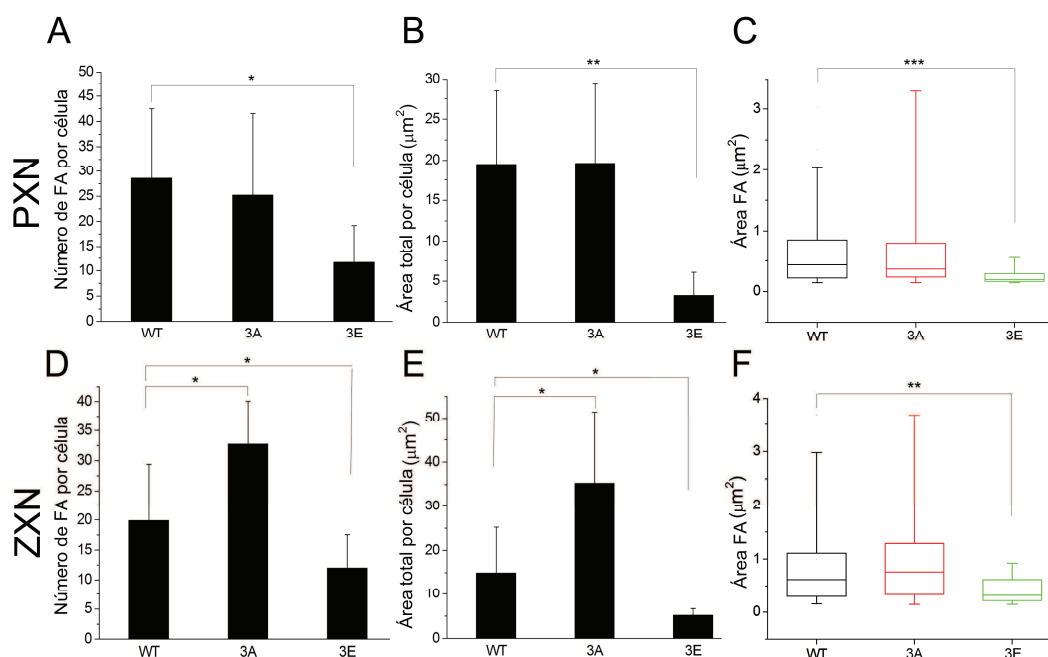


Figura 39. Cuantificación del número, área por célula y área individual de adhesiones focales. A partir de mioblastos C2C12 fijados se hizo un recuento del número de adhesiones focales por célula, el área total de éstas adhesiones por célula y el área individual de cada adhesión utilizando para ello células cotransfectadas con PNX-GFP o ZNX-GFP y mutantes de STIM1 que emulan la desfosforilación (3A) o fosforilación (3E) constitutiva de la proteína. Como control se utilizaron mioblastos que sobre-expresan la proteína wild type. Los resultados obtenidos corresponden al análisis de 100 células por condición evaluadas a partir de tres experimentos diferentes. ((* p < 0,05; (** p < 0,01; (***) p < 0,001)).

Estos resultados indican que la fosforilación constitutiva de STIM1 en sitios dianas de ERK1/2 reduce el número y tamaño de las adhesiones focales, lo que es consecuente con una migración más rápida. Lo contrario ocurre cuando trabajamos con mutantes de STIM1 que emulan una desfosforilación constitutiva en las Ser575, Ser608 y Ser621. En este caso el número y tamaño de las adhesiones focales es similar (paxilina) o superior (zixina) al observado en la línea wild type. Es decir, la fosforilación/desfosforilación de STIM1 en sitios dianas de ERK1/2 regula la cinética de las adhesiones focales, de manera que una fosforilación constitutiva agiliza el proceso de reciclaje, mientras que la desfosforilación constitutiva en estos residuos tendría el efecto contrario, ralentizándolo y dando lugar a adhesiones focales más numerosas y de mayor tamaño.

11.3. La localización de fosfo-STIM1 en mioblastos C2C12 está polarizada.

En la migración celular están implicadas numerosas proteínas y moléculas diferentes. Para que la célula migre de manera eficiente ésta debe integrar diferentes señales celulares para establecer las zonas de avance y retracción celular (Le Clainche and Carlier, 2008; Small et al., 2002; Webb et al., 2002).

Por otro lado, hemos visto que la fosforilación de STIM1 modula el proceso de migración celular (figura 37), así como el reciclaje de adhesiones focales (figura 39). Dado que STIM1 es un componente clave en SOCE, y que la fosforilación de esta proteína modula su actividad, nos planteamos estudiar el efecto de la fosforilación de STIM1 en el establecimiento del frente de avance durante la migración celular. Para ello estudiamos la localización de fosfo-STIM1 en mioblastos C2C12, para así determinar si existe una localización polarizada de esta proteína en zonas de avance o de retracción celular, durante la migración celular.

Una de las estructuras presentes en el frente de avance es el citoesqueleto de actina. La rápida polimerización/despolimerización de los filamentos de actina es la principal fuerza motora para que las células avancen en la dirección del frente (Mitchison and Cramer, 1996; Pollard and Borisy, 2003). Una de las técnicas más utilizadas para localizar el frente de avance es el marcaje de fibras de actina (f-actina) con el marcador fluorescente faloidina. En este trabajo se fijaron los mioblastos C2C12 y se marcaron con faloidina-Atto 565, para localizar el frente de avance, y en paralelo se analizó la localización fosfo-Ser575-STIM1 mediante ensayos de inmunolocalización (figura 40).

Los mioblastos C2C12 se cultivaron en medio completo utilizando placas IBIDI. Las células se dejaron crecer hasta alcanzar una confluencia del 70-80% y se hizo una herida en la monocapa del cultivo. A continuación se fijaron los mioblastos con PFA 4% y se analizó la inmunolocalización de fosfo-Ser575-STIM1. Seguidamente se marcaron las células con faloidina-Atto 565 y se observaron con un microscopio invertido de fluorescencia. Para analizar la distribución de f-actina y STIM1-(fosfo-Ser575) se tomaron imágenes con un objetivo 100x de inmersión en aceite (figura 40).

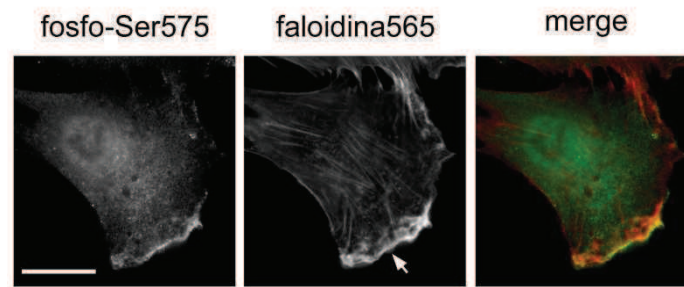


Figura 40. Doble marcaje fosfo-Ser575-STIM1 y f-actina en mioblastos C2C12. Los mioblastos C2C12 se cultivaron en placas IBIDI con fondo de vidrio hasta alcanzar una confluencia del 70-80%. A continuación se fijaron las células y se hizo un doble marcaje utilizando un anticuerpo anti-fosfo-Ser575-STIM1 (verde) y el marcador faloidina-Atto 565 (rojo). Barra de escala = 20 μm .

En la figura 40 se puede observar la distribución de los filamentos de actina teñidos con faloidina (rojo). F-actina marca las fibras de estrés a lo largo de toda la célula, sin embargo la zona del frente de avance queda fuertemente marcada por filamentos de actina entrecruzados (indicados por la flecha). Por otro lado, fosfo-Ser575-STIM1 (verde) se distribuye de forma homogénea por todo el cuerpo celular, observándose una acumulación de esta proteína en la zona del frente de avance. En la superposición entre los dos marcajes (merge) podemos observar que existe una fuerte co-localización de fosfo-Ser575-STIM1 y los filamentos entrecruzados de actina en el frente de avance, lo que sugiere la implicación de fosfo-STIM1 en migración celular.

Una vez visto que STIM1 fosforilado en la Ser575 se encuentra principalmente en las zonas de avance de mioblastos C2C12 en migración, pasamos a hacer un estudio más amplio del papel de fosfo-STIM1 en migración celular. Para ello se analizó la fosforilación de STIM1 en residuos dianas de ERK1/2 utilizando los anticuerpos fosfo-específicos (fosfo-Ser575-STIM1, fosfo-Ser608-STIM1 y fosfo-Ser621-STIM1) y se ensayaron las condiciones que se detallan a continuación (figura 41).

Para determinar si la fosforilación en los residuos de estudio está mediada exclusivamente por las quinasas ERK1/2 o si existen otras proteínas quinasas que fosforilan a STIM1 en estos residuos en el frente de avance, se trataron las células con PD0325901 0.5 μM . El inhibidor se añadió al medio de cultivo 20 minutos antes de hacer la herida y se conservó durante todo el ensayo (figura 41, columna central). Como control y para determinar la especificidad de nuestros anticuerpos fosfoespecíficos se trataron las células con fosfatasa lambda. Las células ya fijadas se trataron con fosfatasa

λ (10 U/ μ l) durante 12-16 h a 30°C para desfosforilar todos los residuos fosforilados y a continuación se llevó a cabo el ensayo de inmunolocalización celular (figura 41). La figura 41 muestra los diferentes tratamientos utilizados para estudiar la distribución de STIM1 fosforilado en cada uno de estos residuos: (i) un primer grupo control de células en condiciones basales, (ii) células tratadas con PD0325901, que inhibe a ERK1/2 y (iii) células tratadas con fosfatasa λ . Los resultados mostrados en la figura 41 indican que STIM1 fosforilado en los sitios dianas de ERK1/2 se encuentra mayoritariamente en el frente de avance de la célula, es decir en aquellas áreas en las que hay una desorganización del citoesqueleto cortical necesario para la formación de protrusiones (figura 41, primera columna).

Como se puede ver en la segunda columna de la figura 41, el tratamiento con PD0325901 reduce en gran medida esa fosforilación en el frente de avance, lo que indica que estos tres residuos están fosforilados principalmente por ERK1/2, aunque puede haber otras quinasas implicadas en esta fosforilación, aunque en menor medida, puesto que queda un remanente de fosforilación. Además el tratamiento con fosfatasa λ (figura 41, columna derecha) muestra que se elimina totalmente la señal de STIM1 fosforilado en el frente de avance, lo que sirve como control negativo del experimento. Estos resultados demuestran que STIM1 fosforilado en las Ser575, Ser608 y Ser621, se encuentra mayoritariamente en el frente de avance y que la fosforilación de estos tres residuos es llevada a cabo mayoritariamente por las quinasas ERK1/2.

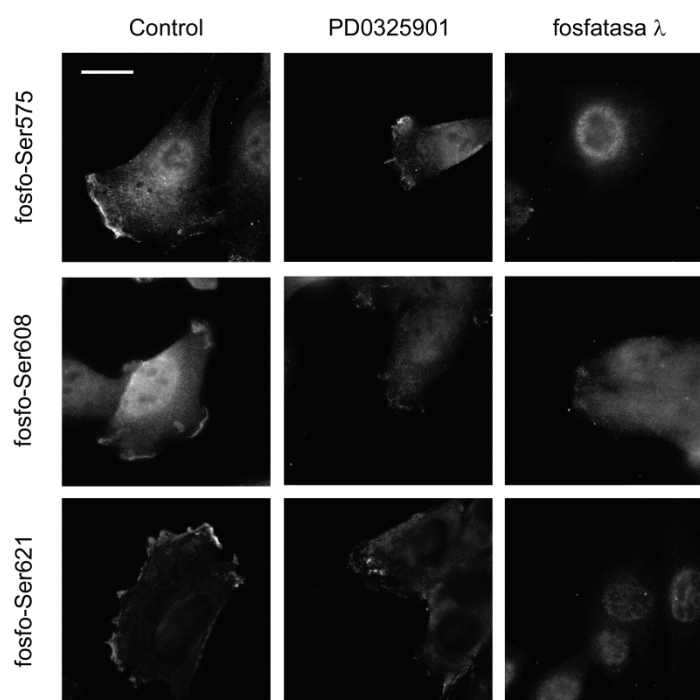


Figura 41. Inmunolocalización de fosfo-STIM1 en mioblastos C2C12. Se realizaron diferentes tratamientos para estudiar la distribución de STIM1 fosforilado en sitios dianas de ERK1/2: (i) grupo control de células en condiciones basales, (ii) células tratadas con PD0325901 y (iii) células tratadas con fosfatasa λ . Los mioblastos C2C12 se cultivaron y se trataron con PD0325901 0,5 μ M (columna central) 20 min antes de hacer la herida y antes de fijar con PFA. Por otro lado se trataron con fosfatasa λ 10-400 U/ μ l (columna derecha) tras la fijación con PFA. La columna izquierda corresponde a mioblastos C2C12 sin tratar. A continuación se realizó la inmunolocalización utilizando anticuerpos fosfo-específicos para los tres residuos de estudio. Las imágenes son representativas de tres experimentos diferentes. Barra de escala 20 μ m.

11.4. Fosfo-STIM1 colocaliza con cortactina.

Otro factor imprescindible en el proceso de migración es el establecimiento de un esqueleto de actina, y es conocido que el establecimiento del frente de avance se inicia con la polimerización localizada de actina en esa zona, donde da lugar a estructuras como lamelipodios y ruffles (ondas) (Pollard and Borisy, 2003; Small et al., 2002). En este sentido, cabe destacar el papel de cortactina, implicada en el entrecruzamiento de dichas fibras de actina. La cortactina (CTTN) es una proteína citosólica que contribuye a la organización del citoesqueleto de actina y por tanto, a la estructura celular. Esta proteína está implicada tanto en la formación de lamelipodios y en la migración celular, como en la formación de adhesiones focales y en su

desorganización. Por ello, y a la vista de los resultados anteriores nos propusimos estudiar la localización de fosfo-STIM1 y CTTN en mioblastos C2C12 en migración.

Los mioblastos C2C12 se cultivaron en medio completo en placas IBIDI con fondo de vidrio. Tras alcanzar una confluencia del 60-70% se hicieron heridas y se dejó migrar a las células durante 2-4 h. A continuación las células se fijaron y se hizo una doble inmunolocalización secuencial para localizar a las dos proteínas de estudio. En primer lugar se hizo la inmunolocalización con anticuerpos anti-fosfo-STIM1 y seguidamente se realizó sobre estas mismas células una inmunolocalización con anticuerpos anti-CTTN. En la figura 42 se muestran las imágenes obtenidas durante el estudio de la localización de los fosfo-residuos Ser575, Ser608 y Ser621 de STIM1 (columna izquierda) y CTTN (columna central). La figura muestra además, la superposición o colocalización (merge) de las dos proteínas de estudio (última columna), donde fosfo-STIM1 se muestra en color rojo y CTTN en color verde. Como se puede ver en el panel, tanto los fosfo-residuos de STIM1 como cortactina se encuentran distribuidos mayoritariamente por la periferia de la célula. Estos resultados indican que fosfo-STIM1 y CTTN colocalizan en el frente de avance de mioblastos C2C12 en migración. Este resultado se repite para los tres fosfo-residuos de STIM1 dianas de ERK1/2.

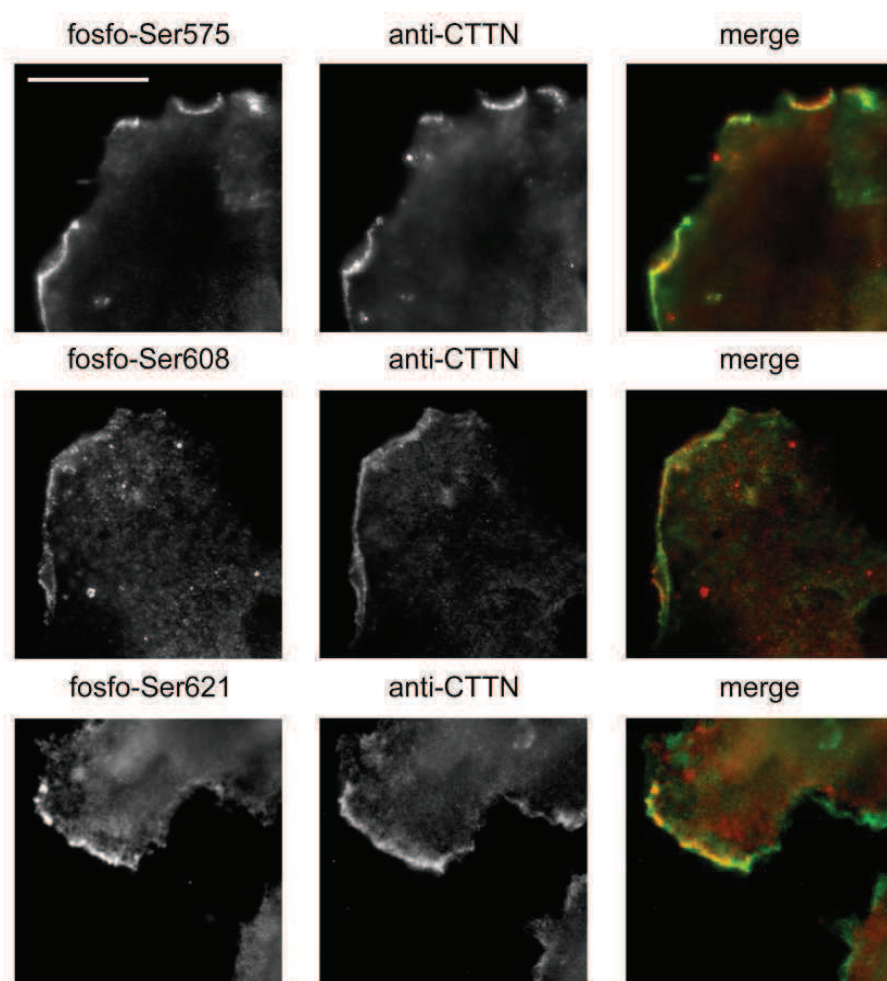


Figura 42: Colocalización entre fosfo-STIM1 y cortactina endógenos. Los mioblastos C2C12 se fijaron y se hizo una doble inmunolocalización: anti-fosfo-STIM1 para los residuos Ser575, Ser608 y Ser621 (rojo) y anti-CTTN (verde). Con las imágenes obtenidas se hizo una superposición (merge) para estudiar la colocalización de las dos proteínas. Los resultados son representativos de 3 experimentos diferentes. Barra de escala 20 μ m.

A continuación y para confirmar que es la fosforilación de STIM1 en sitios dianas de ERK1/2 lo que le da a esta proteína su localización en el frente de avance, se trataron las células con PD0325901 y se repitió el mismo experimento. De esta forma, se cultivaron los mioblastos C2C12 en placas IBIDI con fondo de vidrio hasta alcanzar una confluencia del 60-70%. A continuación y 20 min antes de hacer la herida se trataron las células con PD0325901 0,5 μ M. Pasadas 2h se fijaron las células con PFA 4% y se hizo una doble inmunolocalización anti-fosfo-STIM1 y anti-CTTN.

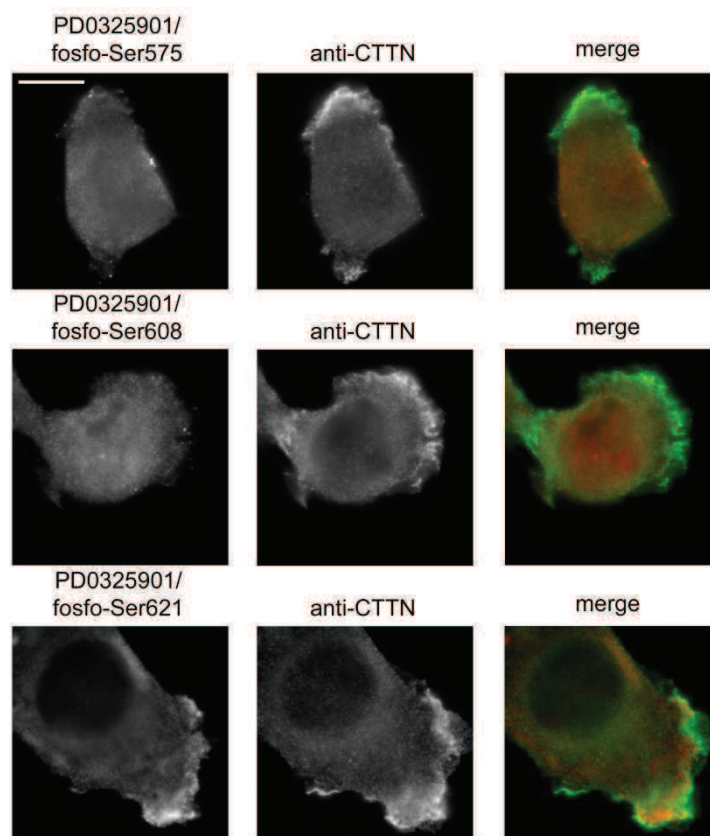


Figura 43. Colocalización de fosfo-STIM1 y cortactina endógenos en mioblastos C2C12 tratados con PD0325901. Los mioblastos C2C12 se pre-trataron con PD0325901 0.5 μ M durante 20 min antes de hacer la herida. Dos horas después de hacer la herida se fijaron las células y se realizó el doble marcaje de forma secuencial. *Primera columna:* anti-fosfo-STIM1 (Ser575, Ser608 y Ser621) pre-tratados con PD0325901. *Segunda columna:* anti-CTTN. *Tercera columna:* superposición o merge (fosfo-STIM1 en rojo y CTTN en verde). Las imágenes son representativas de 2 experimentos diferentes. Barra de escala 10 μ M.

Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con PD0325901 reduce significativamente la fosforilación de STIM1 en los tres residuos dianas de ERK1/2. Por otro lado, PD0325901 no afecta a la localización de CTTN, que conserva su distribución en el frente de avance. En el merge de la figura 43 se puede apreciar además, cómo el tratamiento con PD0325901 suprime la colocalización de fosfo-STIM1 con CTTN al reducir la fosforilación de STIM1 en las Ser575, Ser608 y Ser621.

Con estos resultados podemos sugerir que STIM1 fosforilado en sitios dianas de ERK1/2 se encuentra en el frente de avance de mioblastos C2C12 en migración y que esa localización solapa, al menos parcialmente, con la de CTTN. Por otro lado, la ausencia de fosfo-STIM1 no altera la localización de CTTN.

11.5. Localización de cortactina y STIM1 mutado.

Hemos visto hasta ahora que cortactina y STIM1 fosforilado colocalizan en la zona del frente de avance de mioblastos C2C12 en migración donde ambas proteínas parecen ser necesarias: una para el entrecruzamiento de las fibras de actina y la otra para mediar la señalización por Ca^{2+} a través de canales SOC. Sin embargo, falta determinar cómo afecta la fosforilación/desfosforilación constitutiva de STIM1 a la polarización de esta proteína y si este patrón de fosforilación afecta a la colocalización con CTTN.

Con este objetivo se transfectaron los mioblastos C2C12 con cortactina y STIM1 mutado en los sitios dianas de ERK1/2. Los mioblastos C2C12 se cultivaron en cubreobjetos estériles pretratados con colágeno y se transfectaron para la expresión de CTTN-Cherry y STIM1-GFP (STIM1-WT-GFP (STIM1-WT), STIM1-S575A/S608A/S621A (STIM1-3A), STIM1-S575E/S608E/S621E (STIM1-3E)). Tras alcanzar una confluencia del 60-70% se fijaron las células y se montaron para su observación con un microscopio de fluorescencia.

La figura 44 muestra la localización de STIM1 mutado en los residuos de estudio. Como se puede apreciar en el panel, la distribución de STIM1-WT, STIM1-3A y STIM1-3E es reticular y se encuentra ocupando todo el citoplasma de la célula. Por otro lado se muestra la localización del tándem STIM1-EB1 incapaz de relocalizar en el frente de avance.

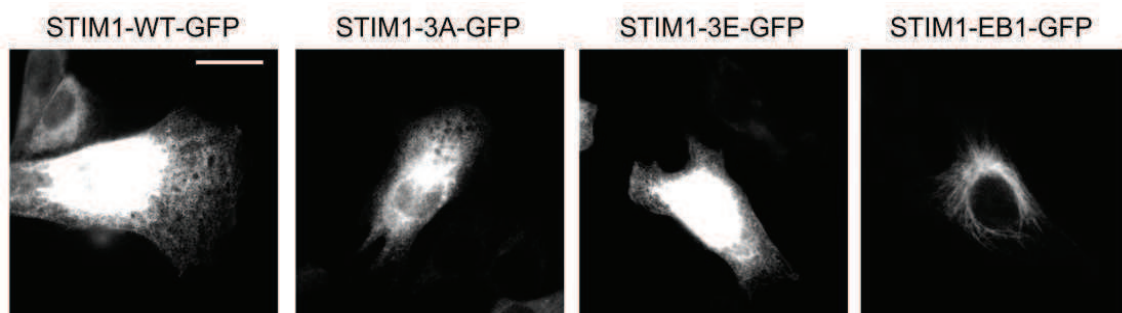


Figura 44. Localización de STIM1 mutado en mioblastos C2C12. Las células se transfectaron con STIM1-GFP mutado en sitios dianas de ERK1/2 (STIM1-WT, STIM1-3A, STIM1-3E), se fijaron y se montaron para su observación con microscopía óptica de fluorescencia. Como control negativo de este ensayo se utilizó STIM1-EB1-GFP, que es incapaz de relocalizar en el frente de avance. Barra de escala 20 μm . Las imágenes han sido sobreexpuestas para visualizar la región periférica con mayor claridad.

A continuación se estudió en detalle la zona del frente de avance. La figura 45 muestra la localización de STIM1 (primera columna) y CTTN (columna central) en mioblastos C2C12. Como se puede apreciar, la expresión de STIM1 mutado no afecta a la distribución de cortactina que, en todos los casos, conserva su polarización característica en el frente de avance. Con respecto a la localización de STIM1 puede observarse una distribución reticular de la proteína por todo el citosol que se prolonga hasta la zona del frente, salvo como ya se había visto en la figura 44 con el tándem EB1-STIM1. Cabe destacar, sin embargo, que la defosforilación de STIM1 (STIM1-3A) conlleva un menor acercamiento de STIM1 a regiones del frente de avance, como se puede ver en el merge (*tercera columna*) entre STIM1 y CTTN. Por el contrario, la fosforilación constitutiva de STIM1 (STIM1-3E) tiene como consecuencia un mayor acercamiento de la proteína a regiones de la membrana que coinciden con el frente de avance (merge, *tercera columna*) lo que conlleva un mayor solapamiento con cortactina. En el caso de STIM1-WT encontramos una situación intermedia con un acercamiento notable de la proteína a regiones ricas en cortactina.

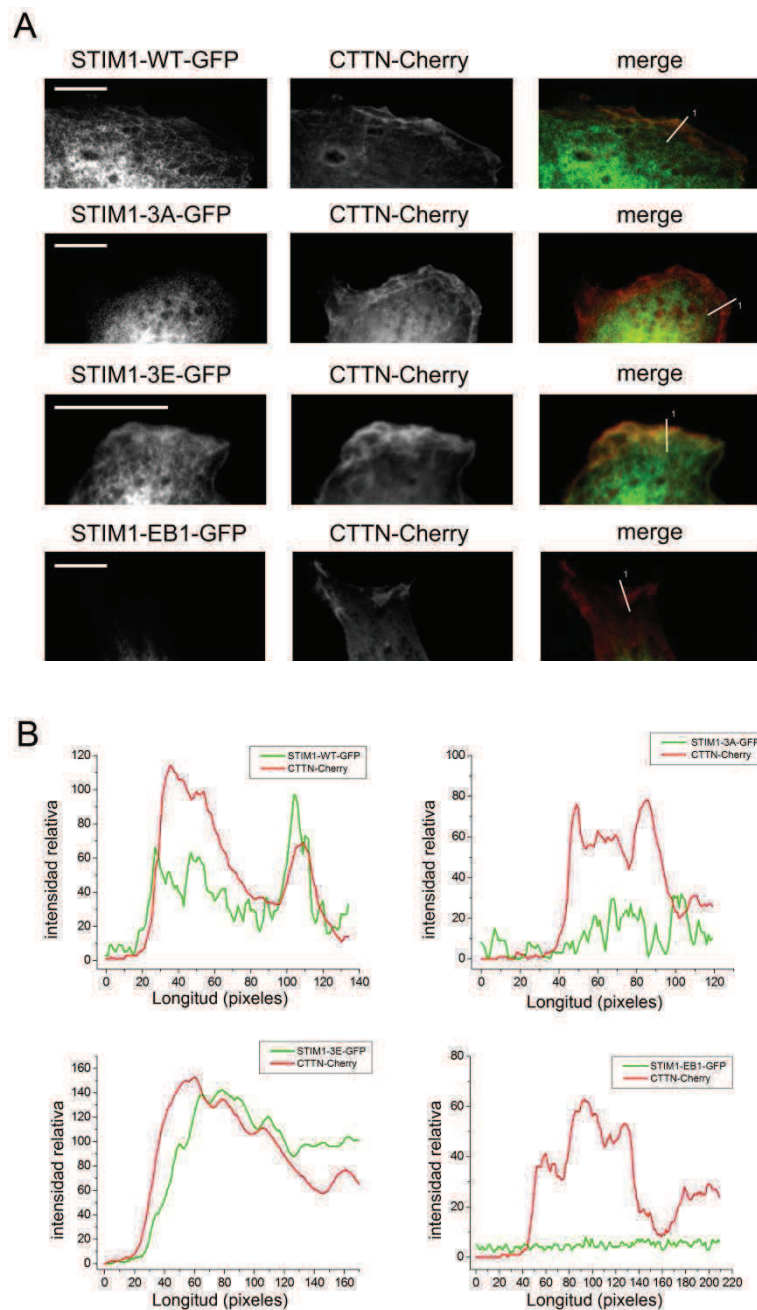


Figura 45. Localización de STIM1-GFP y CTTN-Cherry en el frente de avance de mioblastos C2C12 en migración. *Panel A:* Los mioblastos C2C12 se cotransfectaron con STIM1-GFP (STIM1-WT, STIM1-3A, STIM1-3E) y CTTN-Cherry y se cultivaron en medio completo. Como control negativo se utilizó STIM1-EB1-GFP. Las células fijadas se observaron con un microscopio de fluorescencia. Se tomaron imágenes de la zona del frente de avance con un objetivo 100x de inmersión en aceite. *Columna izquierda:* localización de STIM1-GFP, *columna central:* localización de CTTN-Cherry, *columna derecha:* merge o superposición de STIM1 y CTTN. Las imágenes son representativas de 4 experimentos diferentes. *Panel B:* gráficos representativos del perfil de intensidad para los diferentes mutantes de STIM1, que se representa gráficamente a partir del número 1 que aparece junto a la línea en la figura. Los datos son representativos de 3 experimentos diferentes. Barra de escala: 10 μ m.

Con el objetivo de cuantificar la co-localización de STIM1 y CTTN se realizó un perfil de intensidad utilizando para ello el software Olympus Fluoview 10 (figura 45). En el *panel A* (merge) se muestra el trazado de la línea para el perfil de intensidad (linescan). En el *panel B* aparece la cuantificación del nivel de fluorescencia a lo largo de la línea de análisis de los dos tags utilizados para marcar sendas proteínas (GFP y Cherry). Como se puede ver en los gráficos la máxima colocalización se observa entre CTTN y STIM1-3E donde el trazado de los dos fluorocromos es prácticamente paralelo. Por el contrario, la desfosforilación constitutiva de STIM1 (STIM1-3A) da lugar a una menor colocalización entre las dos proteínas de estudio, localizándose STIM1 en zonas cercanas al frente de avance pero por detrás de cortactina mayoritariamente. Por su parte, la proteína silvestre (STIM1-WT) presenta una colocalización parcial con cortactina que, aunque es menor que la obtenida para el mutante fosforilado (STIM1-3E), es muy superior a la obtenida con el mutante desfosforilado (STIM1-3A).

Con el fin de determinar cómo afecta la localización de STIM1 en los frentes de avance a la localización de CTTN en esta zona se utilizó la construcción STIM1-EB1-GFP, que es incapaz de relocalizar en los frentes de avance tras su activación (Grigoriev et al., 2008). Resultados previos de nuestro laboratorio muestran que para una completa activación de STIM1 es necesaria su separación de EB1 (Casas-Rua et al., 2015; Pozo-Guisado et al., 2013) y que esta separación ocurre tras la fosforilación de la proteína en los residuos diana de ERK1/2. La figura 44 muestra que los mioblastos C2C12 que sobre-expresan STIM1-EB1 presentan una distribución anómala de la proteína, que permanece formando un ovillo en regiones cercanas al núcleo. Así mismo, en la figura 45 se puede ver que no existe colocalización alguna entre STIM1-EB1 y CTTN, puesto que STIM1-EB1 permanece en zonas cercanas al núcleo de la célula, muy alejadas de la periferia. Por último, nuestros resultados muestran que la localización de CTTN no se ve afectada por la fosforilación de STIM1 ni por la separación de STIM1-EB1, conservando en ambos casos su distribución reticular en el frente de avance.

Por tanto, estos resultados indican que la fosforilación de STIM1 en sitios dianas de ERK1/2 es necesaria para la localización de la proteína en zonas del frente de avance. Así mismo, demuestran que la separación de STIM1-EB1 es necesaria para una correcta localización y función de la proteína, de forma que la unión irreversible entre STIM1-EB1 impide la correcta distribución de STIM1 por el retículo endoplasmático y bloquea su acercamiento a regiones cercanas al frente de migración drásticamente. Por

tanto, ambos procesos, la fosforilación y la separación de STIM1 de EB1, son necesarios para la polarización de STIM1.

11.6. La fosforilación de STIM1 en sitios dianas de ERK1/2 regula la dinámica de cortactina en el frente de avance.

Hemos visto que la fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2 afecta a la migración de mioblastos C2C12. Hemos comprobado además que esta fosforilación es necesaria para el reciclaje de adhesiones focales y para la localización de la proteína en regiones cercanas al frente de avance, donde colocaliza con cortactina. Sin embargo, falta estudiar cómo afecta la fosforilación de STIM1 a la dinámica de cortactina en estas regiones del frente de avance.

Para ello los mioblastos C2C12 se sembraron en cubres de vidrio pretratados con colágeno. La siembra se realizó en RPMI sin rojo fenol con 20% FBS, para una mejor visualización de las proteínas fluorescentes *in vivo* y se cotransfectaron las células con los mutantes de STIM1-Cherry (STIM1-WT, STIM1-3A y STIM1-3E) y GFP-CTTN. Tras 20-24h de la transfección se observan las células *in vivo* a 37°C montadas en una cámara de perfusión utilizando para ello un microscopio de fluorescencia invertido. Para estudiar la dinámica de cortactina se seleccionaron las células co-transfectadas con STIM1-Cherry para los tres mutantes de estudio (canal rojo) y a continuación se tomaron imágenes de GFP-CTTN (canal verde) para seguir el movimiento de la región celular enriquecida en CTTN. Se tomaron unos 120 fotogramas por célula a una velocidad de un fotograma cada dos segundos.

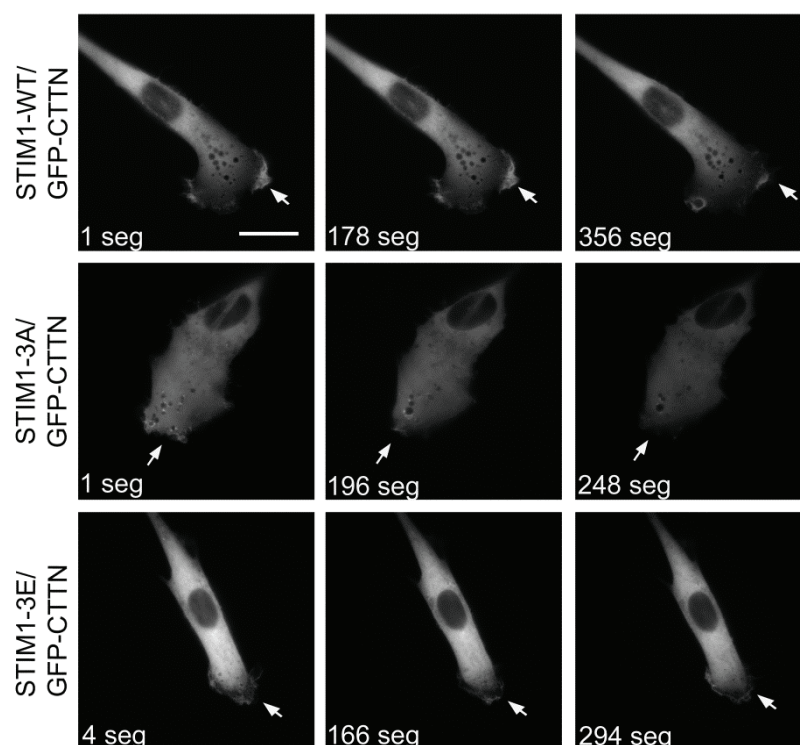


Figura 46. Dinámica de GFP-CTTN en mioblastos C2C12 que sobre-expresan mutantes de STIM1-Cherry. Los mioblastos C2C12 se cultivaron en RPMI sobre cubres de vidrio pretratados con colágeno y se transfectaron para la expresión de STIM1-Cherry (STIM1-WT, STIM1-3A y STIM1-3E) y GFP-CTTN. Pasadas 20-24 h de la transfección los mioblastos C2C12 se observaron con un microscopio invertido de fluorescencia con un objetivo 100x de inmersión en aceite. Se seleccionaron células transfectadas con STIM1-Cherry y se monitorizó la dinámica de GFP-cortactina capturando una imagen cada 2 segundos. Se tomaron 120 fotogramas por célula. Las imágenes son representativas de 4 ensayos diferentes. Barra de escala 20 μm .

La figura 46 muestra fotogramas de la dinámica de cortactina a diferentes tiempos para mioblastos C2C12 que sobre-expresan STIM1-Cherry mutado en los residuos dianas de ERK1/2 (ver vídeo figura 46, cd anexo). El panel muestra un menor número de filamentos de cortactina en el frente de avance de mioblastos C2C12 que sobre-expresan STIM1-3A, mientras que en las células que sobre-expresan STIM1-WT o STIM1-3E aparecen numerosos filamentos de cortactina. En los vídeos anexos se puede apreciar además una dinámica de cortactina mucho más activa en las líneas WT y 3E, donde se forman un mayor número de ruffles (flecha), frente a una dinámica muy lenta en las células que sobre-expresan STIM1 con la mutación Ser/Ala (3A). La cinética más rápida de cortactina se observa para el mutante STIM1-3E, dando lugar a un mayor número de ruffles por unidad de tiempo y con mayor grosor que en las otras líneas de estudio.

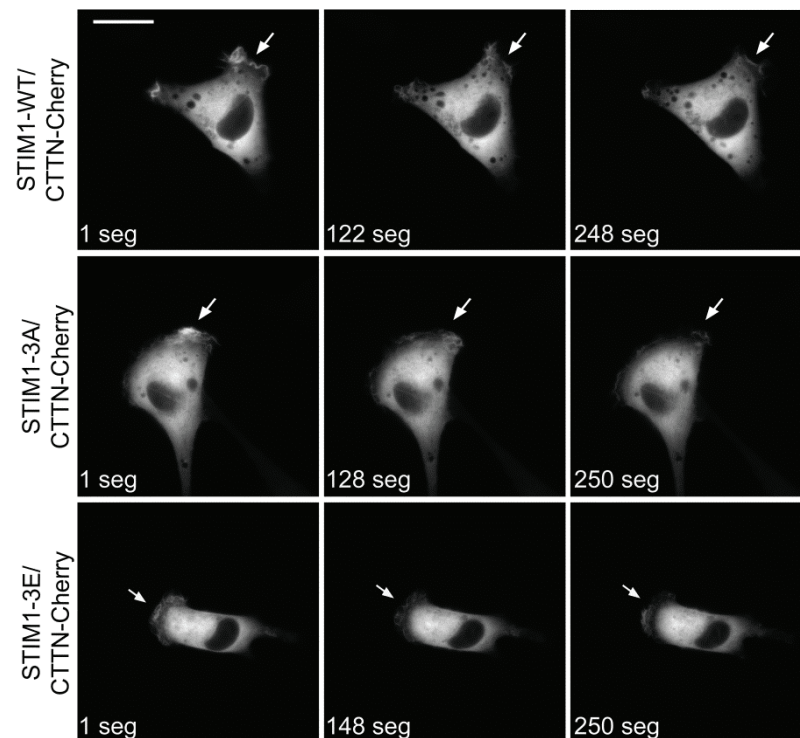


Figura 47. Dinámica de CTTN-Cherry en mioblastos C2C12 que sobre-expresan STIM1-GFP. Los mioblastos C2C12 se cotransfectaron para la expresión de STIM1-WT-GFP, STIM1-3A-GFP o STIM1-3E-GFP y CTTN-Cherry y se cultivaron hasta alcanzar una confluencia del 60-70%. Se seleccionaron las células que expresaban STIM1-GFP y se siguió el proceso de ensamblaje de CTTN-Cherry utilizando para ello un microscopio de fluorescencia invertido. Barra de escala 20 μm .

Para confirmar los resultados obtenidos se realizó el mismo experimento intercambiando los tags de las dos proteínas de estudio, es decir los mioblastos C2C12 se cotransfectaron con los tres mutantes de STIM1-GFP y con la proteína CTTN-Cherry. De esta forma se pretende demostrar que los resultados obtenidos son independientes del tag de la proteína. Se siguió el mismo protocolo seleccionando en este caso en primer lugar las células que expresaban STIM1 en el canal verde, y siguiendo la dinámica de protrusiones marcadas con cortactina en el canal rojo. La figura 47 muestra los resultados obtenidos, que coinciden con los descritos anteriormente para el mismo par de proteínas con los tags intercambiados. Los vídeos anexos (vídeo figura 47) demuestran así mismo, una cinética de ruffling de membrana (flecha) más rápida para mioblastos C2C12 que expresan el mutante STIM1-3E, frente a una cinética más lenta en aquellas células que sobre-expresan el mutante de STIM1 que emula la desfosforilación constitutiva de la proteína (STIM1-3A). Nuevamente, la cinética de cortactina en células que sobre-expresan la proteína silvestre es más lenta

que la obtenida para el 3E, pero más rápida que la obtenida con el 3A, como habíamos visto ya utilizando los tags STIM1-Cherry y GFP-CTTN.

Estos resultados sugieren que la fosforilación de STIM1 en sitios dianas de ERK1/2 está relacionada con la formación de ruffles en el frente de avance de mioblastos C2C12 en migración. Además, estos resultados sugieren que la desfosforilación constitutiva de STIM1 en las Ser575, Ser608 y Ser621 provoca una ralentización en la formación de protrusiones y lamelipodios dependiente de cortactina.

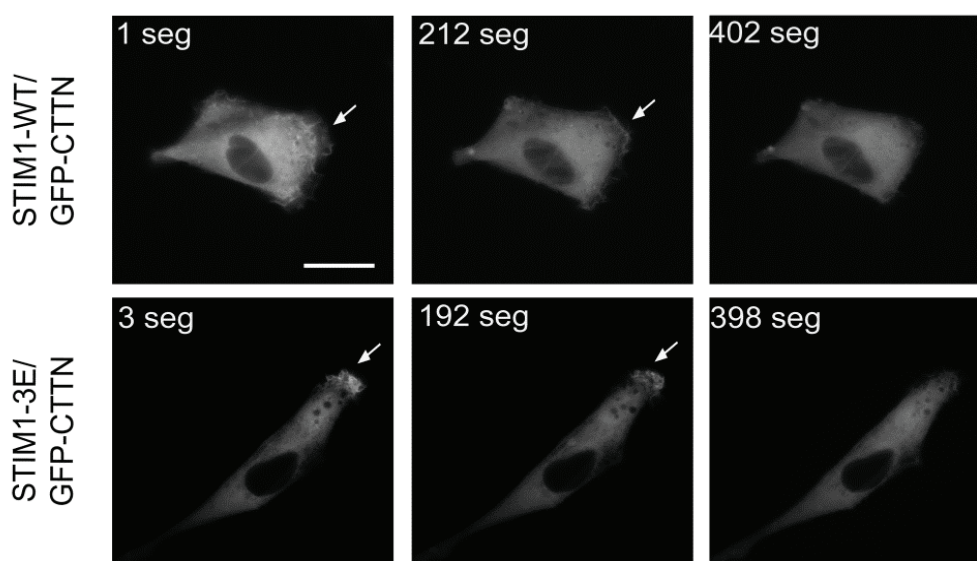


Figura 48. Cinética de GFP-CTTN en mioblastos cotransfectados con STIM1-WT-Cherry o STIM1-3E-Cherry tratados con SKF96365. Los mioblastos C2C12 se cultivaron en RPMI y se cotransfectaron con STIM1-WT-Cherry o STIM1-3E-Cherry y GFP-CTTN. Se siguió la cinética de CTTN tomando imágenes cada 2 segundos y se añadió SKF96365 10 μ M al medio a los 180-220seg. Se tomaron 400 fotogramas por célula. Las imágenes son representativas de 3 experimentos diferentes. Barra de escala 20 μ m.

Para determinar si la fosforilación de STIM1 es suficiente para modular la cinética de cortactina y la formación de ruffles o si también es necesaria la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular se trataron las células con SKF96365, un bloqueante de los canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática (figura 48). Los mioblastos C2C12 se cultivaron en RPMI con 20% FBS como en el experimento anterior y se transfectaron para la expresión de STIM1-WT-Cherry o STIM1-3E-Cherry y GFP-CTTN. Se seleccionaron las células cotransfectadas con ambas proteínas (canal rojo) y se siguió la dinámica de cortactina (canal verde) con un microscopio de fluorescencia. Las células

se colocaron en una cámara de perfusión a 37°C y se tomaron imágenes cada 2 segundos hasta un total de 200 fotogramas para seguir la cinética de cortactina. Se añadió SKF96365 10 μ M entre los 180-220 segundos y se continuó tomando fotogramas hasta unos 400 segundos.

La figura 48 muestra imágenes representativas del inicio del experimento (0-5 seg), el momento de adición de SKF96365 (180-220 seg) y el final del ensayo (390-410 seg). Como se muestra en la figura, tanto en el caso de mioblastos C2C12 que sobreexpresan STIM1-3E como en mioblastos C2C12 que sobreexpresan STIM1-WT se puede ver la formación activa de ruffles (flecha) desde el inicio del ensayo hasta el momento de la adición de SKF96365. Además, pasado un tiempo tras la adición de SKF96365, estos ruffles desaparecen totalmente. Los vídeos (vídeo figura 48) muestran cómo la rápida cinética del ruffling de membrana cesa tras unos segundos del tratamiento con el bloqueante de canales de Ca^{2+} SKF96365. Estos resultados indican que la entrada de Ca^{2+} está implicada en la formación de ruffles en mioblastos C2C12 y que mutantes de STIM1 (3A), que inhiben la activación de canales SOC, afectan a este proceso.

De igual forma que en el caso anterior se repitió el experimento co-transfectando los mioblastos C2C12 con las proteínas de estudio marcadas con diferentes tags. De manera que las células expresaran STIM1-GFP y CTTN-Cherry. Se seleccionaron las células que expresaban la proteína STIM1 en verde y se siguió el movimiento de cortactina en el canal rojo, tomando imágenes cada 2 seg. Pasados unos minutos se añadió al medio SKF963365 10 μ M para determinar su efecto sobre la formación de ruffles y la cinética de cortactina. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 49. En ambas condiciones se puede observar la formación de ruffles (flecha) de cortactina hasta la adición del SKF96365, así como el cese de la dinámica de cortactina debido al tratamiento con la droga, lo cual confirma que los resultados obtenidos son independientes del tag utilizado para marcar las dos proteínas de estudio (vídeo figura 49).

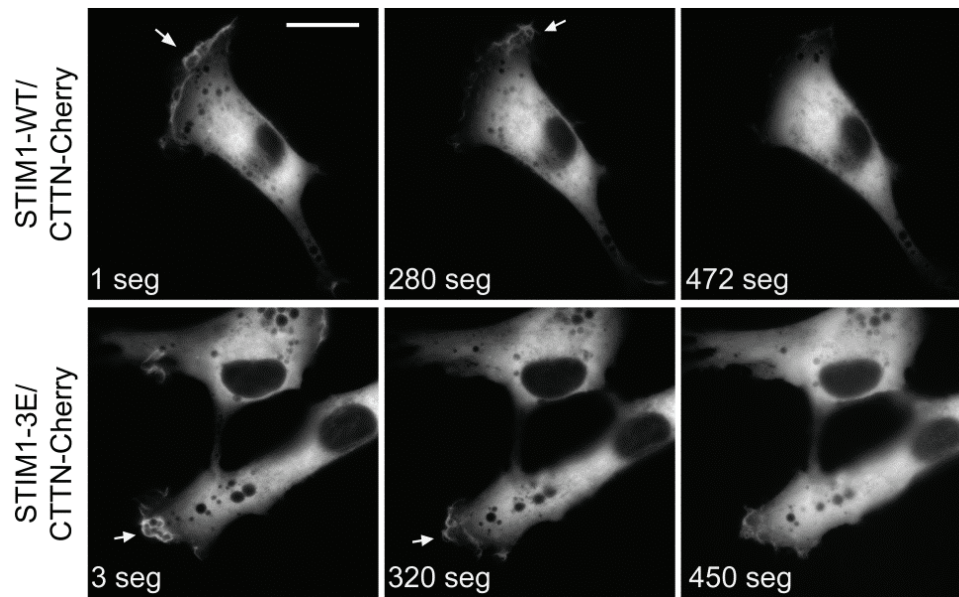


Figura 49. Cinética de CTTN-Cherry en mioblastos C2C12 cotransfectados con mutantes de STIM1-GFP tratados con SKF96365. Los mioblastos C2C12 se cotransfectaron para la expresión de STIM1-WT-GFP o STIM1-3E-GFP y CTTN-Cherry y se cultivaron en RPMI hasta alcanzar una confluencia del 60-70%. Se seleccionaron las células que sobre-expresaban STIM1-GFP y se siguió en ensamblaje de cortactina en el canal rojo. Se añadió SKF96365 al medio entre los 280-320 seg. Para ello se utilizó un microscopio invertido de fluorescencia, con un objetivo 100x de inmersión en aceite, tomando imágenes cada 2 seg. Barra de escala 20 μm .

Estos resultados sugieren que la entrada de Ca^{2+} a través de canales de la membrana plasmática regula la cinética de la localización de cortactina, y por tanto de formación de protrusiones del citoesqueleto y formación de lamelipodios, y que en ese proceso de entrada de Ca^{2+} es determinante la fosforilación de STIM1 en los sitios dianas de ERK1/2.

DISCUSIÓN

STIM1 fue definida como una fosfoproteína en los primeros trabajos que caracterizaron esta proteína (Manji et al., 2000) y diversos estudios de fosfoproteómica a gran escala realizados con células HeLa tratadas con diversos factores de crecimiento, revelan varios sitios de fosforilación en residuos de STIM1 (Olsen et al., 2006). Sin embargo, los experimentos a gran escala a menudo detectan tan solo residuos en los que la fosforilación es constitutiva o se presenta en un porcentaje muy elevado, mientras que los residuos de fosforilación transitoria escapan a este tipo de estudios no dirigidos a dianas concretas. Además, las implicaciones fisiológicas de la fosforilación están aún por determinar ya que existen muy pocos datos en la bibliografía reciente con respecto a este tema.

Entre estos trabajos destaca el llevado a cabo por el laboratorio de James W. Putney, que ha demostrado que la fosforilación de STIM1 en determinados residuos podría ser la causa de la inactivación de SOCE en células HEK293 bloqueadas en mitosis con nocodazol (Smyth et al., 2009). Estos autores observaron que en las células HeLa no se observan yuxtaposiciones RE-membrana plasmática en las que se concentre STIM1 durante la mitosis, tal y como sí ocurre en células en interfase. También encontraron que STIM1 es reconocido por el anticuerpo MPM-2 (mitotic protein monoclonal-2), que reconoce la secuencia LTPLK y la secuencia YWFSPL fosforiladas. Por otro lado, Smyth *et al.* (2009) describieron que la forma truncada de STIM1 en el residuo 482 deja de ser reconocida por el anticuerpo, lo que indica que los residuos fosforilados de STIM1 durante la mitosis se encuentran en el extremo C-terminal de la proteína (a partir del residuo 482). Además, la eliminación de este dominio de fosforilación en STIM1 permitió que la proteína pudiera multimerizarse en respuesta al vaciado de depósitos, sugiriendo que la fosforilación de estos residuos constituye la base molecular de la inhibición de SOCE durante la mitosis (Smyth et al., 2009). Los residuos Ser486 y Ser668 parecen ser los sitios preferenciales de fosforilación de STIM1 durante la mitosis, según este trabajo, y serían diana de la actividad quinasa de la CDK1 tanto *in vitro* como *in vivo*. La función de la fosforilación de estos residuos en la supresión de SOCE durante la mitosis se confirmó cuando estos autores demostraron que las células HEK293 en mitosis que co-expresaban ORAI1 y eYFP-STIM1-S486A/S668A mostraban un incremento significativo de SOCE en comparación con células que sobre-expresaban YFP-STIM1 wild-type (Smyth et al., 2009). Además, el análisis de los fosforesiduos de STIM1 que llevaron a cabo estos autores reveló que,

además de los dos residuos mencionados, las Ser492, Ser553, Ser575, Ser602, Ser608, Ser620 y Ser621 también se encontraban fosforiladas.

De forma paralela, el laboratorio de Khaled Machaca encontró varios residuos de Ser/Thr fosforilados en la secuencia de STIM1 obtenida a partir de oocitos de *Xenopus*, incluidos los residuos Ser575 y Ser621 (Yu et al., 2009). Sin embargo, su estudio estaba restringido a la Ser621 en oocitos bloqueados en meiosis, puesto que este residuo fue el único que se encontró de forma consistente tras diferentes análisis de espectrometría de masas empleando diversas muestras. Estos autores encontraron que los mutantes que simulan fosforilación constitutiva en Ser621 o aquellos que sustituyen este residuo por alanina (Ala) presentaban un perfil de multimerización durante la meiosis de oocitos similar al de STIM1 wild-type. Por ello, estos datos descartaban una relación directa entre la fosforilación de la Ser621 y la inactivación de SOCE durante la meiosis (Yu et al., 2009).

Se ha descrito que U0126, un inhibidor de MEK1/2, una quinasa que fosforila y activa ERK1/2, reduce la entrada de Ca^{2+} estimulada por la adición de Tg en plaquetas (Rosado and Sage, 2001). Este resultado sugiere la implicación de la ruta de MEK-ERK en la activación de SOCE, a pesar de que no existían evidencias directas sobre las posibles dianas de ERK1/2 durante la activación de SOCE en plaquetas en aquellos estudios iniciales. Se ha mostrado también que otros inhibidores de quinasa tienen un efecto parcial en la entrada de Ca^{2+} . Así, ML-9, un inhibidor de la quinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK, myosin light-chain kinase), inhibe SOCE en células HEK293 que expresan EYFP-STIM1-D76N/D78N (Smyth et al., 2007), un mutante de STIM1 que se encuentra activo de forma constitutiva. Sin embargo, estos autores argumentaron que los efectos del inhibidor ML-9 sobre SOCE no eran debidos a la inhibición de la enzima MLCK, sino a un efecto colateral del inhibidor, por lo que la diana molecular del efecto del ML-9 es aún desconocida.

Por otra parte, resultados de nuestro laboratorio han permitido describir que STIM1 resulta fosforilada en los residuos Ser575, Ser608, Ser621, cuya secuencia es muy similar a la secuencia diana canónica para la actividad ERK1/2 (Pozo-Guisado et al., 2010). La mutación de las Ser575, Ser608 y Ser621 a alanina para evitar la fosforilación de estos tres residuos provoca una fuerte reducción de la entrada de Ca^{2+} , demostrándose de esta forma que la fosforilación específica de estos sitios de STIM1 es

necesaria para activar SOCE. Esta observación no entra en conflicto con los dos trabajos previos mencionados anteriormente (Smyth et al., 2009; Yu et al., 2009), puesto que los primeros centraban el estudio en células en la fase M del ciclo celular (mitosis en el caso de células HEK293 y meiosis en oocitos de *Xenopus*). El hecho de que la fosforilación de otros residuos de STIM1 diferentes a los estudiados por Pozo-Guisado y cols. (Ser575, Ser608, Ser621) pueda estar relacionada con la modulación de SOCE durante mitosis y/o durante la interfase está, de hecho, aún por esclarecer.

Aunque existen otras quinasas que pueden estar relacionadas con la regulación de STIM1, los estudios de nuestro laboratorio, previos a este trabajo se han centrado en las quinasas ERK1/2 (Pozo-Guisado et al., 2010). Consecuentemente, los inhibidores de MEK1/2 que evitan la activación de las quinasas ERK1/2 también disminuyen la entrada de Ca^{2+} , puesto que la fosforilación de la proteína STIM1 es necesaria para activar SOCE. Por el contrario, la adición de TPA (un éster de forbol), que activa ERK1/2 fuertemente, aumenta SOCE en células que sobre-expresan Flag-STIM1, pero este incremento de SOCE no se observó en las células que sobre-expresan la proteína mutante Flag-STIM1-S575A/S608A/S621A (Pozo-Guisado et al., 2010).

El estudio del efecto de la fosforilación constitutiva de estos tres residuos (Ser575, Ser608, Ser621), uno de los objetivos de este trabajo, reveló que dicha fosforilación estimula la entrada de Ca^{2+} tras el vaciado de depósitos intracelulares de Ca^{2+} de forma similar a la obtenida en células que sobre-expresan STIM1 sin mutación alguna. En los ensayos de Pozo-Guisado y cols., se observó que la disminución de SOCE en células que expresan el mutante Ser/Ala no implica grandes alteraciones en la multimerización de STIM1-S575A/S608A/S621A-GFP en respuesta al vaciado de depósitos, ni tampoco afecta a la formación de yuxtaposiciones RE-MP (Pozo-Guisado et al., 2010). Así mismo, la mutación Ser/Glu de estos tres residuos tampoco muestra diferencias significativas con respecto a la multimerización de STIM1-GFP tras el tratamiento con Tg para inducir el vaciado de los depósitos intracelulares.

En este trabajo de Tesis Doctoral se partía por tanto de la idea de que la fosforilación de STIM1 en Ser575, Ser608 y Ser621 no es un requisito para la formación de multímeros inducida por el vaciado de depósitos, ya que éstos también son observados en el triple mutante Ser/Ala (STIM1-S575E/S608E/S621E). Sin embargo, y a partir de los experimentos mostrados en este trabajo que han estudiado la

cinética de esta multimerización, hemos demostrado que en ausencia de fosforilación en estos tres residuos la multimerización de STIM1 es significativamente más lenta. Por otra parte, el estudio cuantitativo de la multimerización de STIM1 llevado a cabo tras inducir el vaciado de depósitos por adición de TBHQ, inhibidor reversible de la SERCA, revela diferencias entre los diferentes mutantes. Así, el porcentaje de células con multimerización de STIM1 (detectable por microscopía de epifluorescencia) tras el tratamiento con TBHQ es muy inferior en las líneas celulares que sobre-expresan STIM1-S575A/S608A/S621A-GFP con respecto a los porcentajes obtenidos para las líneas STIM1-WT y STIM1-S575E/S608E/S621E-GFP, es decir que en ausencia de fosforilación, el número de células con multimerización de STIM1-GFP es menor. Por todo ello podemos afirmar que la fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2 está modulando la formación temprana de agregados de STIM1, acelerándola en el caso de inducir una fosforilación constitutiva y ralentizándola en el caso de desfosforilación constitutiva.

El análisis de la reversión del proceso de multimerización de STIM1 concuerda con esta última hipótesis, de manera que tras retirar el inhibidor de la SERCA en un medio con niveles milimolares de Ca^{2+} , se observa una reversión de la multimerización mucho más rápida para la proteína constitutivamente desfosforilada. Por el contrario, la reversión es mucho más lenta cuando la proteína está fosforilada de forma constitutiva, resultado que acaba confirmando que la fosforilación de STIM1 tiende a estabilizar los multímeros de esta proteína, mientras que la desfosforilación de la misma acelera la reversión de la multimerización. Estos resultados no implican que la fosforilación de los residuos 575, 608 y 621 sea el determinante exclusivo en la modulación de la multimerización de STIM1, pero sí permite plantear la hipótesis de que existan otros determinantes, tanto en STIM1 como en proteínas asociadas, que puedan actuar de sensores de esta fosforilación y que contribuyan a acelerar o ralentizar la multimerización de STIM1. En paralelo a este ensayo se observó, mediante inmunoblot, que los tres residuos citados se fosforilan tras el tratamiento con TBHQ y que esta fosforilación se revierte al lavar el inhibidor, de manera paralela a la multimerización de la proteína. Detrás de este proceso de fosforilación/desfosforilación de STIM1 podrían estar implicadas fosfatasas que desfosforilen a ERK1/2 inhibiendo su actividad. Los resultados obtenidos concuerdan con esta hipótesis, puesto que, de la misma forma que ocurre con STIM1, las quinasas ERK1/2 se fosforilan tras el tratamiento con TBHQ y se

desfosforilan al retirar el inhibidor y añadir medio de ensayo suplementado con Ca^{2+} . Sin embargo el estudio de las fosfatasa implicadas en este proceso escapa a los objetivos de este trabajo. Podemos afirmar por tanto, que existe una correlación entre la desfosforilación de ERK1/2 y la desfosforilación de STIM1, con la consecuente inactivación de ambas proteínas tras el rellenado de los depósitos intracelulares.

En el caso de células en mitosis se ha sugerido que la fosforilación de STIM1 puede estar relacionada con la disociación de STIM1 de los microtúbulos (Smyth et al., 2009), a pesar de que la disociación de STIM1 de los microtúbulos no parece ser esencial para la regulación de SOCE. Por otra parte, es conocido que STIM1 interacciona con la proteína de unión a microtúbulos EB1, y que esta interacción ocurre entre los aminoácidos 392-652 de STIM1 (Grigoriev et al., 2008), que incluye a los tres residuos objeto del presente trabajo de investigación. En este sentido, estudios recientes de nuestro grupo de investigación han mostrado que la fosforilación de STIM1 inducida por Tg en sitios dianas de ERK1/2 es necesaria para que se produzca la separación entre STIM1 y EB1, modulando de esta forma la localización de STIM1 y la activación de canales SOC (Pozo-Guisado et al., 2013).

Nuestros ensayos poblacionales indican que para la línea que expresa STIM1 wild-type el porcentaje de células que presentan multimerización es del 70% en presencia de Tg, no alcanzándose el 100% ya que en nuestros cultivos existe una población de células en mitosis (G2/M) del 20-25% aproximadamente, y en esta fase del ciclo celular STIM1 permanece inactivo y no sufre multimerización (Smyth et al., 2009). El máximo porcentaje de multimerización se obtiene para la línea celular STIM1-S575E/S608E/S621E, siendo cercano al 80%. Sin embargo, el porcentaje de células con multimerización de STIM1 en la línea celular STIM1-S575A/S608A/S621A es significativamente inferior, aunque este hecho parece estar relacionado con la desestabilización de los multímeros más que con una alteración del ciclo celular ya que el porcentaje de células en G2/M en esta línea es similar al de la línea wild-type o la línea STIM1-S575E/S608E/S621E. Estos resultados contrastan con la afirmación de que la multimerización de STIM1 no es dependiente de fosforilación (Pozo-Guisado et al., 2010; Smyth et al., 2009; Yu et al., 2009), si bien es cierto que, aunque la multimerización de STIM1 en respuesta al vaciado de depósitos se produce de forma independiente al estado de fosforilación de la misma, existen importantes diferencias cinéticas en este proceso.

Por otro lado, los ensayos de FRET y co-inmunoprecipitación realizados por Pozo-Guisado *et al.* muestran que la unión entre STIM1 y ORAI1 es dependiente de la fosforilación de STIM1, de modo que la mutación Ser/Ala en STIM1 conduce a una menor unión entre STIM1 y ORAI1 y como consecuencia una reducción de SOCE (Pozo-Guisado *et al.*, 2010). La explicación a este resultado previo de nuestro laboratorio que ahora ofrece este trabajo de Tesis Doctoral podría ser precisamente la menor multimerización de STIM1 cuando ésta se encuentra desfosforilada, unido a una cinética más lenta de multimerización, como hemos mostrado aquí, y que conduciría finalmente a un menor grado de unión a ORAI1. Los experimentos de FRET realizados en el trabajo que aquí se presenta llevado a cabo con la proteína STIM1 mutada a glutamato (Ser /Glu) en sitios diana de ERK1/2 muestran el efecto contrario, es decir, se produce una estimulación en el grado de unión entre STIM1 y ORAI1. Estos resultados apoyan la conclusión de que la fosforilación de STIM1 en estos residuos estaría promoviendo la activación de SOCE gracias a la aceleración de su multimerización, aproximación a la membrana plasmática y unión a ORAI1, mientras que la desfosforilación de STIM1 facilitaría la reversión de todos estos procesos. Por tanto, los resultados mostrados en este trabajo, junto con resultados previos de nuestro laboratorio (Pozo-Guisado *et al.*, 2010), demuestran el requerimiento de la fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2 para un acoplamiento completo que active SOCE tras el vaciado de depósitos intracelulares de Ca^{2+} inducido por la adición de Tg o TBHQ. Sin embargo, la cascada molecular que deriva de esta fosforilación, así como los mecanismos implicados en la reversión de la activación de los canales SOCs están aún por determinar.

Es conocido que el dominio C-terminal de STIM1 se asocia *in vitro* e *in vivo* con ORAI1 para estimular la función del canal sin que se formen agregados de moléculas de ORAI1-STIM1 (Muik *et al.*, 2008). Por otro lado, STIM1 también interacciona con TRPC1 abriendo el canal mediante interacciones electrostáticas, en las que participan los 2 residuos terminales de Lys de STIM1 (Zeng *et al.*, 2008), aunque la apertura de ORAI1, mediada por STIM1, no requiere los dominios polibásicos ni los dominios Ser-Pro de éste último. En este sentido, la apertura del canal SOC, así como la acumulación de cargas negativas por la fosforilación de las serinas en los dominios ricos en Ser-Pro podrían estar modulando la apertura de los canales SOCs. Sin embargo, la baja unión de la proteína STIM1 en estado desfosforilado al canal formado por ORAI1 sugiere que la

fosforilación de STIM1 podría modular a su vez la función de otros intermediarios que puedan ser requeridos para la unión y la apertura del canal SOC. Sin embargo, el número de participantes conocidos que actúan en la activación de los canales SOCs va en aumento y se ha descrito una proteína con un dominio de manos-EF, llamada CRACR2A, que se une a ORAI1 tras el vaciado de depósitos y regula SOCE (Srikanth et al., 2010). Una posibilidad que explicaría el distinto nivel de SOCE en función del grado de fosforilación de STIM1 sería que estas nuevas proteínas, como CRACR2A, estuvieran uniéndose con mayor o menor afinidad a STIM1 dependiendo de estado de fosforilación de ésta última en determinados residuos.

Varios estudios han identificado nuevos miembros que podrían estar implicados en la activación de SOCE que incluyen tanto a lípidos como a proteínas. El grupo de Luis Vaca definió a este complejo como SOCIC (store-operated calcium influx complex), en el cual participan, además de STIM1 y ORAI1, los canales TRPC1, la SERCA y la proteína de unión a microtúbulos EB1. Este autor propone que la interacción entre los diferentes componentes del complejo SOCIC se produce en balsas o rafts lipídicos (Vaca, 2010). Existen evidencias sólidas obtenidas por diversos grupos de investigación que demuestran que la disgregación de las balsas lipídicas afecta a SOCE (Alicia et al., 2008; Jo et al., 2008; Pani and Singh, 2009). La posibilidad de que la activación de miembros del complejo que media SOCE pueda ser dependiente de la fosforilación de sitios específicos en la secuencia de STIM1 para la activación de los canales SOCs, también constituye una hipótesis que podría explicar nuestros resultados, aunque esta hipótesis requiere futuros estudios para su validación.

Por otro lado, la proliferación celular y el influjo de Ca^{2+} desde el medio extracelular están íntimamente relacionados. Además SOCE está implicado en la proliferación celular (Abdullaev et al., 2008; El Boustany et al., 2008; Golovina et al., 2001; Sweeney et al., 2002), aunque en este punto existen datos contradictorios en la bibliografía reciente ya que el silenciamiento de STIM1 parece no mostrar un efecto claro sobre la proliferación de células HEK293 en cultivo, mientras que el silenciamiento de ORAI1 o de STIM2 disminuye significativamente la proliferación de estas células (El Boustany et al., 2010). Por otro lado, se ha mostrado que STIM1 es un importante regulador de la proliferación y la migración en células progenitoras embrionarias (EPCs) (Kuang et al., 2010), ya que el silenciamiento de la expresión de STIM1, mediante siRNA, suprime la proliferación y la migración de las EPCs *in vitro*,

que se revierte cuando vuelve a permitirse la expresión de la proteína. Esto sugiere que el influjo de Ca^{2+} a través de canales SOCs tiene una función importante en la proliferación y la migración en las EPCs. En definitiva, parece que la proliferación celular es dependiente de SOCE pero en algunos casos STIM2 sustituye a STIM1 cuando éste último es silenciado, por lo que falta conocer cuál es la dosis génica de STIM1/STIM2 necesaria para estimular la proliferación. De todas formas, a partir de nuestros resultados podemos asegurar que la fosforilación de los residuos 575, 608 y 621 de STIM1 muy probablemente no participa en este control.

La participación de STIM1 en diversas rutas de señalización celular es un tema de investigación actual y evidencias recientes sugieren su participación en procesos como la adhesión celular, la migración, la diferenciación o el control de la expresión génica (Chen et al., 2013; Elvers et al., 2012; Martin-Romero et al., 2012; Phuong et al., 2013; Shinde et al., 2013; Somasundaram et al., 2014; Tsai et al., 2014). El intenso trabajo en este campo se ha centrado principalmente en la interacción de STIM1 con los canales de Ca^{2+} , y en el efecto del knock-down de STIM1 (silenciamiento de la expresión mediante RNA interferente) sobre el fenotipo de células *in vitro*. Además, estudios en modelos animales han proporcionado evidencias sólidas sobre el papel fundamental de STIM1 en la función celular. Sin embargo, la implicación de las modificaciones post-traduccionales de STIM1 siguen sin ser descritas. En este trabajo de investigación demostramos la participación de la fosforilación de STIM1 en la señalización celular activada por IGF-1, un factor de crecimiento que dispara respuestas genómicas y no genómicas en muchos tipos celulares.

La cascada de activación iniciada por IGF-1 incluye a las rutas de señalización de PI3K-AKT y MEK-ERK (Alessi et al., 1996; Rommel et al., 1999), aunque también se ha descrito que IGF-1 activa las rutas de las quinasas p38 y JNK (O'Connor, 2003). Varios factores de crecimiento disparan la activación de la fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K), la enzima que convierte el PIP_2 en el segundo mensajero PIP_3 y gran parte del interés en AKT reside en el hecho de que esta enzima está situada corriente abajo en la ruta de señalización de la PI3K (Franke et al., 1995). Además, se ha descrito que diversas isoformas de esta proteína se sobreexpresan en diferentes tipos de cáncer (Cheng et al., 1992; Cheng et al., 1996; Jones et al., 1991). Ya hemos comentado que para el caso de ERK1/2, es conocido que son las quinasas responsables de la fosforilación de STIM1, al menos en células HEK293 tratadas con Tg (Pozo-Guisado et

al., 2010). En este trabajo hemos mostrado que como diana de ERK1/2, STIM1 se fosforila por ERK1/2 en células tratadas con IGF-1. De hecho, la activación de ERK1/2 estimulada por IGF-1, y la consecuente fosforilación de STIM1 se observaron en ausencia de Ca^{2+} extracelular, lo que indica que la entrada de Ca^{2+} no es necesaria para la activación de esta ruta. Por el contrario, la activación de la ruta MEK-ERK-STIM1 es necesaria para la activación de la entrada de Ca^{2+} que provoca la translocación nuclear del factor de transcripción NFAT.

Hemos probado además que STIM1 es diana de las quinasas MAPK p38 y JNK1/2, aunque ambas rutas están implicadas solamente en la fosforilación de la Ser575 de STIM1, lo que sugiere que su participación en esta ruta de señalización es limitada. Dado que ERK1/2 es responsable de la fosforilación completa de STIM1, nuestros resultados establecen un nuevo efector en la señalización de IGF-1 sobre la ruta MEK-ERK y revela una nueva función para la fosforilación de STIM1 en sitios dianas de ERK1/2 en condiciones fisiológicas.

Hemos descrito anteriormente que la fosforilación de STIM1 en sitios dianas de ERK1/2 iniciada por Tg en células HEK293 es necesaria para la completa activación de STIM1, lo que implica su separación de EB1, para permitir la multimerización de STIM1. En este estudio demostramos, además, que la localización subcelular de fosfo-STIM1 en agregados se observa tanto con Tg como con IGF-1, y que STIM1 se disocia de EB1 tras la estimulación con IGF-1 confirmando por tanto, que STIM1 se activa en estas condiciones.

Por otro lado, la reducción de la translocación nuclear de NFAT en células que sobre-expresan STIM1 desfosforilado (STIM1-S575A/S608A/S621A) o unido constitutivamente a EB1 (STIM1-EB1), confirma que fosfo-STIM1 es un efector de la señalización mediada por IGF-1. Es importante destacar que los efectos de IGF-1 observados sobre la multimerización de STIM1, la disociación de EB1 y la translocación de NFAT son menos acentuados que los obtenidos en células tratadas con Tg. Este hecho no debe sorprender, puesto que la Tg inhibe el bombeo de Ca^{2+} al interior del RE de manera irreversible al bloquear la SERCA, provocando el vaciado de los depósitos intracelulares, mientras que IGF-1 activa la ruta de los fosfoinosítidos (Valdes et al., 2013), disparando un vaciado transitorio de los depósitos intracelulares sin inhibir el llenado del RE por la SERCA.

La implicación de la fosforilación de STIM1 en la ruta de señalización mediada por IGF-1 es muy relevante dado que IGF-1 participa en morfogénesis, y recientemente se ha relacionado también a STIM1 con neurogénesis (Li et al., 2012a; Somasundaram et al., 2014) y miogénesis (Mancarella et al., 2013; Phuong et al., 2013), dos procesos dependientes de IGF-1. Sin embargo, la participación directa de la fosforilación de STIM1 en la ruta de señalización de IGF-1 no había sido descrita previamente. Nosotros en este trabajo hemos utilizado células HEK293 como modelo para estudiar la ruta MEK-ERK-STIM1. Es posible, además, que puedan encontrarse diferentes perfiles de fosforilación de STIM1 en los diferentes tipos celulares dado que los factores de crecimiento y hormonas activan diferentes cascadas en distintos tejidos dianas.

Por otro lado, se ha descrito que STIM1 ejerce una función recíproca en canales operados por depósitos y canales operados por voltaje ($Ca_v1.2$) (Park et al., 2010; Wang et al., 2010) lo que podría estar detrás de diferentes patrones de fosforilación de la proteína en los distintos tipos celulares. STIM1 inhibe la función de los canales $Ca_v1.2$ de dos formas. En primer lugar, el vaciado de depósitos actúa a través de STIM1 para inhibir la apertura de los canales operados por voltaje $Ca_v1.2$, un efecto que puede suponer desde un 15% de inhibición (Park et al., 2010) hasta una inhibición total (Wang et al., 2010). Además, la expresión de STIM1 puede suprimir casi por completo a $Ca_v1.2$ mediante la estimulación de la internalización de estos canales (Park et al., 2010). Estos efectos parecen estar causados por la unión del dominio CAD de STIM1 al extremo carboxilo terminal de $Ca_v1.2$. Sin embargo se desconocen los mecanismos moleculares que subyacen a esta acción dual de la proteína con respecto a los canales operados por voltaje y los canales operados por depósitos intracelulares.

En este sentido, se sabe que existen altos niveles de expresión de STIM1 en tejidos excitables, como células de músculo liso (Potier et al., 2009; Wang et al., 2008), neuronas (Berna-Erro et al., 2009) y músculo esquelético (Stiber et al., 2008), en donde STIM1 se encuentra implicado no sólo en la señalización mediada por Ca^{2+} sino también en otros procesos como diferenciación y apoptosis (Berna-Erro et al., 2009; Potier et al., 2009; Stiber et al., 2008). Sin embargo falta describir cómo se regula el control recíproco de dos de los canales más ampliamente expresados a través de una única proteína sensora de Ca^{2+} , STIM1, y si esta actividad es tejido-dependiente o está regulada por otros eventos, como por ejemplo las modificaciones postraduccionales de la propia proteína. Por ejemplo, se ha descrito que la fosforilación de STIM1 en la

Ser575 es importante para la diferenciación de mioblastos C2C12 a miotubos (Lee et al., 2012), aunque no existe información respecto a los demás residuos dianas de ERK1/2 (Ser608 y Ser621). De forma similar, en el tejido epitelial de las vías respiratorias, se ha descrito que el 17 β -estradiol inhibe SOCE mediante la inhibición de la interacción STIM1-STIM1 y su movilización. Además este tratamiento reduce la fosforilación de la Ser575 (Sheridan et al., 2013), lo que sugiere la participación de este residuo específico en la activación de STIM1 y SOCE en concordancia con los resultados descritos en estudios anteriores (Pozo-Guisado et al., 2010; Pozo-Guisado et al., 2013). En el trabajo aquí mostrado, y tras analizar el conjunto completo de fosfo-residuos dianas de ERK1/2, hemos observado que los tres residuos actúan en paralelo. Dado que ya hemos descrito que la fosforilación de los tres residuos es necesaria para disparar la disociación de EB1 (Pozo-Guisado et al., 2013), la observación de que STIM1 se disocia también de EB1 de forma significativa tras el tratamiento con IGF-1 confirma la activación de la proteína en estas condiciones fisiológicas.

Uno de los reguladores claves en la migración celular es la concentración de Ca²⁺ libre citosólica (Berridge et al., 2003; Berridge et al., 2000; Berridge and Tan, 2000b; Clark and Weaver, 2008; Howe, 2011; Pettit and Fay, 1998) y la implicación de SOCE en este proceso se ha descrito ampliamente (Chen et al., 2010; Yang et al., 2013). En este sentido también existen numerosos estudios que revelan la importancia de STIM1 en la migración celular (Chen et al., 2011; Feng et al., 2010; Prevarskaya et al., 2011; Schafer et al., 2012; Tsai et al., 2014; Umemura et al., 2014; Yang et al., 2009). Por otro lado, Yang y cols. mostraron que el silenciamiento de STIM1 u ORAI1 inhibe la migración y la metástasis de células de cáncer de mama mediante la supresión del reciclaje de adhesiones focales (Yang et al., 2009). En contraste con estos resultados, se ha descrito que ORAI1 puede regular la tumorigénesis mamaria mediante una ruta independiente de STIM1 (Feng et al., 2010). En un estudio posterior Chen y cols. mostraron que STIM1 participa en la proliferación de cáncer cervical, y que la sobre-expresión de la proteína aumenta la migración celular y angiogénesis, mientras que el knock-down reduce estos efectos (Chen et al., 2011), apoyando los resultados descritos por Yang, y cols. (Yang et al., 2009). Sin embargo, aún son necesarios estudios que expliquen la base molecular que subyace a la regulación de la migración celular. En este sentido, se ha probado que la ruta de las quinasas MAPK activa la migración celular miogénica inducida por IGF-1, TGF- β e insulina, mediante la activación de m-calpaína

(Leloup et al., 2007). Estos autores realizaron ensayos de cierre de heridas placa en presencia de diferentes factores de crecimiento con o sin inhibidores específicos de las rutas MAPK y PI3K/Akt y comprobaron que la expresión y activación de m-calpaína estaba regulada por la ruta de las quinasas MAPK, mientras que la ruta de PI3K/Akt no estaba implicada en este proceso. Estos resultados concuerdan con los descritos por Glading y cols. en fibroblastos utilizando EGF (Glading et al., 2000). Por otro lado, resultados de nuestro grupo de investigación (Pozo-Guisado et al., 2010; Pozo-Guisado et al., 2013) muestran que para la completa activación de STIM1 se requiere la fosforilación de la proteína en sitios dianas de ERK1/2 así como la disociación de la proteína de unión a microtúbulos EB1 (Casas-Rua et al., 2013; Pozo-Guisado et al., 2013). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran además que la fosforilación de STIM1 en las Ser575, Ser608 y Ser621 es necesaria para la migración celular en mioblastos C2C12 de ratón, y que la sobre-expresión de mutantes a alanina en dichos residuos reduce de manera significativa la migración, por lo que podemos sugerir que fosfo-STIM1 estimula la migración de mioblastos y que la ruta ERK1/2 media esta estimulación.

Existen numerosos canales que regulan la entrada de Ca^{2+} al interior celular, encontrándose muchos de ellos regulados por STIM1, como los canales TRP (Venkatachalam and Montell, 2007), y los canales SOC, que dependen del vaciado de los depósitos intracelulares (Hewavitharana et al., 2007; Hogan et al., 2010) o los canales operados por voltaje, que se activan por la despolarización de la membrana plasmática (Catterall, 2000). En este estudio hemos trabajado con ensayos de heridas utilizando mioblastos C2C12 de ratón y hemos comprobado que el tratamiento con SKF96365 reduce significativamente la migración celular, lo que sugiere que la entrada de Ca^{2+} extracelular es necesaria para este proceso, al menos en mioblastos C2C12, si bien estos resultados concuerdan con los obtenidos por Yang y cols. en células de hepatocarcinoma (Yang et al., 2013).

Un paso clave en la migración celular es el establecimiento y dinámica de ensamblaje de adhesiones focales (FAs). La velocidad de formación y reciclaje de FAs determina la eficiencia migratoria de una célula y este reciclaje de FAs se encuentra mediado por la señalización por Ca^{2+} (Berridge et al., 2003; Lee et al., 1999). Yang y cols. mostraron que al bloquear SOCE se ralentiza la migración celular en células de hepatocarcinoma y que esta inhibición era debida a un bloqueo en el reciclaje de FAs

(Yang et al., 2013). Estos autores comprobaron además que el tratamiento con SKF96365 y el silenciamiento de STIM1 con siRNA provocan un aumento del número y tamaño de FAs, conduciendo a un enlentecimiento de la migración en este tipo celular. En concordancia con estos resultados nosotros hemos probado en este trabajo que la fosforilación de STIM1 en sitios dianas de ERK1/2 es necesaria para el reciclaje de FAs. Utilizando mioblastos C2C12 hemos mostrado aquí que la sobre-expresión de STIM1-S575A/S608A/S621A provoca un aumento del número y tamaño de FAs. Por tanto, estos resultados sugieren que fosfo-STIM1 es necesario para mediar el reciclaje de FAs, afectando directamente a la migración celular de manera significativa. En este sentido hay que hacer notar que existe una relación directa entre el número y el área de FAs y la migración y movilidad celular, con una correlación inversa entre el tamaño de las FAs y la velocidad de migración (Lauffenburger and Horwitz, 1996).

Se ha descrito que el bloqueo de SOCE da lugar a la formación de FAs de mayor tamaño y una menor velocidad de migración, incluyendo las células cancerígenas metastáticas (Yang et al., 2009). Con respecto al mecanismo molecular y las cascadas de señalización que regulan este complejo proceso, se ha descrito que la inhibición de las quinasas FAK, Src y ERK ralentizan el reciclaje de FAs, lo que sugiere así mismo una importante función de la fosforilación de los componentes del citoesqueleto que forman parte de las FAs (Webb et al., 2004). Estos resultados convierten a los agentes que bloquean los canales SOC y el reciclaje de FA en potenciales inhibidores de la metástasis tumoral.

La movilidad celular es un proceso muy complejo y organizado, que requiere además del reciclaje de FA una reorganización del citoesqueleto (Ridley et al., 2003). En esta señalización es determinante la participación del segundo mensajero Ca^{2+} (Tsai and Meyer, 2012). Numerosos estudios muestran que SOCE (Prevarskaya et al., 2011; Yang et al., 2009), y más concretamente STIM1 (Casas-Rua et al., 2015; Chen et al., 2011; Motiani et al., 2013; Suganuma et al., 2012; Tsai et al., 2014; Yang et al., 2009; Yoshida et al., 2012) son necesarios para la migración celular. Sin embargo, se desconoce el mecanismo necesario por el que STIM1 podría localizarse de forma polarizada en la célula en migración. En este sentido, se ha descrito que STIM1 es transportada por un mecanismo dependiente de microtúbulos a través de la unión directa a EB1 (Grigoriev et al., 2008) y se ha propuesto además que los microtúbulos transportan a STIM1 hasta el frente de avance celular (Tsai et al., 2014), lo que sugiere

que la localización de la proteína hacia esta región celular es necesaria para ejercer su función en la migración. Por otro lado trabajos de nuestro laboratorio han descrito que para la activación de STIM1, previa a la apertura del canal SOC, es necesaria su disociación de EB1, para lo cual es necesaria la fosforilación de STIM1 en sitios dianas de ERK1/2 (Pozo-Guisado et al., 2013). Todos estos resultados sugieren que la localización de STIM1 es importante en el proceso migratorio y su localización en el frente de avance es uno de los cambios producidos en la reorganización del citoesqueleto de las células en migración.

En este trabajo hemos utilizado mioblastos C2C12 para determinar la localización de STIM1 fosforilado en células en migración. Los resultados obtenidos determinan que fosfo-STIM1 se localiza mayoritariamente en el frente de avance de mioblastos en migración, lo que concuerda con los resultados descritos por Tsai y cols. en células humanas de endotelio de vena umbilical (HUVEC) (Tsai et al., 2014). Sin embargo, estos autores no enfocan su trabajo en las modificaciones postraduccionales que subyacen al cambio de localización de STIM1. Nuestros resultados muestran además, que la fracción de STIM1 situada en el frente de avance se encuentra fosforilada en los tres residuos dianas de la actividad quinasa ERK1/2: Ser575, Ser608 y Ser621, lo que sugiere una regulación por fosforilación de esta particular localización. Aunque algunos de estos residuos pueden ser fosforilados por diferentes quinasas, hemos comprobado en este trabajo que la fosforilación de las serinas 575, 608 y 621 de STIM1 es llevada a cabo mayoritariamente por ERK1/2, puesto que tras el tratamiento con PD0325901 se reduce notablemente la fosforilación.

En células en migración, las protrusiones de la membrana plasmática se encuentran reguladas por la polimerización de filamentos de actina en el frente de avance (Webb et al., 2002) y la formación de estructuras como filopodios, lamelipodios y ruffles (ondulaciones) (Pollard and Borisy, 2003; Small et al., 2002). Sin embargo, la localización y los mecanismos de ensamblaje y adhesión de estas estructuras aún no están del todo esclarecidos. Por un lado, el factor de nucleación cortactina (CTTN) se encuentra implicado tanto en la protrusión de lamelipodios y como en la formación de ruffles, debido a la dependencia de estas estructuras con el ensamblaje de actina, que además se encuentra mediado por el complejo Arp2/3 (Goley and Welch, 2006; Steffen et al., 2006). Sin embargo, algunos autores encontraron que fibroblastos deficientes en la expresión de CTTN presentaban una formación de lamelipodios similar a la de

células de genotipo silvestre, y que su citoesqueleto de actina no presenta defectos en comparación con fibroblastos wild-type (Lai et al., 2009). Sin embargo, estos autores vieron también que las células deficientes en la expresión de CTTN mostraban defectos en la eficiencia de la migración celular y en la formación de ruffles y que esto era debido a un bloqueo en la actividad de la familia de Rho-GTPasas localizadas en esta región celular.

Nuestros resultados muestran que CTTN colocaliza con fosfo-STIM1 en el frente de avance de células en migración. Estos resultados sugieren que la localización de STIM1 y CTTN en el frente de avance es necesaria para regular los niveles de Ca^{2+} citosólicos y el entrecruzamiento del citoesqueleto de actina, respectivamente. Además, nuestros resultados indican que la fosforilación constitutiva de STIM1 en las Ser575, Ser608 y Ser621 favorece la localización de la proteína en el frente de avance, mientras que la sustitución Ser-Ala en estos residuos tiene el efecto contrario. Estos resultados, por tanto, sugieren que la fosforilación de STIM1 en sitios dianas de ERK1/2 es necesaria para la localización de STIM1 en zonas del frente de avance, que son abundantes en CTTN.

Por otro lado, estudios de nuestro grupo de investigación han probado que para la activación de STIM1 es necesaria la separación entre STIM1-EB1 (Pozo-Guisado et al., 2013) y se ha descrito que STIM1-EB1-GFP es incapaz de relocalizar en los frentes de avance tras su activación (Grigoriev et al., 2008). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la proteína de fusión STIM1-EB1 presenta una distribución anómala en mioblastos C2C12, lo que coincide con los resultados descritos en los trabajos de Grigoriev y cols. (Grigoriev et al., 2008). Se ha mostrado que la colocalización entre STIM1 y EB1 es diferente en fibroblastos MRC5-SV y en células HeLa (Grigoriev et al., 2008). Así, mientras que STIM1 colocaliza con EB1 incluso tras el vaciado de depósitos intracelulares en células HeLa, STIM1 se mueve independientemente de EB1 en fibroblastos MRC5-SV en las mismas condiciones, lo que llevó a la conclusión por parte de estos autores que la asociación de STIM1 a MT no es necesaria para la activación de SOCE (Grigoriev et al., 2008). Otros autores han encontrado que el tratamiento de células HEK293 con nocodazol, un inhibidor de la polimerización de microtúbulos, conlleva la inhibición de SOCE (Smyth et al., 2007), lo que sugiere una modulación positiva de la asociación STIM1-microtúbulos.

STIM1 ha sido descrita como una proteína de unión a microtúbulos (+TIPs), y su localización subcelular es dependiente de la formación de microtúbulos (Grigoriev et al., 2008; Smyth et al., 2007). Las TIPs, como las proteínas citoplasmáticas asociadas al entrecruzamiento (CLASPs) (Kumar et al., 2009), APC (Nathke, 2004) y MCAK (Andrews et al., 2004), son fosforiladas en regiones cercanas a la secuencia de interacción con el microtúbulo (secuencia S/TxIP en todas ellas). En todos los casos, y también en el caso de STIM1, las secuencias que flanquean la secuencia S/TxIP contienen varias Pro y Ser, y residuos básicos, lo que confiere una carga positiva alrededor de este dominio de unión a EB1. Esta observación puede explicar por qué la fosforilación en la vecindad de esta secuencia regula negativamente la localización de los TIPs al extremo de los microtúbulos en crecimiento (plus end), aunque se desconoce el mecanismo concreto que regula este proceso. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la unión constitutiva STIM1-EB1 provoca una distribución anormal de la proteína, de forma que STIM1 no colocaliza con CTTN en regiones del frente de avance en mioblastos C2C12, lo que sugiere que la separación STIM1-EB1 es necesaria para la correcta distribución de la proteína. Estos resultados no excluyen sin embargo la posibilidad de que otros fosfo-residuos puedan estar implicados en acciones diferentes, como ocurre con las CLASPs, en los que diferentes perfiles de fosforilación determinan si las CLASPs se asocian a los extremos de los microtúbulos o a otras regiones a lo largo de los mismos (Kumar et al., 2009). Éste podría ser el caso de STIM1, dado que la fosforilación de la proteína en sitios dianas de ERK1/2 permite su disociación de EB1 y activa SOCE.

La invasión y la metástasis son dos marcadores característicos del desarrollo de tumores (Hanahan and Weinberg, 2000) y un requisito previo para que las células escapen desde un tumor primario es la capacidad de éstas para migrar (Brooks et al., 2010). La formación de protrusiones de la membrana plasmática y el establecimiento de FAs son necesarios para que la migración sea efectiva (Chen, 1989; Webb et al., 2002). Lamelipodios e invadopodios son proyecciones del citoesqueleto de actina y han sido descritos ampliamente por su importancia en cánceres invasivos (Nabeshima et al., 2002; Yoon et al., 2003). Uno de los procesos que tienen lugar en los invadopodios es la degradación de la ECM, por la liberación de metaloproteasas, proceso en el que participa la proteína CTTN (Artym et al., 2006; Clark and Weaver, 2008; Clark et al., 2007). Así, se ha mostrado que en varios tipos de cáncer humano se produce un

aumento de los niveles de expresión de CTTN, incluyendo cáncer de mama, colorrectal, ovárico, hepático, gástrico, esofágico, melanomas y glioblastomas (Kirkbride et al., 2011; MacGrath and Koleske, 2012). Consecuentemente CTTN se ha convertido en un importante biomarcador para los tumores con metástasis malignas y su elevada expresión se asocia frecuentemente con pacientes con un mal pronóstico.

Otro de los factores determinantes en la migración celular es el Ca^{2+} citosólico (Pomorski, 2009) y se conoce que el Ca^{2+} tiene una función pro-metastática en la que participan los canales TRPC y los canales SOC, en cuya regulación es clave la participación de STIM1. El RNAm de STIM1 se expresa en gran número de tejidos humanos, especialmente en células linfoides y mieloides (Feske, 2009), y se ha mostrado que el nivel de expresión de STIM1 en tejidos tumorales se incrementa en el 71% de los casos (Chen et al., 2011). Trabajando con mioblastos C2C12 que sobre-expresan CTTN y STIM1 hemos encontrado que la expresión de fosfo-STIM1 da lugar a una cinética más rápida de cortactina y ruffles de membrana. Por el contrario la expresión de STIM1 mutado a alanina en los sitios dianas de ERK1/2 se obtiene una cinética más lenta en la formación de ruffles. Esto parece indicar que existe una relación entre STIM1 y CTTN en motilidad celular, que se ve reflejada en la cinética del ensamblaje de CTTN y la formación de ruffles. Por tanto, la entrada de Ca^{2+} a través de canales de la membrana plasmática podría regular la cinética del reciclaje de cortactina y en ese proceso de entrada de Ca^{2+} es determinante la fosforilación de STIM1 en los sitios dianas de ERK1/2.

CONCLUSIONES

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

1. La fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2 estimula la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos intracelulares (SOCE) en células HEK293. Además esta fosforilación aumenta la velocidad de multimerización y de relocalización de STIM1 en las proximidades de la membrana plasmática, así como la unión a ORAI1 en esta línea celular.
2. En las condiciones ensayadas y utilizando como modelo células HEK293 no se observa un efecto de la fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2 sobre la proliferación celular.
3. El tratamiento con IGF-1 induce la fosforilación de STIM1 en las Ser575, Ser608 y Ser621, por ERK1/2, mientras que las quinasas JNK y p38 participan solo en la fosforilación del residuo Ser575 de STIM1 en células HEK293.
4. La estimulación con IGF-1 induce la multimerización de STIM1 y su separación de EB1 en células HEK293.
5. La fosforilación de STIM1 inducida por IGF-1 regula la translocación de NFAT al núcleo en células HEK293.
6. La migración celular de mioblastos C2C12 está mediada por SOCE, y en este proceso es determinante la fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2.
7. Fosfo-STIM1 colocaliza con cortactina en regiones del frente de avance, donde regula la dinámica de los ruffles de membrana y citoesqueleto en células C2C12.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CULTIVOS CELULARES

1.1. Cultivo de las líneas celulares HEK293 y C2C12.

Durante la realización de este estudio se han empleado dos líneas celulares: la línea celular humana HEK293 (Human Embryonic Kidney cells) y mioblastos C2C12 de ratón.

Ambas líneas celulares se almacenan en nitrógeno líquido en medio de congelación¹. Las células se cultivan en medio completo² a 37°C y en una atmósfera húmeda al 5% de CO₂. Para expandir los cultivos o para sembrar las células a la densidad requerida en los experimentos, se parte de monocapas de células creciendo al 80-90% de confluencia. Tras aspirar el medio de cultivo, las células adheridas a la placa se lavan con PBS³ y se incuban en una solución de tripsina⁴ durante 3 minutos a 37°C. A continuación, se inactiva la tripsina por adición de 3 volúmenes de medio completo y se toma una alícuota de la suspensión obtenida para contar el número de células utilizando un hematocitómetro (cámara de Neubauer). Posteriormente se siembra el mismo número de células para cada condición experimental, de tal manera que los cultivos alcancen una confluencia aproximada del 70-80% en el momento de llevar a cabo los experimentos.

1.2. Sobre-expresión de STIM1 en las líneas celulares.

En este estudio se han empleado células transfectadas con plásmidos que contienen la información necesaria para la expresión de la proteína STIM1 (NP_033313/NM_009287.4) de ratón (*Mus musculus*). El cDNA de Stim1 se clona en un vector marcado con el péptido Flag (N-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-C) en el extremo N-terminal ó con GFP (Green Fluorescen Protein) en el extremo C-terminal para la expresión de Flag-STIM1 o STIM1-GFP respectivamente. La transfección del DNA que codifica para STIM1 se lleva a cabo de forma transitoria en las células C2C12 y de forma estable en el caso de las células HEK293 (líneas HEK293 Flp-In-T-REx).

¹ **Medio de congelación:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 40%, suero fetal bovino (FBS) 50% y dimetil-sulfóxido (DMSO) 10%.

² **Medio de cultivo completo:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino en el caso de células HEK293 y 20 % (v/v) de suero fetal bovino en el caso de mioblastos C2C12, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml.

³ **PBS:** NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 4.3 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM, pH 7.4.

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

1.2.1. Transfección transitoria de STIM1 en mioblastos C2C12.

Para la expresión transitoria de Flag-STIM1 y STIM1-GFP en mioblastos C2C12 las células se transfectan con plásmidos que incluyen las construcciones de DNA que codifican para las proteínas de estudio. El DNA utilizado para la transfección se purifica a partir de bacterias *Escherichia coli* DH5 α utilizando el kit de Quiagen para extracción de plásmidos siguiendo el protocolo de dicha casa comercial.

La transfección de todas las construcciones de DNA se realiza 2 h tras la siembra, añadiendo 2-6 μ g DNA por placa de 10 cm en DMEM completo. Como agente de transfección se utiliza polietilenimina (PEI). La transfección se realiza 20-24 h antes del inicio de los experimentos para una correcta expresión de la proteína de interés.

1.2.2. Generación de líneas celulares HEK293 establemente transfectadas con STIM1.

Las líneas celulares se transfectan de forma estable mediante el sistema Flp-In T-REx y mediante la clonación del cDNA de STIM1 en un vector pcDNA5/FRT/TO $\text{\textcircled{C}}$ (Invitrogen). Este proceso se lleva a cabo en tres pasos: (1) generación de células Flp-In T-REx HEK293 mediante la integración independiente de dos plásmidos en el genoma de las células HEK293; un plásmido con un sitio de unión FRT para la recombinasa Flp (figura 50.a.) y otro que expresa un represor Tet (tetraciclina) de forma constitutiva (figura 50.b.). La integración es al azar e independiente una de otra; (2) integración del vector que contiene el gen de interés bajo un promotor inducible por doxiciclina (figura 50.c). Para ello se transfectan las células con dos vectores; uno que expresa de forma constitutiva la recombinasa Flp (pOG44) y otro que contiene el gen de interés (pcDNA5/FRT/TO $\text{\textcircled{C}}$) además de otro sitio FRT. La integración está mediada por la recombinasa Flp en el sitio FRT; (3) inducción de la expresión del gen de interés por adición de doxiciclina (figura 51).

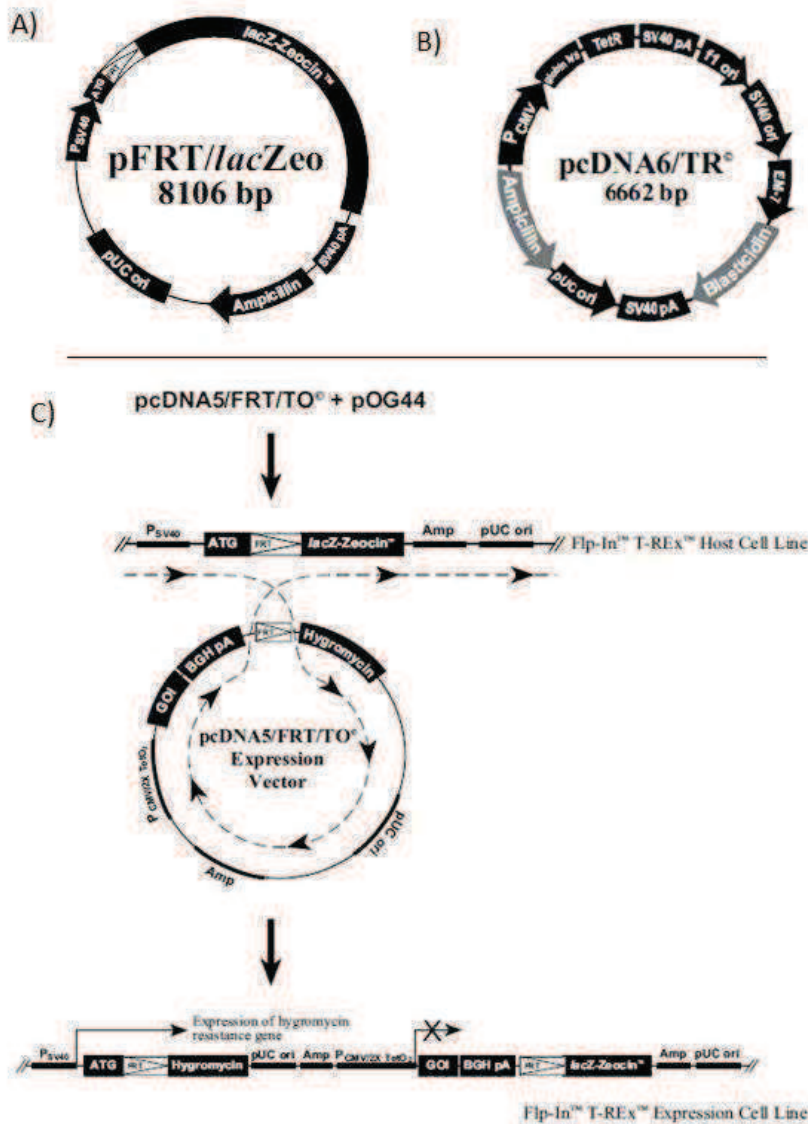


Figura 50. Obtención de las líneas Flp-In T-REx. Panel A: Plásmido pFRT/lacZeo que contiene un sitio FRT para unión de la recombinasa y un gen de resistencia a zeocina. Panel B: Plásmido pcDNA6/TR[®] que expresa el represor Tet de forma constitutiva y tiene un gen de resistencia a blasticidina. Panel C: integración del plásmido pcDNA5/FRT/TO[®] que contiene el gen de interés. La integración de este plásmido confiere a las células resistencia a blasticidina y sensibilidad a zeocina. La expresión del gen de interés está reprimida por el represor Tet.

Las células Flp-In T-REx HEK293 se transfectan con una mezcla que contiene el cDNA de STIM1 en el vector pcDNA5/FRT/TO y el cDNA de la enzima recombinasa en el vector pOG44 en una proporción (1:9). Tras 48 h, el medio se cambia por un medio suplementado con 100 µg/ml de higromicina B y 15 µg/ml de blasticidina para seleccionar las células transfectadas de forma estable. La expresión de Flag-STIM1 o STIM1-GFP se determina mediante inmuno-blot o visualización de células en un microscopio de fluorescencia respectivamente. Mediante esta técnica se generan líneas celulares que expresan STIM1 endógeno, STIM1 mutado Ser→Ala, que emula una desfosforilación constitutiva de la proteína y STIM1 mutado Ser→Glu, que emula a la

proteína fosforilada de forma constitutiva. Los residuos mutados fueron las serinas 575, 608 y 621 en todos los casos.

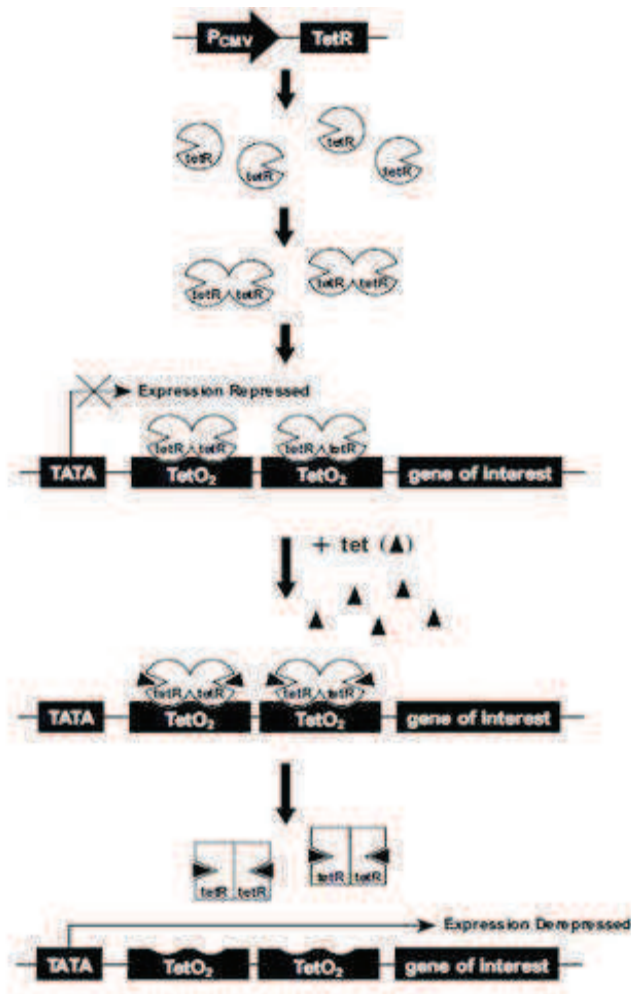


Figura 51: Expresión del gen de interés por adición de doxiciclina. La proteína represora Tet (TetR) es expresada por el plásmido pcDNA6/TR[©] en las células Flp-In T-REx. Homodímeros de TetR se unen a la secuencia Tet operator 2 (TetO₂) del vector pcDNA5/FRT/ TO[©] reprimiendo la transcripción del gen de interés. Tras adición de doxiciclina, ésta se une a los homodímeros de TetR. La unión de doxiciclina a los TetR provoca un cambio conformacional en el TetR, liberándose de la secuencia operatoria, induciendo la expresión del gen de interés.

Las células Flp-In T-REx HEK293 se cultivan en placas de 10 cm de diámetro en DMEM con 10 % (v/v) de suero fetal bovino, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina, 0.1 mg/ml estreptomina, 100 µg/ml higromicina B y 15 µg/ml blasticidina en atmósfera de aire humidificado con 5% CO₂ a 37°C.

1.2.3. Inducción de la expresión de Flag-STIM1 y STIM1-GFP en células HEK293.

La expresión de Flag-STIM1 y STIM1-GFP en células HEK293 Flp-In T-REx está bajo el control de un promotor sensible a doxiciclina (Dox). Una vez generadas las líneas celulares se optimizan las condiciones del tratamiento con Dox para inducir la sobre-expresión de Flag-STIM1 y STIM1-GFP. Para ello se tratan los cultivos celulares

con diferentes concentraciones de Dox (1 $\mu\text{g/ml}$ y 10 $\mu\text{g/ml}$) durante periodos de tiempo crecientes (figura 52). La expresión de Flag-STIM1 se cuantifica mediante inmunoblot (IB) utilizando un anticuerpo anti-Flag, observándose una expresión de Flag-STIM1 constante a partir de las 8 horas de tratamiento tanto con una concentración de Dox 1 $\mu\text{g/ml}$ como para 10 $\mu\text{g/ml}$. Por lo tanto, se establece como condición estándar el tratamiento de los cultivos celulares con Dox 1 $\mu\text{g/ml}$ durante un mínimo de 8 horas.

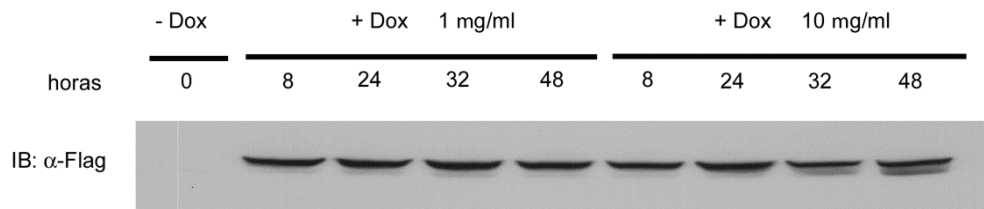


Figura 52. Expresión de Flag-STIM1 en líneas celulares HEK293 FLP-In T-REx. La expresión de Flag-STIM1 se lleva a cabo a distintas concentraciones de Dox (1 $\mu\text{g/ml}$ y 10 $\mu\text{g/ml}$) y a diferentes tiempos de tratamiento (0, 8, 24, 32 y 48 h). La expresión de Flag-STIM1 se analiza mediante inmunoblot con un anticuerpo anti-Flag. Como control negativo se utilizan cultivos celulares sin tratar con Dox.

Para confirmar la expresión de las proteínas de interés se divide la membrana en dos partes; la región superior, que comprende los pesos moleculares entre 50-100 KDa, se utiliza para la detección del péptido Flag y de la proteína STIM1; la parte inferior de la membrana se utiliza para determinar la presencia de GAPDH (37 KDa) como control de carga.

Cuando la membrana se incubaba con un anticuerpo anti-Flag (figura 53.A) se observa la presencia del péptido Flag (unido a STIM1) en los cultivos tratados con Dox, mientras que esta banda está ausente en los cultivos que no han sido tratados con Dox. Tras lavar la membrana con un tampón para eliminar este primer anticuerpo se incubaba ésta nuevamente con un anticuerpo anti-STIM1. En este caso se detecta STIM1 endógeno en cultivos sin Dox y se observa un incremento en el nivel de expresión de la proteína en las células tratadas con Dox debido a la sobre-expresión de Flag-STIM1. Por otro lado, la presencia de la misma cantidad de proteína GAPDH en ambos cultivos celulares demuestra que existe el mismo nivel de proteína total en ambas muestras, tratadas y sin tratar con Dox.

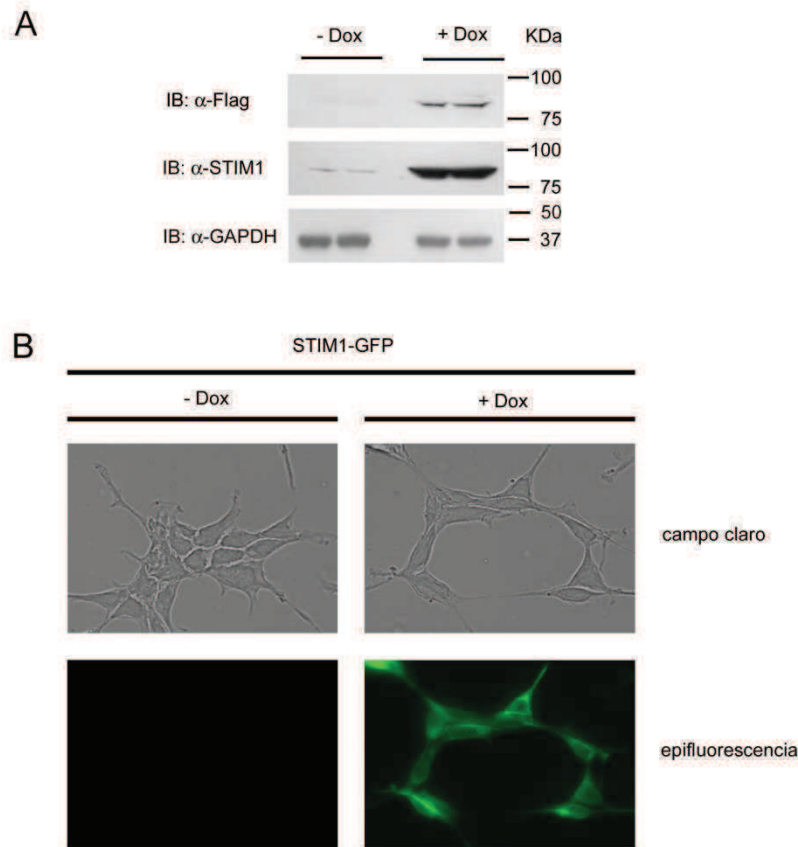


Figura 53. Expresión inducible de Flag-STIM1 y STIM1-GFP en líneas celulares HEK293 Flp-In T-REx. *Panel A:* la expresión de Flag-STIM1 se determinó en cultivos tratados con Dox mediante IB con un anticuerpo anti-Flag y un anticuerpo anti-STIM1. Como control negativo se utilizaron cultivos no tratados con Dox. Como control de carga se utilizó la expresión de GAPDH. *Panel B:* las imágenes de la fila superior corresponden a la observación de las células mediante microscopía óptica de campo claro. En la fila inferior aparecen las imágenes de estas mismas células, tratadas con Dox para la expresión de STIM1-GFP, observadas mediante microscopía de fluorescencia.

La expresión de STIM1-GFP se evaluó mediante microscopía de fluorescencia (figura 53.B). Tras seleccionar un área de los cultivos celulares con luz transmitida se observó que las células tratadas con Dox expresan STIM1-GFP a diferencia de las células no tratadas con este inductor de la expresión.

1.3. Tratamientos de las líneas celulares.

1.3.1. Tratamientos de la línea celular C2C12.

Las células se siembran y se deja que se adhieran a la placa de cultivo durante 24 h hasta conseguir la confluencia necesaria para cada experimento. La confluencia celular varía desde un 60%, para ensayos de inmunolocalización y medidas de Ca^{2+} citosólico hasta un 80% para ensayos de migración celular y resto de tratamientos. En el

caso de mioblastos C2C12 las células son deprivadas de suero 2 h antes de la realización del experimento, tiempo suficiente para reducir la actividad de las principales enzimas quinasas implicadas en este estudio. En el caso de ensayos de migración celular el medio completo es reemplazado por DMEM fresco con 20% de FBS tratado con carbón activo, como se explica con más detalle en los apartados siguientes.

1.3.2. Tratamientos de la línea celular HEK293.

Como en el caso anterior, las células se siembran y se deja que se adhieran a la placa de cultivo durante 24 h hasta conseguir una confluencia del 70-80%. Transcurrido este tiempo y 8 h antes de la realización del experimento, el medio de cultivo se sustituye por medio libre de suero⁵ con el fin de disminuir el nivel basal de fosforilación en las células. Además, durante las últimas 24 h antes de la realización del experimento, se mantienen las células con 1 µg/ml de doxiciclina para inducir la expresión de STIM1 marcado con Flag o GFP.

2. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES Y WESTERN BLOT.

2.1. Preparación de extractos celulares totales.

Los extractos proteicos se obtienen a partir de cultivos celulares de HEK293 y de mioblastos C2C12 sembrados en placas de 35 ó 100 mm de diámetro. Tras retirar el medio de cultivo se lavan las células con PBS a 4°C y se lisan por adición de 1 ml del tampón de lisis para extractos proteicos totales⁶. Para completar el lisado las muestras son sonicadas. A continuación, se clarifican las muestras centrifugando a 14000 g durante 15 minutos a 4°C y se recoge el sobrenadante. Este paso se repite dos veces. Todo el proceso de obtención de extractos se realiza en frío.

2.2. Medida de concentración de proteína.

La concentración de proteína de los extractos celulares se determina mediante el método colorimétrico de Bradford, utilizando la albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. La concentración de proteína se determina midiendo la absorbancia de las

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

⁶ **Tampón de lisis para extractos proteicos totales:** Tris-HCl 50mM pH 7.5, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, fluoruro sódico 50 mM, pirofosfato sódico 5 mM, ortovanadato sódico 1 mM, 1% Nonidet P-40, sacarosa 270 mM, DTT 1 mM, benzamidina 1 mM y PMSF 0.1 mM.

muestras a 594 nm e interpolando los valores obtenidos en una recta patrón construida con cantidades conocidas de BSA (1-6 µg).

2.3. Inmunoprecipitación y co-inmunoprecipitación de proteínas.

Para inmunoprecipitar proteínas de fusión unidas a Flag o GFP se incuban extractos celulares con Flag-beads durante 4 h o GFP-Trap durante 1 h, a 4°C y con agitación. Tras descartar el sobrenadante, el pellet se lava con tampón de lisis⁶ suplementado con cloruro sódico (NaCl) 0,5 M en el caso de inmunoprecipitación de proteínas o NaCl 150 mM en el caso de co-inmunoprecipitación de proteínas, para eliminar las proteínas unidas por enlaces débiles. A continuación el pellet se lava con tampón A⁷ para eliminar los restos de sales y posteriormente las proteínas precipitadas se eluyen de la resina de agarosa (Flag-beads o GFP-Traps) con 15-20 µl de tampón de elución⁸ y calentando la muestra durante 5 min a 90°C. Para descartar la resina de agarosa se pasa la muestra por columnas de filtración Spin-X. Las muestras obtenidas tras el proceso de inmunoprecipitación se someten a electroforesis y transferencia a membrana como se describe a continuación.

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

Para la realización de las electroforesis de proteínas en geles desnaturizantes de poliacrilamida se utiliza el sistema de tampón discontinuo descrito por Laemli (Laemmli, 1970). Alícuotas que contienen 3-40 µg de extractos proteicos totales⁹ se mezclan con el volumen adecuado de tampón de carga¹⁰ para proteína.

Las proteínas se separan en función de su peso molecular sometiéndolas a electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes por la presencia del detergente iónico SDS (SDS-PAGE)¹¹. Se emplean geles de poliacrilamida al 8-12% de acrilamida.

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas presentes en el gel se transfieren a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories) por aplicación de un

⁷ **Tampón A:** Tris-HCl 50 mM, EGTA 0.1 mM, pH7.5.

⁸ **Tampón de elución:** LDS (2x) (Nu-PAGE), β-mercaptoetanol 300 mM.

⁹ En el caso de proteínas inmunoprecipitadas las cantidades de carga varían desde los 0,5 mg hasta los 8 mg de proteína total.

¹⁰ **Tampón de carga:** LDS (4x) (Nu-PAGE), DTT 40 mM, azul de bromofenol.

¹¹ **Tampón de electroforesis:** Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0.1% (p/v).

campo eléctrico en una cubeta que contiene un tampón de transferencia¹². La transferencia se realiza a 4°C durante 240 minutos a 40 V.

2.5. Inmunodetección.

Tras la transferencia, las membranas se tiñen con el colorante reversible Ponceau S¹³, lo que permite comprobar la eficiencia de la transferencia, así como la homogeneidad de la carga para las diferentes muestras. Para ensayos de inmunoblot las membranas se bloquean durante 1 h a temperatura ambiente en solución de bloqueo¹⁴ y se incuban con el correspondiente anticuerpo primario empleando la dilución y condiciones indicadas en la Tabla I. Tras 6 lavados de 10 minutos con TBS-T¹⁵, las membranas se incuban durante 60 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP) en solución de bloqueo y a una dilución 1:20000. A continuación, las membranas se someten a 6 lavados adicionales de 10 minutos cada uno con TBS-T y un lavado final de 5 minutos con TBS¹⁶. Finalmente, se añade el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Femto (Thermo) durante 3 minutos a temperatura ambiente. Dichas membranas se exponen a películas fotográficas durante distintos tiempos en cada caso. A continuación se revelan las películas y las bandas correspondientes a las proteínas inmunorreactivas se observan allí donde ha habido emisión de luminiscencia.

¹² **Tampón de transferencia:** Tris 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20% (v/v).

¹³ **Ponceau S:** ponceau S 0.5% (p/v), ácido acético 5% (v/v).

¹⁴ **Solución de bloqueo:** leche desnatada en polvo al 10% (p/v) disuelta en TBS-T.

¹⁵ **TBS-T:** Tris-HCl 50 mM pH7.5, NaCl 75 mM, Tween-20 0.2% (v/v).

¹⁶ **TBS:** Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 75 mM.

Tabla I. Relación de anticuerpos utilizados en IB.

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	DILUCIÓN	INCUBACIÓN
mouse anti-FLAG	<i>Sigma</i>	1:300	4°C 12-16 h + RT 1 h + 37°C 1 h
rabbit anti-STIM1	<i>ProSci</i>	1:1000- 1:10000	4°C 12-16 h
mouse anti-STIM1	<i>BD</i>	1:4000	4°C 12-16 h
mouse anti-GAPDH	<i>AbCam</i>	1:6000	4°C 12-16 h
rabbit anti-phospho-ERK1/2	<i>Cell Signaling</i>	1:2000	4°C 12-16 h
rabbit anti-total-ERK1/2	<i>Cell Signaling</i>	1:2000	4°C 12-16 h
sheep anti-fosfo-Ser575-STIM1	<i>(DSTT) Univ. de Dundee</i>	1 µg/ml + péptido de bloqueo 10 µg/ml	4°C 12-16 h
sheep anti-fosfo-Ser608-STIM1	<i>(DSTT) Univ. de Dundee</i>	1 µg/ml + péptido de bloqueo 10 µg/ml	4°C 12-16 h
sheep anti-fosfo-Ser621-STIM1	<i>(DSTT) Univ. de Dundee</i>	1 µg/ml + péptido de bloqueo 10 µg/ml	4°C 12-16 h
goat anti-GFP	<i>Cell Signaling</i>	1:2000	4°C 12-16 h RT 1 h

rabbit anti-phospho-c-Jun	<i>Cell Signaling</i>	1:1000	4°C 12-16 h
sheep anti-total-c-Jun	<i>(DSTT) Univ. de Dundee</i>	1:1000	4°C 12-16 h
rabbit anti-phospho- p38 MAPK	<i>Cell Signaling</i>	1:1000	4°C 12-16 h
rabbit total-p38 MAPK	<i>Cell Signaling</i>	1:1000	4°C 12-16 h

En ocasiones algunas membranas de nitrocelulosa se incuban con más de un anticuerpo, como es el caso de los fosfo-anticuerpos y anticuerpos totales de una misma proteína. En este caso la membrana se bloquea y se expone en primer lugar al fosfo-anticuerpo de la proteína de estudio y al anticuerpo secundario correspondiente. Finalmente se añade el sustrato quimioluminiscente y se expone a una película fotográfica para su revelado. Tras este paso la membrana es reutilizada para incubarla con el anticuerpo total de la proteína de estudio. Para ello se lava la membrana con tampón de lavado¹⁷ durante 5-10 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se retira el tampón de lavado, y se somete a sucesivos lavados en TBS-T durante 2 h. A continuación se bloquea la membrana durante 30–60 minutos y se incuba con el siguiente anticuerpo.

3. INMUNOHISTOQUÍMICA EN HEK293 Y C2C12.

Las células fijadas en paraformaldehído 4% durante 10 min a RT se permeabilizan con Triton-X 0,2% durante 10 min y se incuban en solución de bloqueo¹⁸ durante 30-60 min. A continuación se incuban con el anticuerpo primario a los tiempos establecidos para cada anticuerpo (Tabla II). Las células se incuban después con el anticuerpo secundario correspondiente, marcado con Alexa Fluor-488/594, diluido 1:500-1:1000 en solución de bloqueo y a temperatura ambiente durante 20 min. Finalmente se lavan con PBS. Otros marcadores fluorescentes utilizados se detallan en la tabla III.

¹⁷ **Tampón de lavado:** Restore™ Western Blot Stripping Buffer de Thermo Scientific.

¹⁸ **Solución de bloqueo:** 3% piel de pescado disuelta en PBS-Tween 0,2% pH 7,4 (suplementada con NaF 0,5 mM en el caso de determinación de epítomos fosforilados).

3.1. Tinción de la cromatina nuclear con Hoechst 33342.

La tinción de la cromatina nuclear se lleva a cabo empleando Hoechst 33342 (Tabla III) perteneciente al grupo de las bisbenzamidas. Una vez realizados los tratamientos, los cultivos se lavan con PBS y se fijan en paraformaldehído 4% durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación se incuban con Hoechst 33342 (0,2 µg/ml) disuelto en agua milliQ y durante 5 min a temperatura ambiente. Tras eliminar el exceso de Hoechst 33342, sin dejar secar la monocapa de células, se coloca el cubreobjetos sobre un portaobjetos utilizando para el montaje Hydromount[®] (National Diagnostics). Las células se observan con un microscopio de fluorescencia.

Tabla II: Relación de anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica.

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	DILUCIÓN	INCUBACIÓN
sheep anti-fosfo ¹⁹ -Ser575-STIM1	<i>(DSTT) Univ. de Dundee</i>	10 µg/ml + péptido de bloqueo 200 µg/ml	30 min preincubación con péptido de bloqueo 12-16 h a 4°C
sheep anti-fosfo-Ser608-STIM1	<i>(DSTT) Univ. de Dundee</i>	10 µg/ml + péptido de bloqueo 200 µg/ml	30 min preincubación con péptido de bloqueo 12-16 h a 4°C
sheep anti-fosfo-Ser621-STIM1	<i>(DSTT) Univ. de Dundee</i>	10 µg/ml+ péptido de bloqueo 200 µg/ml	30 min preincubación con péptido de bloqueo 12-16 h a 4°C
sheep anti-STIM1	<i>(DSTT) Univ. de Dundee</i>	10 µg/ml	12-16 h a 4°C
mouse anti-CTTN	<i>Millipore</i>	20 µ/ml	1 h a RT

¹⁹ **Fosfo-STIM1:** en el caso de los anticuerpos anti-fosfo-STIM1 la concentración de uso en C2C12 es el doble de la indicada en la tabla tanto de anticuerpo como de péptido de bloqueo.

Tabla III. *Marcadores fluorescentes.*

MARCADOR	ESTRUCTURA	CASA COMERCIAL	DILUCIÓN
Hoechst 33342	Cromatina	Molecular Probes	0,2 µg/ml
Phalloidin565	Filamentos de actina	Sigma	1:1000

4. ENSAYOS DE MIGRACIÓN CELULAR.

4.1. Ensayos de cierre de heridas en placa.

Para los ensayos de cierre de heridas en placa se utiliza la línea celular C2C12, que es una línea mesenquimal con alta capacidad migratoria. Los mioblastos C2C12 se cultivan como se describe en apartados anteriores. En este tipo de ensayos las células se siembran en placas de 35 mm de diámetro en medio completo. Una vez alcanzada una confluencia celular del 80% se hace una herida de unas 500 µm en la monocapa celular raspando el fondo de la placa con una punta de pipeta de 20-200 µl. Para limpiar la herida y eliminar las células levantadas, se lava la monocapa celular con DMEM y a continuación se incuban las células con DMEM suplementado con 20% de FBS tratado con carbón activo²⁰. En este momento se toman fotografías de la herida (tiempo 0) con un microscopio invertido de contraste de fases, y para seguir el sellamiento de la herida se van tomando fotografías a distintos tiempos que varían desde 6-14 h. La cuantificación del cierre de la herida se lleva a cabo utilizando el Software ImageJ.

²⁰ **FBS tratado con carbón activo:** el FBS inactivado se incubó con carbón activo durante 12-14 a 4°C con agitación. El carbón activo se elimina por centrifugación y el FBS se filtra utilizando un filtro de 0,2 µm.

4.2. Ensayos de cierre de heridas en placa con dispositivos IBIDI®.

Para los ensayos de migración basados en el cierre de heridas se utilizan además los insertos IBIDI® que permiten obtener una herida de anchura fija y homogénea de 500 μm . Para la siembra en estos insertos el proceso se realiza en dos pasos. En primer lugar las células se siembran en placas de 35 mm de diámetro, se transfectan transcurridas 2 h y se dejan crecer durante 24-36 h para permitir la expresión del plásmido de interés. En segundo lugar, las células transfectadas se tripsinizan, se resuspenden y se cuentan en un hematocitómetro para tomar un total de 250.000 células en 2 ml de medio completo. De ese volumen total se añaden 70 μl en cada uno de los pocillos del inserto IBIDI, que está adherido al fondo de la placa 35 mm, y el resto de las células se añade a la placa de cultivo, como muestra el esquema de la figura 54. A continuación se deja que las células se adhieran al fondo de la placa durante unas 24 h, hasta alcanzar una confluencia final del 80-90%. Pasado ese tiempo se retira el dispositivo IBIDI® y se lava la placa con DMEM para limpiar la herida y eliminar los restos de suero. El medio completo es reemplazado por medio suplementado con 20% de FBS. A partir de este momento se toman fotos de la herida a distintos tiempos para seguir el cierre de la herida. La cuantificación del mismo se lleva a cabo utilizando el Software ImageJ.

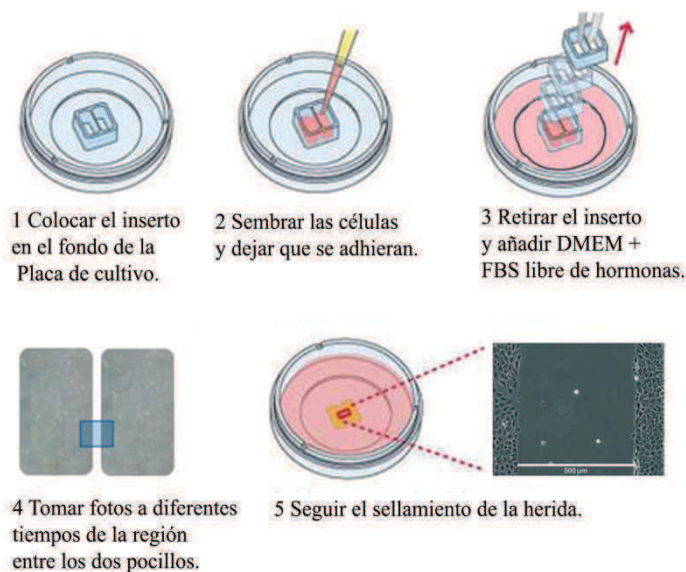


Figura 54. Ensayos de sellamiento de heridas con dispositivos IBIDI.

(1) Fijar el inserto en el fondo de la placa. (2) Añadir las células en los dos pocillos del inserto y en el resto de la placa. (3) Tras alcanzar la confluencia celular necesaria se retira el dispositivo, se lava la herida y se añade DMEM completo con 20% de FBS. (4-5) Tomar fotos de la herida (recuadro azul) a diferentes tiempos y seguir el sellamiento de la herida.

4.3. Ensayos de inmunolocalización en heridas.

Para los ensayos de inmunolocalización de proteínas en heridas se siembran las células C2C12 en cubreobjetos de vidrio de 18 mm de diámetro colocados en placas de 35 mm y en medio de cultivo completo. La transfección transitoria para la expresión de las diferentes proteínas de estudio se realiza tras 2 h de siembra. A continuación se cultivan las células durante un mínimo de 20-24 h, hasta alcanzar una confluencia del 80%, se hace la herida tal y como se describe en el apartado 4.1 y se reemplaza el medio de cultivo por medio fresco con 20% de suero. Transcurridas 4-6 h desde el momento en que se hace la herida se fijan las células con paraformaldehído 4%. A continuación se lleva a cabo la inmunolocalización de las proteínas de interés utilizando los anticuerpos y condiciones indicados en la Tabla II. Para el marcaje de los filamentos de actina se utiliza faloidina (Tabla III), un marcador fluorescente de la familia de las rodaminas que se une a los filamentos de actina.

Finalmente las muestras se montan con Hydromount®, que conserva la fluorescencia y los cubreobjetos se almacenan a 4°C en oscuridad para su posterior análisis por microscopía óptica de fluorescencia.

5. ENSAYOS DE LOCALIZACIÓN DE ADHESIONES FOCALES.

5.1. Ensayos en célula fijada.

Para los ensayos de adhesiones focales realizados con mioblastos C2C12 las células se siembran en cubreobjetos de vidrio pretratados con colágeno durante 1 h antes de sembrar las células. La siembra se realiza utilizando cubreobjetos de 18 mm de diámetro colocados en placas de 35 mm con medio de cultivo completo. La transfección transitoria para la expresión de proteínas de adhesión focal marcadas con GFP se realiza tras 2 h de siembra siguiendo el protocolo que se detalla en el apartado 7.2. A continuación se deja que las células se adhieran al cubreobjetos durante unas 24 h, hasta alcanzar una confluencia de 60-70 % y se reemplaza el medio de cultivo por medio fresco con 20% de suero. Tras 2-6 h se fijan las células con paraformaldehído 4% y se montan con Hydromount para preservar la fluorescencia. Posteriormente se analizan con un microscopio óptico invertido de fluorescencia. Las fotos obtenidas se analizan con el software ImageJ, que permite cuantificar el número y tamaño de adhesiones en cada célula.

5.2. Ensayos de cinética de formación de adhesiones focales.

Para este tipo de ensayos se trabaja con células cultivadas en cubreobjetos de vidrio de 18 mm de diámetro y cotransfectadas para la expresión simultánea de proteínas de adhesión focal marcadas con GFP y la proteína STIM1-Cherry. Cuando las células llegan a una confluencia del 60-70% se sustituye el medio de cultivo por medio fresco con 20% de FBS. Seis horas más tarde se lleva a cabo la monitorización del ensamblaje de las adhesiones focales tomando una imagen por minuto durante 30 min a 37°C. Las imágenes se obtienen mediante microscopia confocal y se analizan con ImageJ.

6. CUANTIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE DNA.

6.1. Cuantificación del DNA.

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

6.2. Secuenciación del cDNA.

Con el objetivo de confirmar la presencia de las mutaciones de la proteína STIM1 anteriormente citadas: STIM1 wild-type, STIM1-S575A/S608A/S621A y STIM1-S575E/S608E/S621E, se secuencian la región del plásmido que contiene el cDNA para la expresión de la proteína. Para ello se utiliza el kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit de Applied Biosystems. Obteniéndose los resultados que aparecen en la figura 55.

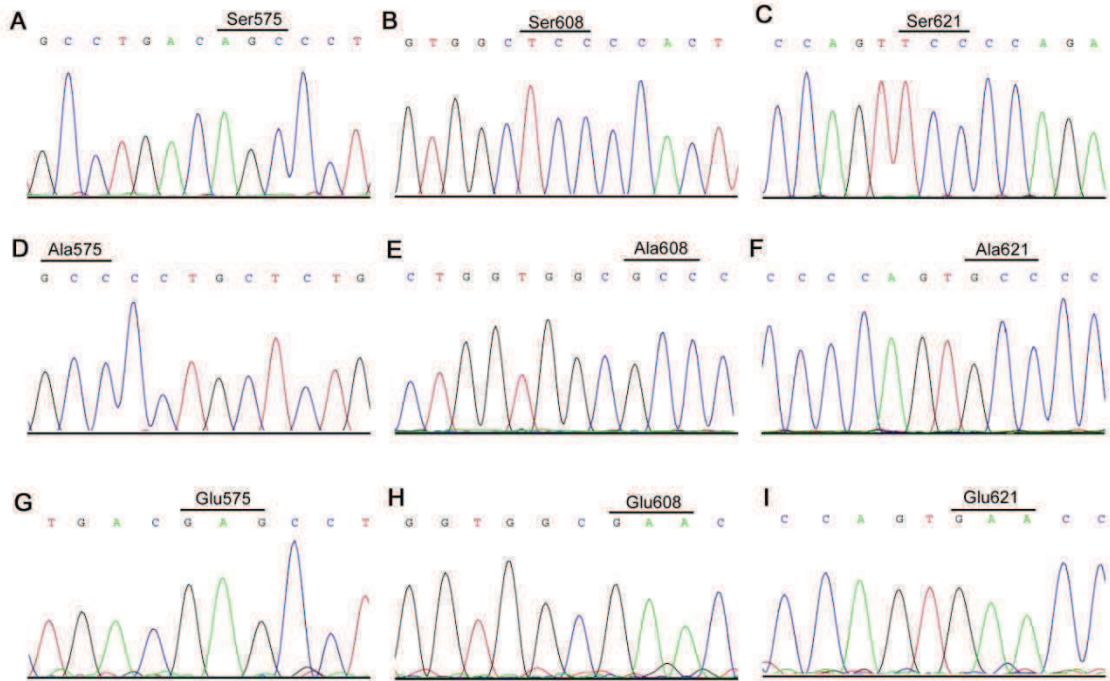


Figura 55. Secuenciación del cDNA. El gen Stim1 integrado en un vector se secuenció utilizando el kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit de Applied Biosystems. Los paneles A-I muestran las secuencias correspondientes a los tripletes de bases que codifican para los aminoácidos 575, 608 y 621 en las líneas STIM1-WT (paneles A-C), STIM1-S575A/S608A/S621A (paneles D-F) y STIM1-S575E/S608E/S621E (paneles G-I).

7. TRANSFORMACIÓN BACTERIANA.

El método de transformación seguido es el descrito por (Hanahan, 1983) y está basado en un choque térmico. Se transforman 100 μ l de bacterias competentes del tipo DH5 α F' de *Escherichia coli* con 10 μ l de una mezcla de ligación (plásmido pcDNA5/FRT/TO©, con resistencia a ampicilina, e inserto correspondiente al cDNA de Flag-STIM1/STIM1-GFP²¹ en cada caso). A continuación, se incubó en hielo durante 30 min y después se da un choque térmico en un termobloque a 42°C durante 90 segundos, seguido de una breve incubación en hielo durante 5 min. Después, se añade 1 ml de medio LB (Luria-Bertani) y se incubó durante 1.5-2 h con agitación suave a 37°C. Finalmente sembramos por extensión 100 μ l del medio celular en una placa de LB-agar suplementada con ampicilina, incubando a 37°C durante 16-18 h.

²¹**Líneas Flag-STIM1:** Flag-STIM1-WT y Flag-STIM1-S575E-S608E-S621E; **líneas STIM1-GFP:** STIM1-WT-GFP, STIM1-S575A-S608A-S621A-GFP y STIM1-S575E-S608E-S621E-GFP.

7.1. Obtención del DNA plasmídico.

Se hace un recuento del número de colonias obtenidas en cada placa, y se realiza un crecimiento de las colonias seleccionadas en 5 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml) y se deja incubando a 37°C en agitación (250 rpm) durante 12-14 horas. Tras el crecimiento del cultivo se procede a la centrifugación del mismo a 4°C y 13000 g durante 5 min, y posterior purificación del plásmido siguiendo el protocolo de purificación del kit Qiagen.

7.2. Construcciones de DNA y transfección.

Para la expresión transitoria de proteínas como Flag-STIM1, STIM1-GFP, STIM1-mCherry, paxilina-GFP, etc., las células se transfectan con plásmidos que incluyen los cDNA que codifican para las proteínas de estudio (ANEXO I). El DNA utilizado para la transfección se purifica a partir de bacterias *Escherichia coli* DH5α utilizando el kit de Quiagen para extracción de plásmidos siguiendo el protocolo de dicha casa comercial. Las construcciones de DNA para la transfección transitoria de Orai1-CFP, NFAT1-GFP (HA-NFAT1-GFP), paxilina-GFP y zixina-GFP son distribuidos por Addgene.

La transfección de las construcciones de DNA se realiza 8 h después de la siembra y utilizando 1-2 µg de DNA por placa de 10 cm en el caso de células HEK293 y 2 h tras la siembra, añadiendo 6 µg DNA por placa de 10 cm en el caso de células C2C12. Como agente de transfección se utiliza polietilenimina (PEI). La transfección se realiza en ambos tipos celulares 20-24 h antes del inicio de los experimentos para asegurar una correcta expresión de la proteína de interés.

8. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO LIBRE INTRACELULAR.

Para determinar la concentración de Ca²⁺ libre intracelular ([Ca²⁺]_i) se sigue el método descrito en (Martin-Romero et al., 2008) empleando fura-2 como fluoróforo sensible a Ca²⁺. Fura-2 presenta un espectro de excitación con dos máximos situados a 340 y 380 nm (figura 56). El primero de ellos permite monitorizar la concentración del complejo Fura-2-Ca²⁺, mientras que el segundo corresponde al fura-2 libre. A 360 nm presenta un punto isobéptico que se utiliza para determinar la fluorescencia independiente de Ca²⁺ o para determinar la extinción de fluorescencia.

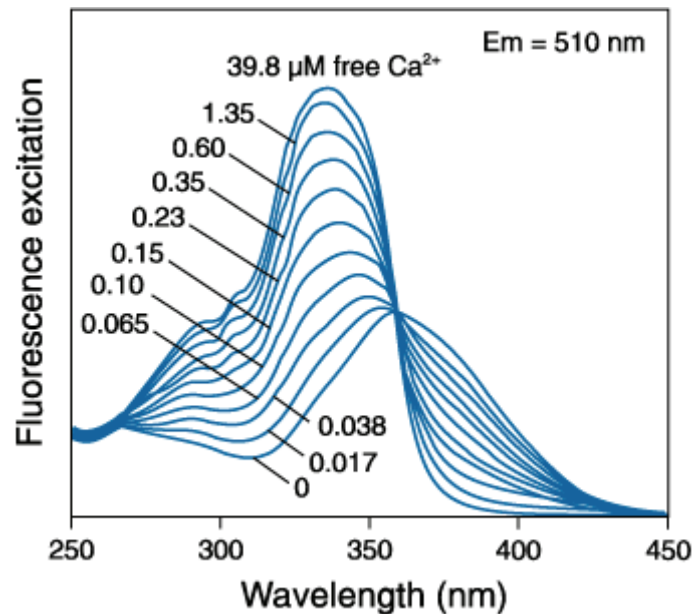


Figura 56. Espectro de excitación del Fura-2AM. La gráfica representa el espectro de excitación de la sonda fluorescente fura-2AM en presencia de concentraciones de Ca^{2+} saturantes ($38.9 \mu\text{M}$), y concentraciones que se encuentran dentro del intervalo de detección con fura 2: 0.017 - $1.70 \mu\text{M}$, para una longitud de onda de emisión de 510 nm .

El espectro de emisión de este indicador presenta un único máximo situado a 510 nm . La constante de disociación (K_d), para Ca^{2+} es de 225 nM , lo que hace a esta sonda especialmente adecuada para determinar los valores de Ca^{2+} desde 20 - 30 nM hasta 1 - $2 \mu\text{M}$ (Thomas and Delaville, 1991).

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

8.1. Carga con fura-2AM en células HEK293.

Para realizar la medida de la $[Ca^{2+}]_i$ con fura-2 AM se procede en primer lugar a la carga del mismo en la célula. Para ello se incuban las células con fura-2 AM 1 μ M en el caso de HEK293 y 2,5 μ M en el caso de C2C12 y pluronic 0.025 % en medio de cultivo, durante 1 hora y a 37°C. Transcurrido este tiempo se lavan las células con HBSS y se lleva a cabo la medida de los valores de fluorescencia.

8.2. Medida de los valores de fluorescencia.

Para determinar la fluorescencia de la sonda en el interior de las células se utiliza un microscopio invertido Nikon TE2000-U. El registro de emisión de fluorescencia consta de tres registros simultáneos: (1) el registro de la emisión de fluorescencia utilizando una excitación de 340 (F₃₄₀), (2) utilizando una excitación de 380 nm (F₃₈₀) y (3) el registro del cociente (ratio de fluorescencia, $R = F_{340} / F_{380}$) entre la emisión de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 340 nm y la emisión de fluorescencia con una longitud de onda de 380 nm. Todas las medidas se realizan a 35°C (controlador de la temperatura TC-324B de Warner Instruments, Inc.). Las imágenes se obtienen con los filtros de excitación 340 y 380 nm, un espejo dicróico de 510 nm y un filtro de emisión de 520 nm (Semrock). Las imágenes se obtienen con una cámara CCD Hamamatsu C9100-02 acoplada al microscopio de fluorescencia invertido y analizadas con el software Metafluor[®].

8.3. Calibración de la medida.

El cociente F_{340}/F_{380} , que hemos denominado R, puede ser utilizado para determinar la concentración de Ca^{2+} libre intracelular. La ecuación que relaciona R con la $[Ca^{2+}]_i$ es la siguiente:

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

Donde R es el cociente de la fluorescencia (F_{340} / F_{380}). R_{\max} y R_{\min} son los valores de R bajo condiciones saturantes y libres de Ca^{2+} , respectivamente, y β es el cociente de los valores de fluorescencia a 380 nm registrados en condiciones de Ca^{2+} libre y saturantes.

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

Para inducir la apertura de los canales de Ca^{2+} regulados por depósitos intracelulares (canales SOC) se emplea taspigargina (Tg), un inhibidor específico e irreversible de la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarco(endo)plasmático (SERCA) (Lytton et al., 1991; Thastrup et al., 1990), así como TBHQ (terbutilhidroquinona) que inhibe a la SERCA de manera reversible. Además, en este trabajo se analiza el efecto de IGF-1 (Insuline-like Growth Factor-1) sobre la activación de la entrada de Ca^{2+} a través de canales SOC. La depleción de los depósitos intracelulares se determina incubando las células HEK293 durante 15 min con Tg 1 μM , TBHQ 10 μM o con IGF-1 50 ng/ml en tampón HBSS²² libre de Ca^{2+} suplementado con 2.2 mM Mg^{2+} y 0.1 mM de EGTA. Por otro lado, la activación de canales SOC se confirma por el incremento del ratio F_{340}/F_{380} tras la adición de CaCl_2 2 mM al medio extracelular en presencia de Tg, TBHQ o IGF-1 respectivamente.

9. ANÁLISIS DE LA MULTIMERIZACIÓN DE STIM1.

Para visualizar la multimerización de la proteína STIM1 tras el vaciado de depósitos intracelulares se utilizan las líneas celulares HEK293, transfectadas de forma estable para la expresión de STIM1-GFP, así como células C2C12 transitoriamente transfectadas para la expresión de dicha proteína.

9.1. Análisis por epifluorescencia y microscopía confocal en célula fijada.

Las células HEK293 y C2C12 que sobreexpresan STIM1-GFP se someten a distintos tratamientos en HBSS libre de Ca^{2+} y se fijan en paraformaldehído 4% durante 10 min a temperatura ambiente. La tinción de la cromatina nuclear se realiza con Hoechst 33342. Una vez fijadas y teñidas, las células se lavan con PBS, agua y finalmente se montan con medio Hydromount[®] (National Diagnostics). Para la observación de la multimerización de STIM1-GFP por epifluorescencia se utiliza un microscopio invertido Nikon TE2000-U equipado con filtros de excitación de 465-495 nm, dicróico de 505 nm y de emisión de 515-555 nm (Semrock). Las imágenes se obtienen con una cámara CCD Hamamatsu C9100-02 acoplada al microscopio de fluorescencia invertido y se analizan con el software Metafluor[®]. Además, las células se

²² HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) libre de Ca^{2+} : NaCl 138 mM, KCl 5.3 mM, Na_2HPO_4 0.34 mM, KH_2PO_4 0.44 mM, NaHCO_3 4.17 mM, D-glucosa 5.56 mM, Mg^{2+} 2.2 mM, EGTA 0.1 mM (pH 7.4).

observan con microscopía confocal usando para este fin un microscopio confocal Spectral Confocal FV-1000 (Olympus) equipado con un objetivo PLAN-APO 60x (NA 1.45) de inmersión en aceite. La potencia del láser es del 2% y se toman secciones en el eje z de 0.2 μm de espesor. Las imágenes se obtienen con una cámara CCD Olympus CMAD3 acoplada al microscopio confocal y se analizan con el software FluoView[®].

Para la cuantificación del porcentaje de células que presentan multimerización de STIM1-GFP, se utiliza un microscopio invertido con un objetivo CFI S Fluor 100x con una apertura numérica de 1,3. Se consideran positivas aquellas células que presentan multímeros patentes en toda la superficie celular (multímeros $> 0,2 \mu\text{m}$). Además se hace un recuento del número total de células evaluando el número total de núcleos. En el caso de C2C12 se contabilizan como número de células totales sólo las células transfectadas i.e., positivas para la expresión de GFP y que por tanto, expresan la proteína STIM-1-GFP distribuida por todo el retículo endoplasmático (estado de reposo).

9.2. Análisis por epifluorescencia en célula viva.

En el ensayo de multimerización en células vivas, éstas se someten a los distintos tratamientos a 30°C. Para la observación de la multimerización de STIM1-GFP se utiliza un microscopio invertido Nikon TE2000-U, equipado con filtros de excitación de 465-495 nm, dicróico de 505 nm y de emisión de 515-555 nm (Semrock). Las imágenes se obtienen con una cámara CCD Hamamatsu C9100-02 acoplada al microscopio de fluorescencia invertido y se analizan con el software Metafluor[®].

10. ANÁLISIS DE LA RELOCALIZACIÓN DE STIM1 MEDIANTE MICROSCOPIA TIRF.

La microscopía de fluorescencia por reflexión interna (TIRFM) se basa en el principio de la reflexión total y generación de una onda evanescente. Al proyectar un haz de luz sobre una superficie pulida constituida de un material transparente con distinto índice de refracción, es posible encontrar un ángulo de incidencia de modo que la totalidad de la luz proyectada es reflejada. Este ángulo se denomina ángulo crítico y en el punto donde se produce la reflexión total se genera una onda electromagnética (la onda evanescente) de igual frecuencia que la luz incidente, que progresa perpendicularmente hacia el lado opuesto y decae exponencialmente con la distancia de

avance. La onda evanescente es capaz de excitar aquellos fluoróforos que se encuentren a una distancia no superior a 200 nm de la superficie de reflexión. En la práctica, la interfaz más comúnmente utilizada en la aplicación de TIRFM (microscopía TIRF) es el área de contacto entre la muestra y un cubreobjetos de vidrio o una placa de cultivo celular.

10.1. Bases físicas de TIRFM.

Un microscopio TIRF usa la onda evanescente para iluminar y excitar selectivamente fluoróforos de un área restringida de la muestra inmediatamente adyacente a la interfaz muestra-vidrio. La onda evanescente se genera sólo cuando la luz incidente es totalmente reflejada en la interfaz muestra-vidrio. La evanescencia electromagnética del campo decae exponencialmente desde la interfaz, y de esta forma penetra a una profundidad de aproximadamente 100-200 nm en el medio donde está la muestra. Así la microscopía TIRF permite una visualización selectiva de regiones superficiales cercanas a la superficie celular.

10.2. Relocalización de STIM1.

Los experimentos de microscopía TIRF se realizan en los Servicios de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Extremadura. Las células expresando STIM1-GFP se lavan con HBSS durante 1 minuto y a continuación se someten a los diferentes tratamientos (en presencia y ausencia de inhibidores de la SERCA) en un medio HBSS libre de Ca^{2+} con Mg^{2+} 2.2 mM y con EGTA 0.1 mM, durante 10 min a 30°C.

11. ANÁLISIS DE LA UNIÓN STIM1-ORAI1 MEDIANTE FRET.

FRET (Föster resonance energy transfer) es la transferencia de energía no-radiante que se produce entre dos fluoróforos (donador y aceptor) con espectros de emisión (donador) y excitación (aceptor) solapantes, tras la excitación del donador. La eficiencia de FRET decae con la sexta potencia de la distancia entre fluoróforos (radio de Föster). A distancias superiores a 10 nm, no se produce transferencia significativa. Por otra parte, la transferencia es más eficaz cuanto mayor solapamiento se produzca entre los espectros de excitación-emisión de donador y aceptor y cuanto más favorable sea la orientación espacial relativa entre de los (dipolos) fluoróforos.

11.1. Bases físicas de FRET.

Cuando se produce FRET, el donador disminuye su intensidad de emisión, puesto que una parte de la energía absorbida es cedida al aceptor (figura 57). Al mismo tiempo, se detecta un aumento de emisión en el aceptor que, a longitudes de onda típicas de excitación del donador, emite de forma muy escasa o nula.

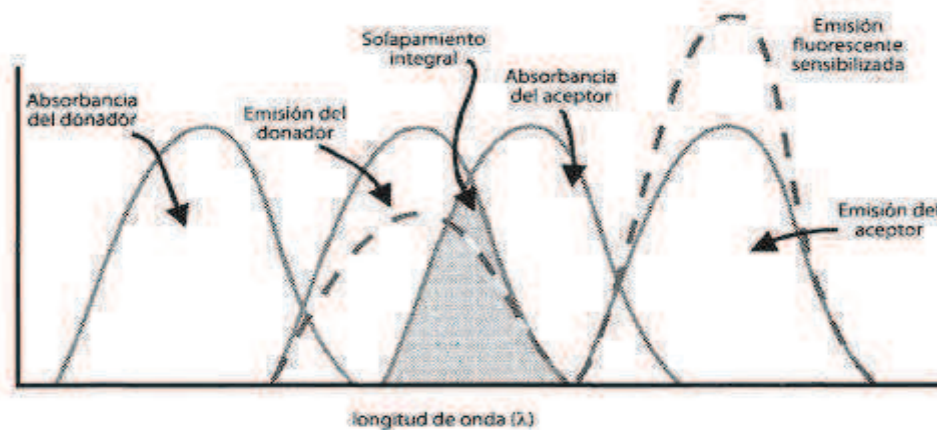


Figura 57. Transferencia de energía entre emisor y aceptor. Los espectros de emisión del donador y absorción del aceptor solapan permitiendo la transferencia de energía entre ambos fluoróforos.

El seguimiento de FRET en el microscopio de fluorescencia confocal se puede hacer de maneras distintas y una de ellas es medir la vida media de la fluorescencia del donador. Cada fluoróforo posee un patrón temporal característico de decaimiento de emisión que determina un valor de vida media. Cuando se produce FRET entre fluoróforos, la vida media de fluorescencia del donador disminuye, siendo este valor indicativo de la eficiencia de FRET. El segundo método es el método de los ratios. Consiste en capturar imágenes independientes con la emisión del donador y del aceptor tras excitar selectiva y únicamente al donador. Cuando se está produciendo FRET, la emisión del donador disminuye mientras que la emisión del aceptor aumenta. Si dividimos la señal del aceptor por la del donador en un área determinada, obtendremos un valor numérico indicativo de la eficiencia de FRET que se denomina ratio. Cuanto mayor sea ese número, mayor será la eficiencia de FRET y viceversa. El tercer método para determinar FRET consiste en capturar imágenes de la emisión del donador antes y después de eliminar la fluorescencia del aceptor mediante *photobleaching* o apagado de fluorescencia. En caso de producirse FRET, tras eliminar la absorción del aceptor, la emisión del donador es más intensa. Esta prueba sólo puede realizarse una vez ya que, tras extinguir la fluorescencia del aceptor, es imposible capturar de nuevo la imagen

inicial. La determinación de FRET mediante *photobleaching* se utiliza como prueba irrefutable de su existencia, ya que no se ve afectado por valores que sugieren su presencia artefactual.

La pareja donador-aceptor utilizada para medir FRET en nuestros ensayos es la constituida por las proteínas fluorescentes CFP (Cyan Fluorescent Protein) y GFP (Green Fluorescent Protein).

12. PROLIFERACIÓN CELULAR EN CÉLULAS HEK293.

Durante este estudio se determina la proliferación celular mediante dos métodos diferentes: (1) utilizando la sonda fluorescente CFSE y (2) mediante la reducción del MTT a formazán.

12.1. CFSE (carboxifluoresceína succinimidil éster).

El CFSE es una sonda fluorescente que puede difundir al interior de la célula. La sonda presenta una baja emisión de fluorescencia hasta que se eliminan los grupos acetato por la actividad esterasa intracelular. La sonda desacetilada puede reaccionar con las aminos intracelulares formando conjugados estables. El exceso de reactivo no conjugado y otros subproductos derivados de la reacción difunden de forma pasiva al medio extracelular y pueden lavarse fácilmente. Los complejos de proteína-sonda intracelulares que se generan son retenidos durante todo el ciclo celular por lo que pueden emplearse para ensayos de monitorización *in vivo*. Los complejos son heredados por las siguientes generaciones de células tras cada división celular y no pueden transferirse a las células adyacentes del cultivo. Mediante este método se puede seguir, por tanto, la proliferación celular cuantificando la disminución de fluorescencia con el tiempo, es decir, con el progreso de sucesivas divisiones celulares. Como control del máximo de fluorescencia se utilizaron células marcadas con la sonda en el momento de pasarlas por el citómetro de flujo, que presentan una fluorescencia del 100%.

Para determinar la proliferación celular de las líneas Flag-STIM1 se utiliza el kit de Invitrogen CellTrace™ CFSE-Cell Proliferation que contiene una sonda fluorescente para marcar de forma inespecífica las proteínas celulares. Las células se tripsinizan y se lavan con PBS-BSA 0.1% para mantener las células individualizadas y el precipitado generado tras su centrifugación se resuspende en PBS-BSA 0.1% a una concentración de 10^6 células/ml. A continuación se marcan las células con la sonda CFSE

(carboxilfluoresceína succinimidil éster) a una concentración 10 μ M y se incuban durante 15 min a 37°C, agitando suavemente cada 3 min para facilitar la entrada de la sonda en las células. Posteriormente se realiza una segunda centrifugación a 200 g durante 3 min a 25°C para eliminar la sonda no internalizada y las células se resuspenden en DMEM y se incuban durante otros 30 min a 37°C. Finalmente se centrifuga la muestra y las células se siembran en medio de cultivo. Diez horas más tarde se añade doxiciclina 1 μ g/ml para inducir la expresión de Flag-STIM1 y las células se incuban a 37°C en incubador de CO₂ durante 72-96 h. Para analizar el número de veces que se divide cada línea celular se tripsinizan las células, se lavan en DMEM y finalmente se resuspenden en PBS-BSA 0.1%. Por último se marcan los núcleos con ioduro de propidio y se analizan las muestras mediante citometría de flujo.

Para nuestros experimentos se analizan en paralelo los siguientes controles: (1) células sin marcar con CFSE para determinar la fluorescencia intrínseca de las células; (2) células marcadas justo antes de analizar las muestras en el citómetro de flujo para determinar el 100% de fluorescencia en tiempo cero y así poder valorar la pérdida de fluorescencia en función del número de divisiones celulares; y (3) células sin doxiciclina para determinar las diferencias en la velocidad de duplicación de cada línea celular.

12.2. MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazolio).

Por otro lado, la proliferación celular se mide mediante la reducción de MTT a formazán. La reducción del MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazolio) a formazán es una reacción catalizada por diferentes actividades deshidrogenasa de la célula, y constituye una medida del estado redox celular. El formazán es una molécula que precipita en las células que lo generan y que puede disolverse mediante la adición de DMSO. La cantidad de formazán generada depende fundamentalmente de la actividad metabólica, así como del número de células presentes en el cultivo. De esta forma, se puede hacer una aproximación de la velocidad de crecimiento de un cultivo celular a través de las medidas espectrofotométricas realizadas a distintos tiempos tras la incubación con MTT.

Para determinar la proliferación celular con el método de la reducción del MTT se reemplaza el medio de cultivo por 2 ml de HBSS con 150 μ g/ml de MTT y se mantienen las placas en el incubador de CO₂ a 37°C durante 30 min. Tras ese tiempo se

elimina el sobrenadante y el formazán precipitado se disuelve con 1 ml de DMSO. La cantidad de formazán de cada ensayo se determina espectrofotométricamente midiendo la diferencia de absorción a 490 nm (máximo de absorción) y 650 nm (línea base de su espectro).

13. ANÁLISIS DE LA TRANSLOCACIÓN DE NFAT.

Para el estudio de la translocación de NFAT al núcleo las células son transfectadas transitoriamente 24 h antes de llevar a cabo los experimentos para la expresión de NFAT-GFP. Cuando las células alcanzan la confluencia deseada (70-80%) y 8 h antes de los tratamientos en el caso de HEK293 o 2 h antes de los experimentos en el caso de C2C12 éstas son deprivadas de suero. Finalmente las células se incuban en HBSS²³ con Ca²⁺ con diferentes tratamientos a 37°C durante los tiempos establecidos. Finalizados los tratamientos las células se fijan en paraformaldehído 4% durante 10 min y se montan con Hydromount para su posterior análisis por microscopía óptica de fluorescencia. Las células que muestran una translocación patente de NFAT-GFP al núcleo se consideran positivas para el recuento. El número total de células se evalúa contabilizando sólo las células positivas para GFP, es decir, las células que expresan NFAT-GFP.

²³ **HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) con Ca²⁺**: NaCl 138 mM, KCl 5.3 mM, Na₂HPO₄ 0.34 mM, KH₂PO₄ 0.44 mM, NaHCO₃ 4.17 mM, D-glucosa 5.56 mM, MgCl₂ 0.49 mM, MgSO₄ 0.41 mM, CaCl₂ 1.26 mM, pH 7.4.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdullaev, I.F., Bisailon, J.M., Potier, M., Gonzalez, J.C., Motiani, R.K., and Trebak, M. (2008). Stim1 and Orail mediate CRAC currents and store-operated calcium entry important for endothelial cell proliferation. *Circ Res* 103, 1289-1299.
- Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., and Hemmings, B.A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 15, 6541-6551.
- Alfieri, C.M., Evans-Anderson, H.J., and Yutzey, K.E. (2007). Developmental regulation of the mouse IGF-I exon 1 promoter region by calcineurin activation of NFAT in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C1887-1894.
- Alicia, S., Angelica, Z., Carlos, S., Alfonso, S., and Luis, V. (2008). STIM1 converts TRPC1 from a receptor-operated to a store-operated channel: Moving TRPC1 in and out of lipid rafts. *Cell calcium* 44, 479-491.
- Ambudkar, I.S. (2007). TRPC1: a core component of store-operated calcium channels. *Biochem Soc Trans* 35, 96-100.
- Andrews, P.D., Ovechkina, Y., Morrice, N., Wagenbach, M., Duncan, K., Wordeman, L., and Swedlow, J.R. (2004). Aurora B regulates MCAK at the mitotic centromere. *Developmental cell* 6, 253-268.
- Arantes, L.A., Aguiar, C.J., Amaya, M.J., Figueiro, N.C., Andrade, L.M., Rocha-Resende, C., Resende, R.R., Franchini, K.G., Guatimosim, S., and Leite, M.F. (2012). Nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate is a necessary and conserved signal for the induction of both pathological and physiological cardiomyocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 53, 475-486.
- Artym, V.V., Zhang, Y., Seillier-Moiseiwitsch, F., Yamada, K.M., and Mueller, S.C. (2006). Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function. *Cancer research* 66, 3034-3043.
- Baba, Y., Hayashi, K., Fujii, Y., Mizushima, A., Watarai, H., Wakamori, M., Numaga, T., Mori, Y., Iino, M., Hikida, M., *et al.* (2006). Coupling of STIM1 to store-operated Ca²⁺ entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 16704-16709.
- Bakowski, D., Glitsch, M.D., and Parekh, A.B. (2001). An examination of the secretion-like coupling model for the activation of the Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ current I(CRAC) in RBL-1 cells. *J Physiol* 532, 55-71.
- Beech, D.J. (2005). TRPC1: store-operated channel and more. *Pflugers Arch* 451, 53-60.
- Bellis, S.L., Miller, J.T., and Turner, C.E. (1995). Characterization of tyrosine phosphorylation of paxillin in vitro by focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 270, 17437-17441.
- Berna-Erro, A., Braun, A., Kraft, R., Kleinschnitz, C., Schuhmann, M.K., Stegner, D., Wultsch, T., Eilers, J., Meuth, S.G., Stoll, G., *et al.* (2009). STIM2 regulates capacitive Ca²⁺ entry in neurons and plays a key role in hypoxic neuronal cell death. *Sci Signal* 2, ra67.
- Berridge, M.J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361, 315-325.
- Berridge, M.J. (1995). Capacitative calcium entry. *The Biochemical journal* 312 (Pt 1), 1-11.
- Berridge, M.J. (2005). Unlocking the secrets of cell signaling. *Annu Rev Physiol* 67, 1-21.
- Berridge, M.J. (2007). Inositol trisphosphate and calcium oscillations. *Biochem Soc Symp*, 1-7.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., and Roderick, H.L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature reviews Molecular cell biology* 4, 517-529.
- Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 11-21.
- Berridge, M.V., and Tan, A.S. (2000a). Cell-surface NAD(P)H-oxidase: relationship to trans-plasma membrane NADH-oxidoreductase and a potential source of circulating NADH-oxidase. *Antioxid Redox Signal* 2, 277-288.
- Berridge, M.V., and Tan, A.S. (2000b). High-capacity redox control at the plasma membrane of mammalian cells: trans-membrane, cell surface, and serum NADH-oxidases. *Antioxid Redox Signal* 2, 231-242.
- Berrueta, L., Kraeft, S.K., Tirnauer, J.S., Schuyler, S.C., Chen, L.B., Hill, D.E., Pellman, D., and Bierer, B.E. (1998). The adenomatous polyposis coli-binding protein EB1 is associated with cytoplasmic and spindle microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10596-10601.

- Bird, G.S., Hwang, S.Y., Smyth, J.T., Fukushima, M., Boyles, R.R., and Putney, J.W., Jr. (2009). STIM1 is a calcium sensor specialized for digital signaling. *Curr Biol* 19, 1724-1729.
- Bisaillon, J.M., Motiani, R.K., Gonzalez-Cobos, J.C., Potier, M., Halligan, K.E., Alzawahra, W.F., Barroso, M., Singer, H.A., Jourdeuil, D., and Trebak, M. (2010). Essential role for STIM1/Orai1-mediated calcium influx in PDGF-induced smooth muscle migration. *Am J Physiol Cell Physiol* 298, C993-1005.
- Blaustein, M.P. (1982). Relative roles of sodium/calcium exchange and ATP-fueled calcium transport in the control of cell calcium. *Ann N Y Acad Sci* 402, 457-458.
- Blaustein, M.P., and Lederer, W.J. (1999). Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* 79, 763-854.
- Bola, B., and Allan, V. (2009). How and why does the endoplasmic reticulum move? *Biochem Soc Trans* 37, 961-965.
- Bootman, M.D., Collins, T.J., Peppiatt, C.M., Prothero, L.S., MacKenzie, L., De Smet, P., Travers, M., Tovey, S.C., Seo, J.T., Berridge, M.J., *et al.* (2001). Calcium signalling--an overview. *Semin Cell Dev Biol* 12, 3-10.
- Boyle, S.N., Michaud, G.A., Schweitzer, B., Predki, P.F., and Koleske, A.J. (2007). A critical role for cortactin phosphorylation by Abl-family kinases in PDGF-induced dorsal-wave formation. *Curr Biol* 17, 445-451.
- 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.
- Brooks, S.A., Lomax-Browne, H.J., Carter, T.M., Kinch, C.E., and Hall, D.M. (2010). Molecular interactions in cancer cell metastasis. *Acta Histochem* 112, 3-25.
- Brundage, R.A., Fogarty, K.E., Tuft, R.A., and Fay, F.S. (1991). Calcium gradients underlying polarization and chemotaxis of eosinophils. *Science* 254, 703-706.
- Budd, S.L., and Nicholls, D.G. (1996). A reevaluation of the role of mitochondria in neuronal Ca²⁺ homeostasis. *J Neurochem* 66, 403-411.
- Burrige, K., Petch, L.A., and Romer, L.H. (1992a). Signals from focal adhesions. *Curr Biol* 2, 537-539.
- Burrige, K., Turner, C.E., and Romer, L.H. (1992b). Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. *J Cell Biol* 119, 893-903.
- Cahalan, M.D. (2009). STIMulating store-operated Ca(2+) entry. *Nat Cell Biol* 11, 669-677.
- Cahalan, M.D., Zhang, S.L., Yeromin, A.V., Ohlsen, K., Roos, J., and Stauderman, K.A. (2007). Molecular basis of the CRAC channel. *Cell Calcium* 42, 133-144.
- Cai, X. (2007). Molecular evolution and functional divergence of the Ca(2+) sensor protein in store-operated Ca(2+) entry: stromal interaction molecule. *PLoS One* 2, e609.
- Calloway, N., Holowka, D., and Baird, B. (2010). A basic sequence in STIM1 promotes Ca²⁺ influx by interacting with the C-terminal acidic coiled coil of Orai1. *Biochemistry* 49, 1067-1071.
- Cary, L.A., Han, D.C., Polte, T.R., Hanks, S.K., and Guan, J.L. (1998). Identification of p130Cas as a mediator of focal adhesion kinase-promoted cell migration. *The Journal of cell biology* 140, 211-221.
- Casas-Rua, V., Alvarez, I.S., Pozo-Guisado, E., and Martin-Romero, F.J. (2013). Inhibition of STIM1 phosphorylation underlies resveratrol-induced inhibition of store-operated calcium entry. *Biochemical pharmacology* 86, 1555-1563.
- Casas-Rua, V., Tomas-Martin, P., Lopez-Guerrero, A.M., Alvarez, I.S., Pozo-Guisado, E., and Martin-Romero, F.J. (2015). STIM1 phosphorylation triggered by epidermal growth factor mediates cell migration. *Biochim Biophys Acta* 1853, 233-243.
- Catterall, W.A. (1998). Structure and function of neuronal Ca²⁺ channels and their role in neurotransmitter release. *Cell Calcium* 24, 307-323.
- Catterall, W.A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 521-555.
- Cavero, I., and Spedding, M. (1983). "Calcium antagonists": a class of drugs with a bright future. Part I. Cellular calcium homeostasis and calcium as a coupling messenger. *Life Sci* 33, 2571-2581.
- Clapham, D.E. (1995). Calcium signaling. *Cell* 80, 259-268.

- Clark, E.S., and Weaver, A.M. (2008). A new role for cortactin in invadopodia: regulation of protease secretion. *Eur J Cell Biol* 87, 581-590.
- Clark, E.S., Whigham, A.S., Yarbrough, W.G., and Weaver, A.M. (2007). Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia. *Cancer research* 67, 4227-4235.
- Cole, C., Barber, J.D., and Barton, G.J. (2008). The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res* 36, W197-201.
- Cosen-Binker, L.I., and Kapus, A. (2006). Cortactin: the gray eminence of the cytoskeleton. *Physiology (Bethesda)* 21, 352-361.
- Chen, J.P., Luan, Y., You, C.X., Chen, X.H., Luo, R.C., and Li, R. (2010). TRPM7 regulates the migration of human nasopharyngeal carcinoma cell by mediating Ca(2+) influx. *Cell Calcium* 47, 425-432.
- Chen, W.T. (1989). Proteolytic activity of specialized surface protrusions formed at rosette contact sites of transformed cells. *J Exp Zool* 251, 167-185.
- Chen, Y.F., Chiu, W.T., Chen, Y.T., Lin, P.Y., Huang, H.J., Chou, C.Y., Chang, H.C., Tang, M.J., and Shen, M.R. (2011). Calcium store sensor stromal-interaction molecule 1-dependent signaling plays an important role in cervical cancer growth, migration, and angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 15225-15230.
- Chen, Y.T., Chen, Y.F., Chiu, W.T., Wang, Y.K., Chang, H.C., and Shen, M.R. (2013). The ER Ca(2+)(+) sensor STIM1 regulates actomyosin contractility of migratory cells. *Journal of cell science* 126, 1260-1267.
- Cheng, J.Q., Godwin, A.K., Bellacosa, A., Taguchi, T., Franke, T.F., Hamilton, T.C., Tsihchlis, P.N., and Testa, J.R. (1992). AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9267-9271.
- Cheng, J.Q., Ruggeri, B., Klein, W.M., Sonoda, G., Altomare, D.A., Watson, D.K., and Testa, J.R. (1996). Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3636-3641.
- Chuma, M., Sakamoto, M., Yasuda, J., Fujii, G., Nakanishi, K., Tsuchiya, A., Ohta, T., Asaka, M., and Hirohashi, S. (2004). Overexpression of cortactin is involved in motility and metastasis of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 41, 629-636.
- DeHaven, W.I., Smyth, J.T., Boyles, R.R., and Putney, J.W., Jr. (2007). Calcium inhibition and calcium potentiation of Orai1, Orai2, and Orai3 calcium release-activated calcium channels. *J Biol Chem* 282, 17548-17556.
- Deng, X., Wang, Y., Zhou, Y., Soboloff, J., and Gill, D.L. (2009). STIM and Orai: dynamic intermembrane coupling to control cellular calcium signals. *J Biol Chem* 284, 22501-22505.
- Derler, I., Fahrner, M., Muik, M., Lackner, B., Schindl, R., Groschner, K., and Romanin, C. (2009). A Ca2+(+) release-activated Ca2+(+) (CRAC) modulatory domain (CMD) within STIM1 mediates fast Ca2+(+)-dependent inactivation of ORAI1 channels. *J Biol Chem* 284, 24933-24938.
- Duchen, M.R. (1999). Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signalling and cell death. *J Physiol* 516 (Pt 1), 1-17.
- Ebashi, S., Endo, M., and Otsuki, I. (1969). Control of muscle contraction. *Q Rev Biophys* 2, 351-384.
- Egile, C., Rouiller, I., Xu, X.P., Volkmann, N., Li, R., and Hanein, D. (2005). Mechanism of filament nucleation and branch stability revealed by the structure of the Arp2/3 complex at actin branch junctions. *PLoS Biol* 3, e383.
- El Boustany, C., Bidaux, G., Enfissi, A., Delcourt, P., Prevarskaya, N., and Capiod, T. (2008). Capacitative calcium entry and transient receptor potential canonical 6 expression control human hepatoma cell proliferation. *Hepatology* 47, 2068-2077.
- El Boustany, C., Katsogiannou, M., Delcourt, P., Dewailly, E., Prevarskaya, N., Borowiec, A.S., and Capiod, T. (2010). Differential roles of STIM1, STIM2 and Orai1 in the control of cell proliferation and SOCE amplitude in HEK293 cells. *Cell Calcium* 47, 350-359.
- Elvers, M., Herrmann, A., Seizer, P., Munzer, P., Beck, S., Schonberger, T., Borst, O., Martin-Romero, F.J., Lang, F., May, A.E., *et al.* (2012). Intracellular cyclophilin A is an important Ca2+ regulator in platelets and critically involved in arterial thrombus formation. *Blood* 120, 1317-1326.

- Fabian, A., Fortmann, T., Dieterich, P., Riethmuller, C., Schon, P., Mally, S., Nilius, B., and Schwab, A. (2008). TRPC1 channels regulate directionality of migrating cells. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 457, 475-484.
- Feng, M., Grice, D.M., Faddy, H.M., Nguyen, N., Leitch, S., Wang, Y., Muend, S., Kenny, P.A., Sukumar, S., Roberts-Thomson, S.J., *et al.* (2010). Store-independent activation of Orail by SPCA2 in mammary tumors. *Cell* 143, 84-98.
- Feske, S. (2009). ORAI1 and STIM1 deficiency in human and mice: roles of store-operated Ca²⁺ entry in the immune system and beyond. *Immunol Rev* 231, 189-209.
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S.H., Tanasa, B., Hogan, P.G., Lewis, R.S., Daly, M., and Rao, A. (2006). A mutation in Orail causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 441, 179-185.
- Feske, S., Prakriya, M., Rao, A., and Lewis, R.S. (2005). A severe defect in CRAC Ca²⁺ channel activation and altered K⁺ channel gating in T cells from immunodeficient patients. *J Exp Med* 202, 651-662.
- Foncea, R., Andersson, M., Ketterman, A., Blakesley, V., Sapag-Hagar, M., Sugden, P.H., LeRoith, D., and Lavandero, S. (1997). Insulin-like growth factor-I rapidly activates multiple signal transduction pathways in cultured rat cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* 272, 19115-19124.
- Foncea, R., Galvez, A., Perez, V., Morales, M.P., Calixto, A., Melendez, J., Gonzalez-Jara, F., Diaz-Araya, G., Sapag-Hagar, M., Sugden, P.H., *et al.* (2000). Extracellular regulated kinase, but not protein kinase C, is an antiapoptotic signal of insulin-like growth factor-1 on cultured cardiac myocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 273, 736-744.
- Frame, M.C. (2002). Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochimica et biophysica acta* 1602, 114-130.
- Frame, M.C., Fincham, V.J., Carragher, N.O., and Wyke, J.A. (2002). v-Src's hold over actin and cell adhesions. *Nature reviews Molecular cell biology* 3, 233-245.
- Franco, S.J., Rodgers, M.A., Perrin, B.J., Han, J., Bennis, D.A., Critchley, D.R., and Huttenlocher, A. (2004). Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nat Cell Biol* 6, 977-983.
- Franke, T.F., Yang, S.I., Chan, T.O., Datta, K., Kazlauskas, A., Morrison, D.K., Kaplan, D.R., and Tsichlis, P.N. (1995). The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* 81, 727-736.
- Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., and Yamada, K.M. (2001). Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 793-805.
- Giannone, G., Ronde, P., Gaire, M., Beaudouin, J., Haiech, J., Ellenberg, J., and Takeda, K. (2004). Calcium rises locally trigger focal adhesion disassembly and enhance residency of focal adhesion kinase at focal adhesions. *J Biol Chem* 279, 28715-28723.
- Gilbert, S.H., Perry, K., and Fay, F.S. (1994). Mediation of chemoattractant-induced changes in [Ca²⁺]_i and cell shape, polarity, and locomotion by InsP₃, DAG, and protein kinase C in newt eosinophils. *J Cell Biol* 127, 489-503.
- Gill, D.L., Grollman, E.F., and Kohn, L.D. (1981). Calcium transport mechanisms in membrane vesicles from guinea pig brain synaptosomes. *J Biol Chem* 256, 184-192.
- Glading, A., Chang, P., Lauffenburger, D.A., and Wells, A. (2000). Epidermal growth factor receptor activation of calpain is required for fibroblast motility and occurs via an ERK/MAP kinase signaling pathway. *J Biol Chem* 275, 2390-2398.
- Gluck, U., and Ben-Ze'ev, A. (1994). Modulation of alpha-actinin levels affects cell motility and confers tumorigenicity on 3T3 cells. *J Cell Sci* 107 (Pt 7), 1773-1782.
- Goley, E.D., and Welch, M.D. (2006). The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 713-726.
- Golovina, V.A., Platoshyn, O., Bailey, C.L., Wang, J., Limsuwan, A., Sweeney, M., Rubin, L.J., and Yuan, J.X. (2001). Upregulated TRP and enhanced capacitative Ca(2+) entry in human pulmonary artery myocytes during proliferation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280, H746-755.

- Grigoriev, I., Gouveia, S.M., van der Vaart, B., Demmers, J., Smyth, J.T., Honnappa, S., Splinter, D., Steinmetz, M.O., Putney, J.W., Jr., Hoogenraad, C.C., *et al.* (2008). STIM1 is a MT-plus-end-tracking protein involved in remodeling of the ER. *Curr Biol* 18, 177-182.
- Gudermann, T., Mederos y Schnitzler, M., and Dietrich, A. (2004). Receptor-operated cation entry--more than esoteric terminology? *Sci STKE* 2004, pe35.
- Gwack, Y., Srikanth, S., Feske, S., Cruz-Guilloty, F., Oh-hora, M., Neems, D.S., Hogan, P.G., and Rao, A. (2007). Biochemical and functional characterization of Orai proteins. *J Biol Chem* 282, 16232-16243.
- Gwack, Y., Srikanth, S., Oh-Hora, M., Hogan, P.G., Lamperti, E.D., Yamashita, M., Gelinas, C., Neems, D.S., Sasaki, Y., Feske, S., *et al.* (2008). Hair loss and defective T- and B-cell function in mice lacking ORAI1. *Mol Cell Biol* 28, 5209-5222.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hardie, R.C., and Minke, B. (1993). Novel Ca²⁺ channels underlying transduction in Drosophila photoreceptors: implications for phosphoinositide-mediated Ca²⁺ mobilization. *Trends Neurosci* 16, 371-376.
- Hasselbach, W. (1964). Atp-Driven Active Transport of Calcium in the Membranes of the Sarcoplasmic Reticulum. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 160, 501-504.
- Hewavitharana, T., Deng, X., Soboloff, J., and Gill, D.L. (2007). Role of STIM and Orai proteins in the store-operated calcium signaling pathway. *Cell Calcium* 42, 173-182.
- Hogan, P.G., Chen, L., Nardone, J., and Rao, A. (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* 17, 2205-2232.
- Hogan, P.G., Lewis, R.S., and Rao, A. (2010). Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. *Annu Rev Immunol* 28, 491-533.
- Honnappa, S., Gouveia, S.M., Weisbrich, A., Damberger, F.F., Bhavesh, N.S., Jawhari, H., Grigoriev, I., van Rijssel, F.J., Buey, R.M., Lawera, A., *et al.* (2009). An EB1-binding motif acts as a microtubule tip localization signal. *Cell* 138, 366-376.
- Horwitz, A., Duggan, K., Buck, C., Beckerle, M.C., and Burridge, K. (1986). Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin--a transmembrane linkage. *Nature* 320, 531-533.
- Hoth, M., and Penner, R. (1992). Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 355, 353-356.
- Howe, A.K. (2011). Cross-talk between calcium and protein kinase A in the regulation of cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 23, 554-561.
- Huang, C., Ni, Y., Wang, T., Gao, Y., Haudenschild, C.C., and Zhan, X. (1997). Down-regulation of the filamentous actin cross-linking activity of cortactin by Src-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 272, 13911-13915.
- Humphries, J.D., Wang, P., Streuli, C., Geiger, B., Humphries, M.J., and Ballestrem, C. (2007). Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J Cell Biol* 179, 1043-1057.
- Ibarra, C., Estrada, M., Carrasco, L., Chiong, M., Liberona, J.L., Cardenas, C., Diaz-Araya, G., Jaimovich, E., and Lavandero, S. (2004). Insulin-like growth factor-1 induces an inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent increase in nuclear and cytosolic calcium in cultured rat cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* 279, 7554-7565.
- Ilic, D., Furuta, Y., Kanazawa, S., Takeda, N., Sobue, K., Nakatsuji, N., Nomura, S., Fujimoto, J., Okada, M., and Yamamoto, T. (1995). Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature* 377, 539-544.
- Irvine, R.F. (1990). 'Quantal' Ca²⁺ release and the control of Ca²⁺ entry by inositol phosphates--a possible mechanism. *FEBS Lett* 263, 5-9.
- Jo, J.Y., Kim, H.L., Lee, Y.K., Tomura, H., Bae, Y.S., Okajima, F., and Im, D.S. (2008). N,N-Dimethyl-D-erythro-sphingosine inhibits store-operated Ca²⁺ entry in U937 monocytes. *J Pharmacol Sci* 107, 303-307.
- Jones, P.F., Jakubowicz, T., Pitossi, F.J., Maurer, F., and Hemmings, B.A. (1991). Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 4171-4175.

- Jouaville, L.S., Ichas, F., Holmuhamedov, E.L., Camacho, P., and Lechleiter, J.D. (1995). Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature* 377, 438-441.
- Kass, G.E., Duddy, S.K., Moore, G.A., and Orrenius, S. (1989). 2,5-Di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone rapidly elevates cytosolic Ca²⁺ concentration by mobilizing the inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca²⁺ pool. *The Journal of biological chemistry* 264, 15192-15198.
- Kirkbride, K.C., Sung, B.H., Sinha, S., and Weaver, A.M. (2011). Cortactin: a multifunctional regulator of cellular invasiveness. *Cell Adh Migr* 5, 187-198.
- Korzeniowski, M.K., Manjarres, I.M., Varnai, P., and Balla, T. (2010). Activation of STIM1-Orai1 involves an intramolecular switching mechanism. *Sci Signal* 3, ra82.
- Kuang, C.Y., Yu, Y., Guo, R.W., Qian, D.H., Wang, K., Den, M.Y., Shi, Y.K., and Huang, L. (2010). Silencing stromal interaction molecule 1 by RNA interference inhibits the proliferation and migration of endothelial progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 398, 315-320.
- Kumar, P., Lyle, K.S., Gierke, S., Matov, A., Danuser, G., and Wittmann, T. (2009). GSK3beta phosphorylation modulates CLASP-microtubule association and lamella microtubule attachment. *The Journal of cell biology* 184, 895-908.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lai, F.P., Szczodrak, M., Oelkers, J.M., Ladwein, M., Acconcia, F., Benesch, S., Auinger, S., Faix, J., Small, J.V., Polo, S., *et al.* (2009). Cortactin promotes migration and platelet-derived growth factor-induced actin reorganization by signaling to Rho-GTPases. *Mol Biol Cell* 20, 3209-3223.
- Lauffenburger, D.A., and Horwitz, A.F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84, 359-369.
- Le Clainche, C., and Carlier, M.F. (2008). Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol Rev* 88, 489-513.
- Lee, H.J., Bae, G.U., Leem, Y.E., Choi, H.K., Kang, T.M., Cho, H., Kim, S.T., and Kang, J.S. (2012). Phosphorylation of Stim1 at serine 575 via netrin-2/Cdo-activated ERK1/2 is critical for the promyogenic function of Stim1. *Mol Biol Cell* 23, 1376-1387.
- Lee, J., Ishihara, A., Oxford, G., Johnson, B., and Jacobson, K. (1999). Regulation of cell movement is mediated by stretch-activated calcium channels. *Nature* 400, 382-386.
- Lee, K.P., Yuan, J.P., So, I., Worley, P.F., and Muallem, S. (2010). STIM1-dependent and STIM1-independent function of transient receptor potential canonical (TRPC) channels tunes their store-operated mode. *The Journal of biological chemistry* 285, 38666-38673.
- Lee, K.P., Yuan, J.P., Zeng, W., So, I., Worley, P.F., and Muallem, S. (2009). Molecular determinants of fast Ca²⁺-dependent inactivation and gating of the Orai channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 14687-14692.
- Leloup, L., Dauray, L., Mazeret, G., Cottin, P., and Brustis, J.J. (2007). Involvement of the ERK/MAP kinase signalling pathway in milli-calpain activation and myogenic cell migration. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 1177-1189.
- Li, M., Chen, C., Zhou, Z., Xu, S., and Yu, Z. (2012a). A TRPC1-mediated increase in store-operated Ca²⁺ entry is required for the proliferation of adult hippocampal neural progenitor cells. *Cell calcium* 51, 486-496.
- Li, T., Finch, E.A., Graham, V., Zhang, Z.S., Ding, J.D., Burch, J., Oh-Hora, M., and Rosenberg, P. (2012b). STIM1-Ca²⁺ Signaling Is Required for the Hypertrophic Growth of Skeletal Muscle in Mice. *Molecular and cellular biology* 32, 3009-3017.
- Li, Y., Tondravi, M., Liu, J., Smith, E., Haudenschild, C.C., Kaczmarek, M., and Zhan, X. (2001). Cortactin potentiates bone metastasis of breast cancer cells. *Cancer Res* 61, 6906-6911.
- Liou, J., Fivaz, M., Inoue, T., and Meyer, T. (2007). Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after Ca²⁺ store depletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 9301-9306.
- Liou, J., Kim, M.L., Heo, W.D., Jones, J.T., Myers, J.W., Ferrell, J.E., Jr., and Meyer, T. (2005). STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Curr Biol* 15, 1235-1241.

- Lis, A., Peinelt, C., Beck, A., Parvez, S., Monteilh-Zoller, M., Fleig, A., and Penner, R. (2007). CRACM1, CRACM2, and CRACM3 are store-operated Ca²⁺ channels with distinct functional properties. *Curr Biol* 17, 794-800.
- Litjens, T., Harland, M.L., Roberts, M.L., Barritt, G.J., and Rychkov, G.Y. (2004). Fast Ca²⁺-dependent inactivation of the store-operated Ca²⁺ current (ISOC) in liver cells: a role for calmodulin. *J Physiol* 558, 85-97.
- Liu, H., Hughes, J.D., Rollins, S., Chen, B., and Perkins, E. (2011). Calcium entry via ORAI1 regulates glioblastoma cell proliferation and apoptosis. *Exp Mol Pathol* 91, 753-760.
- Liu, S., Calderwood, D.A., and Ginsberg, M.H. (2000). Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci* 113 (Pt 20), 3563-3571.
- Lua, B.L., and Low, B.C. (2005). Cortactin phosphorylation as a switch for actin cytoskeletal network and cell dynamics control. *FEBS Lett* 579, 577-585.
- Luik, R.M., Wang, B., Prakriya, M., Wu, M.M., and Lewis, R.S. (2008). Oligomerization of STIM1 couples ER calcium depletion to CRAC channel activation. *Nature* 454, 538-542.
- Luik, R.M., Wu, M.M., Buchanan, J., and Lewis, R.S. (2006). The elementary unit of store-operated Ca²⁺ entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions. *The Journal of cell biology* 174, 815-825.
- Lytton, J., Westlin, M., and Hanley, M.R. (1991). Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *The Journal of biological chemistry* 266, 17067-17071.
- MacGrath, S.M., and Koleske, A.J. (2012). Cortactin in cell migration and cancer at a glance. *J Cell Sci* 125, 1621-1626.
- Mancarella, S., Potireddy, S., Wang, Y., Gao, H., Gandhirajan, R.K., Autieri, M., Scalia, R., Cheng, Z., Wang, H., Madesh, M., *et al.* (2013). Targeted STIM deletion impairs calcium homeostasis, NFAT activation, and growth of smooth muscle. *FASEB J* 27, 893-906.
- Manji, S.S., Parker, N.J., Williams, R.T., van Stekelenburg, L., Pearson, R.B., Dziadek, M., and Smith, P.J. (2000). STIM1: a novel phosphoprotein located at the cell surface. *Biochim Biophys Acta* 1481, 147-155.
- Martin-Romero, F.J., Lopez-Guerrero, A.M., Alvarez, I.S., and Pozo-Guisado, E. (2012). Role of store-operated calcium entry during meiotic progression and fertilization of mammalian oocytes. *Int Rev Cell Mol Biol* 295, 291-328.
- Martin-Romero, F.J., Ortiz-de-Galisteo, J.R., Lara-Laranjeira, J., Dominguez-Arroyo, J.A., Gonzalez-Carrera, E., and Alvarez, I.S. (2008). Store-operated calcium entry in human oocytes and sensitivity to oxidative stress. *Biol Reprod* 78, 307-315.
- Martinez-Quiles, N., Ho, H.Y., Kirschner, M.W., Ramesh, N., and Geha, R.S. (2004). Erk/Src phosphorylation of cortactin acts as a switch on-switch off mechanism that controls its ability to activate N-WASP. *Mol Cell Biol* 24, 5269-5280.
- Meissner, G. (1994). Ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annu Rev Physiol* 56, 485-508.
- Mignen, O., Thompson, J.L., and Shuttleworth, T.J. (2007). STIM1 regulates Ca²⁺ entry via arachidonate-regulated Ca²⁺-selective (ARC) channels without store depletion or translocation to the plasma membrane. *J Physiol* 579, 703-715.
- Mignen, O., Thompson, J.L., and Shuttleworth, T.J. (2008). Orai1 subunit stoichiometry of the mammalian CRAC channel pore. *J Physiol* 586, 419-425.
- Mitchison, T.J., and Cramer, L.P. (1996). Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* 84, 371-379.
- Mitra, S.K., Hanson, D.A., and Schlaepfer, D.D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 56-68.
- Mitra, S.K., and Schlaepfer, D.D. (2006). Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biol* 18, 516-523.
- Montell, C. (2005). The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* 2005, re3.
- Montell, C., and Rubin, G.M. (1989). Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2, 1313-1323.

- Morrison, E.E., Wardleworth, B.N., Askham, J.M., Markham, A.F., and Meredith, D.M. (1998). EB1, a protein which interacts with the APC tumour suppressor, is associated with the microtubule cytoskeleton throughout the cell cycle. *Oncogene* *17*, 3471-3477.
- Motiani, R.K., Hyzinski-Garcia, M.C., Zhang, X., Henkel, M.M., Abdullaev, I.F., Kuo, Y.H., Matrougui, K., Mongin, A.A., and Trebak, M. (2013). STIM1 and Orai1 mediate CRAC channel activity and are essential for human glioblastoma invasion. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*.
- Muik, M., Fahrner, M., Derler, I., Schindl, R., Bergsmann, J., Frischauf, I., Groschner, K., and Romanin, C. (2009). A Cytosolic Homomerization and a Modulatory Domain within STIM1 C Terminus Determine Coupling to ORAI1 Channels. *J Biol Chem* *284*, 8421-8426.
- Muik, M., Fahrner, M., Schindl, R., Stathopoulos, P., Frischauf, I., Derler, I., Plenk, P., Lackner, B., Groschner, K., Ikura, M., *et al.* (2011). STIM1 couples to ORAI1 via an intramolecular transition into an extended conformation. *EMBO J* *30*, 1678-1689.
- Muik, M., Frischauf, I., Derler, I., Fahrner, M., Bergsmann, J., Eder, P., Schindl, R., Hesch, C., Polzinger, B., Fritsch, R., *et al.* (2008). Dynamic coupling of the putative coiled-coil domain of ORAI1 with STIM1 mediates ORAI1 channel activation. *The Journal of biological chemistry* *283*, 8014-8022.
- Mullins, F.M., Park, C.Y., Dolmetsch, R.E., and Lewis, R.S. (2009). STIM1 and calmodulin interact with Orai1 to induce Ca²⁺-dependent inactivation of CRAC channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 15495-15500.
- Mullins, R.D., Heuser, J.A., and Pollard, T.D. (1998). The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 6181-6186.
- Nabeshima, K., Inoue, T., Shimao, Y., and Sameshima, T. (2002). Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol Int* *52*, 255-264.
- Nagano, M., Hoshino, D., Koshikawa, N., Akizawa, T., and Seiki, M. (2012). Turnover of focal adhesions and cancer cell migration. *Int J Cell Biol* *2012*, 310616.
- Nathke, I. (2004). APC at a glance. *Journal of cell science* *117*, 4873-4875.
- O'Connor, R. (2003). Regulation of IGF-I receptor signaling in tumor cells. *Horm Metab Res* *35*, 771-777.
- Olsen, J.V., Blagoev, B., Gnadt, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., and Mann, M. (2006). Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* *127*, 635-648.
- Palty, R., Raveh, A., Kaminsky, I., Meller, R., and Reuveny, E. (2012). SARAF inactivates the store operated calcium entry machinery to prevent excess calcium refilling. *Cell* *149*, 425-438.
- Pani, B., and Singh, B.B. (2009). Lipid rafts/caveolae as microdomains of calcium signaling. *Cell Calcium* *45*, 625-633.
- Parekh, A.B., and Penner, R. (1997). Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev* *77*, 901-930.
- Parekh, A.B., and Putney, J.W., Jr. (2005). Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* *85*, 757-810.
- Park, C.Y., Hoover, P.J., Mullins, F.M., Bachhawat, P., Covington, E.D., Raunser, S., Walz, T., Garcia, K.C., Dolmetsch, R.E., and Lewis, R.S. (2009). STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell* *136*, 876-890.
- Park, C.Y., Shcheglovitov, A., and Dolmetsch, R. (2010). The CRAC channel activator STIM1 binds and inhibits L-type voltage-gated calcium channels. *Science* *330*, 101-105.
- Parvez, S., Beck, A., Peinelt, C., Soboloff, J., Lis, A., Monteilh-Zoller, M., Gill, D.L., Fleig, A., and Penner, R. (2008). STIM2 protein mediates distinct store-dependent and store-independent modes of CRAC channel activation. *FASEB J* *22*, 752-761.
- Patel, A.S., Schechter, G.L., Wasilenko, W.J., and Somers, K.D. (1998). Overexpression of EMS1/cortactin in NIH3T3 fibroblasts causes increased cell motility and invasion in vitro. *Oncogene* *16*, 3227-3232.
- Patterson, R.L., van Rossum, D.B., and Gill, D.L. (1999). Store-operated Ca²⁺ entry: evidence for a secretion-like coupling model. *Cell* *98*, 487-499.
- Peinelt, C., Vig, M., Koomoa, D.L., Beck, A., Nadler, M.J., Koblan-Huberson, M., Lis, A., Fleig, A., Penner, R., and Kinet, J.P. (2006). Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nat Cell Biol* *8*, 771-773.

- Penna, A., Demuro, A., Yeromin, A.V., Zhang, S.L., Safrina, O., Parker, I., and Cahalan, M.D. (2008). The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers. *Nature* *456*, 116-120.
- Petersen, C.C., Berridge, M.J., Borgese, M.F., and Bennett, D.L. (1995). Putative capacitative calcium entry channels: expression of *Drosophila* trp and evidence for the existence of vertebrate homologues. *Biochem J* *311* (Pt 1), 41-44.
- Petit, V., and Thiery, J.P. (2000). Focal adhesions: structure and dynamics. *Biol Cell* *92*, 477-494.
- Pettit, E.J., and Fay, F.S. (1998). Cytosolic free calcium and the cytoskeleton in the control of leukocyte chemotaxis. *Physiol Rev* *78*, 949-967.
- Phillips, A.M., Bull, A., and Kelly, L.E. (1992). Identification of a *Drosophila* gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the trp phototransduction gene. *Neuron* *8*, 631-642.
- Phuong, T.T., Yun, Y.H., Kim, S.J., and Kang, T.M. (2013). Positive feedback control between STIM1 and NFATc3 is required for C2C12 myoblast differentiation. *Biochemical and biophysical research communications* *430*, 722-728.
- Pollard, T.D., and Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* *112*, 453-465.
- Pomorski, P. (2009). [Calcium regulation of cell migration]. *Postepy Biochem* *55*, 163-170.
- Potier, M., Gonzalez, J.C., Motiani, R.K., Abdullaev, I.F., Bisailon, J.M., Singer, H.A., and Trebak, M. (2009). Evidence for STIM1- and Orai1-dependent store-operated calcium influx through ICRCAC in vascular smooth muscle cells: role in proliferation and migration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *23*, 2425-2437.
- Pozo-Guisado, E., Campbell, D.G., Deak, M., Alvarez-Barrientos, A., Morrice, N.A., Alvarez, I.S., Alessi, D.R., and Martin-Romero, F.J. (2010). Phosphorylation of STIM1 at ERK1/2 target sites modulates store-operated calcium entry. *Journal of cell science* *123*, 3084-3093.
- Pozo-Guisado, E., Casas-Rua, V., Tomas-Martin, P., Lopez-Guerrero, A.M., Alvarez-Barrientos, A., and Martin-Romero, F.J. (2013). Phosphorylation of STIM1 at ERK1/2 target sites regulates interaction with the microtubule plus-end binding protein EB1. *Journal of cell science* *126*, 3170-3180.
- Pozo-Guisado, E., and Martin-Romero, F.J. (2013). The regulation of STIM1 by phosphorylation. *Commun Integr Biol* *6*, e26283.
- Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P., and Meldolesi, J. (1994). Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev* *74*, 595-636.
- Prakriya, M., and Lewis, R.S. (2015). Store-Operated Calcium Channels. *Physiol Rev* *95*, 1383-1436.
- Prevarskaya, N., Skryma, R., and Shuba, Y. (2011). Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors. *Nature reviews Cancer* *11*, 609-618.
- Putney, J.W., Jr. (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell calcium* *7*, 1-12.
- Putney, J.W., Jr. (1990). Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* *11*, 611-624.
- Putney, J.W., Jr., Broad, L.M., Braun, F.J., Lievreumont, J.P., and Bird, G.S. (2001). Mechanisms of capacitative calcium entry. *J Cell Sci* *114*, 2223-2229.
- Ramsey, I.S., Delling, M., and Clapham, D.E. (2006). An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol* *68*, 619-647.
- Ribeiro, C.M., Reece, J., and Putney, J.W., Jr. (1997). Role of the cytoskeleton in calcium signaling in NIH 3T3 cells. An intact cytoskeleton is required for agonist-induced $[Ca^{2+}]_i$ signaling, but not for capacitative calcium entry. *J Biol Chem* *272*, 26555-26561.
- Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., and Horwitz, A.R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* *302*, 1704-1709.
- Rodriguez-Moyano, M., Diaz, I., Dionisio, N., Zhang, X., Avila-Medina, J., Calderon-Sanchez, E., Trebak, M., Rosado, J.A., Ordonez, A., and Smani, T. (2013). Urotensin-II promotes vascular smooth muscle cell proliferation through store-operated calcium entry and EGFR transactivation. *Cardiovascular research* *100*, 297-306.

- Rommel, C., Clarke, B.A., Zimmermann, S., Nunez, L., Rossman, R., Reid, K., Moelling, K., Yancopoulos, G.D., and Glass, D.J. (1999). Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science* 286, 1738-1741.
- Roos, J., DiGregorio, P.J., Yeromin, A.V., Ohlsen, K., Lioudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J.A., Wagner, S.L., Cahalan, M.D., *et al.* (2005). STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca(2+) channel function. *J Cell Biol* 169, 435-445.
- Rosado, J.A., and Sage, S.O. (2001). Role of the ERK pathway in the activation of store-mediated calcium entry in human platelets. *The Journal of biological chemistry* 276, 15659-15665.
- Rothschild, B.L., Shim, A.H., Ammer, A.G., Kelley, L.C., Irby, K.B., Head, J.A., Chen, L., Varella-Garcia, M., Sacks, P.G., Frederick, B., *et al.* (2006). Cortactin overexpression regulates actin-related protein 2/3 complex activity, motility, and invasion in carcinomas with chromosome 11q13 amplification. *Cancer Res* 66, 8017-8025.
- Sabbioni, S., Barbanti-Brodano, G., Croce, C.M., and Negrini, M. (1997). GOK: a gene at 11p15 involved in rhabdomyosarcoma and rhabdoid tumor development. *Cancer research* 57, 4493-4497.
- Saitoh, N., Oritani, K., Saito, K., Yokota, T., Ichii, M., Sudo, T., Fujita, N., Nakajima, K., Okada, M., and Kanakura, Y. (2011). Identification of functional domains and novel binding partners of STIM proteins. *J Cell Biochem* 112, 147-156.
- Sampieri, A., Zepeda, A., Asanov, A., and Vaca, L. (2009). Visualizing the store-operated channel complex assembly in real time: identification of SERCA2 as a new member. *Cell calcium* 45, 439-446.
- Sangrar, W., Gao, Y., Scott, M., Truesdell, P., and Greer, P.A. (2007). Fer-mediated cortactin phosphorylation is associated with efficient fibroblast migration and is dependent on reactive oxygen species generation during integrin-mediated cell adhesion. *Mol Cell Biol* 27, 6140-6152.
- Schafer, C., Rymarczyk, G., Ding, L., Kirber, M.T., and Bolotina, V.M. (2012). Role of molecular determinants of store-operated Ca(2+) entry (Orai1, phospholipase A2 group 6, and STIM1) in focal adhesion formation and cell migration. *J Biol Chem* 287, 40745-40757.
- Schaller, M.D., Otey, C.A., Hildebrand, J.D., and Parsons, J.T. (1995). Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. *J Cell Biol* 130, 1181-1187.
- Schuuring, E. (1995). The involvement of the chromosome 11q13 region in human malignancies: cyclin D1 and EMS1 are two new candidate oncogenes--a review. *Gene* 159, 83-96.
- Selinger, Z., Doza, Y.N., and Minke, B. (1993). Mechanisms and genetics of photoreceptors desensitization in *Drosophila* flies. *Biochim Biophys Acta* 1179, 283-299.
- Sheridan, J.T., Gilmore, R.C., Watson, M.J., Archer, C.B., and Tarran, R. (2013). 17beta-Estradiol inhibits phosphorylation of stromal interaction molecule 1 (STIM1) protein: implication for store-operated calcium entry and chronic lung diseases. *J Biol Chem* 288, 33509-33518.
- Shinde, A.V., Motiani, R.K., Zhang, X., Abdullaev, I.F., Adam, A.P., Gonzalez-Cobos, J.C., Zhang, W., Matrougui, K., Vincent, P.A., and Trebak, M. (2013). STIM1 controls endothelial barrier function independently of Orai1 and Ca2+ entry. *Sci Signal* 6, ra18.
- Small, J.V., Stradal, T., Vignal, E., and Rottner, K. (2002). The lamellipodium: where motility begins. *Trends in cell biology* 12, 112-120.
- Smyth, J.T., Beg, A.M., Wu, S., Putney, J.W., Jr., and Rusan, N.M. (2012). Phosphoregulation of STIM1 leads to exclusion of the endoplasmic reticulum from the mitotic spindle. *Curr Biol* 22, 1487-1493.
- Smyth, J.T., DeHaven, W.I., Bird, G.S., and Putney, J.W., Jr. (2007). Role of the microtubule cytoskeleton in the function of the store-operated Ca2+ channel activator STIM1. *Journal of cell science* 120, 3762-3771.
- Smyth, J.T., Dehaven, W.I., Bird, G.S., and Putney, J.W., Jr. (2008). Ca2+-store-dependent and -independent reversal of Stim1 localization and function. *Journal of cell science* 121, 762-772.
- Smyth, J.T., Petrankska, J.G., Boyles, R.R., Dehaven, W.I., Fukushima, M., Johnson, K.L., Williams, J.G., and Putney Jr, J.W. (2009). Phosphorylation of STIM1 underlies suppression of store-operated calcium entry during mitosis. *Nat Cell Biol*.

- 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.
- Soboloff, J., Spassova, M.A., Dziadek, M.A., and Gill, D.L. (2006a). Calcium signals mediated by STIM and Orai proteins--a new paradigm in inter-organelle communication. *Biochim Biophys Acta* *1763*, 1161-1168.
- Soboloff, J., Spassova, M.A., Hewavitharana, T., He, L.P., Xu, W., Johnstone, L.S., Dziadek, M.A., and Gill, D.L. (2006b). STIM2 is an inhibitor of STIM1-mediated store-operated Ca²⁺ Entry. *Curr Biol* *16*, 1465-1470.
- Soboloff, J., Spassova, M.A., Tang, X.D., Hewavitharana, T., Xu, W., and Gill, D.L. (2006c). Orai1 and STIM1 reconstitute store-operated calcium channel function. *The Journal of biological chemistry* *281*, 20661-20665.
- Somasundaram, A., Shum, A.K., McBride, H.J., Kessler, J.A., Feske, S., Miller, R.J., and Prakriya, M. (2014). Store-Operated CRAC Channels Regulate Gene Expression and Proliferation in Neural Progenitor Cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *34*, 9107-9123.
- Spassova, M.A., Soboloff, J., He, L.P., Xu, W., Dziadek, M.A., and Gill, D.L. (2006). STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca(2+) channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 4040-4045.
- Srikanth, S., Jung, H.J., Kim, K.D., Souda, P., Whitelegge, J., and Gwack, Y. (2010). A novel EF-hand protein, CRACR2A, is a cytosolic Ca²⁺ sensor that stabilizes CRAC channels in T cells. *Nat Cell Biol* *12*, 436-446.
- Steffen, A., Faix, J., Resch, G.P., Linkner, J., Wehland, J., Small, J.V., Rottner, K., and Stradal, T.E. (2006). Filopodia formation in the absence of functional WAVE- and Arp2/3-complexes. *Mol Biol Cell* *17*, 2581-2591.
- Stiber, J., Hawkins, A., Zhang, Z.S., Wang, S., Burch, J., Graham, V., Ward, C.C., Seth, M., Finch, E., Malouf, N., *et al.* (2008). STIM1 signalling controls store-operated calcium entry required for development and contractile function in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* *10*, 688-697.
- Streb, H., Irvine, R.F., Berridge, M.J., and Schulz, I. (1983). Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* *306*, 67-69.
- Suganuma, N., Ito, S., Aso, H., Kondo, M., Sato, M., Sokabe, M., and Hasegawa, Y. (2012). STIM1 regulates platelet-derived growth factor-induced migration and Ca²⁺ influx in human airway smooth muscle cells. *PloS one* *7*, e45056.
- Sweeney, M., Yu, Y., Platoshyn, O., Zhang, S., McDaniel, S.S., and Yuan, J.X. (2002). Inhibition of endogenous TRP1 decreases capacitative Ca²⁺ entry and attenuates pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* *283*, L144-155.
- Tamura, N., and Draviam, V.M. (2012). Microtubule plus-ends within a mitotic cell are 'moving platforms' with anchoring, signalling and force-coupling roles. *Open Biol* *2*, 120132.
- Thastrup, O., Cullen, P.J., Drobak, B.K., Hanley, M.R., and Dawson, A.P. (1990). Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca(2+) stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *87*, 2466-2470.
- Thomas, A.P., and Delaville, F. (1991). The use of fluorescent indicators for measurements of cytosolic-free calcium concentration in cell population and single cells. In *Cellular calcium*, J.G. McCormack, and P.H. Cobbold, eds. (Oxford, UK, IRL Press), pp. 1-54.
- Tian, D., Jacobo, S.M., Billing, D., Rozkalne, A., Gage, S.D., Anagnostou, T., Pavenstadt, H., Hsu, H.H., Schlondorff, J., Ramos, A., *et al.* (2010). Antagonistic regulation of actin dynamics and cell motility by TRPC5 and TRPC6 channels. *Sci Signal* *3*, ra77.
- Tirnauer, J.S., and Bierer, B.E. (2000). EB1 proteins regulate microtubule dynamics, cell polarity, and chromosome stability. *J Cell Biol* *149*, 761-766.
- Tsai, F.C., and Meyer, T. (2012). Ca²⁺ pulses control local cycles of lamellipodia retraction and adhesion along the front of migrating cells. *Curr Biol* *22*, 837-842.
- Tsai, F.C., Seki, A., Yang, H.W., Hayer, A., Carrasco, S., Malmersjo, S., and Meyer, T. (2014). A polarized Ca²⁺, diacylglycerol and STIM1 signalling system regulates directed cell migration. *Nature cell biology* *16*, 133-144.

- Umehura, M., Baljinnyam, E., Feske, S., De Lorenzo, M.S., Xie, L.H., Feng, X., Oda, K., Makino, A., Fujita, T., Yokoyama, U., *et al.* (2014). Store-Operated Ca(2) (+) Entry (SOCE) Regulates Melanoma Proliferation and Cell Migration. *PloS one* 9, e89292.
- Urano, T., Liu, J., Li, Y., Smith, N., and Zhan, X. (2003). Sequential interaction of actin-related proteins 2 and 3 (Arp2/3) complex with neural Wiscott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) and cortactin during branched actin filament network formation. *J Biol Chem* 278, 26086-26093.
- Vaca, L. (2010). SOCC: the store-operated calcium influx complex. *Cell Calcium* 47, 199-209.
- Vaca, L., and Sampieri, A. (2002). Calmodulin modulates the delay period between release of calcium from internal stores and activation of calcium influx via endogenous TRP1 channels. *J Biol Chem* 277, 42178-42187.
- Vaca, L., Sinkins, W.G., Hu, Y., Kunze, D.L., and Schilling, W.P. (1994). Activation of recombinant trp by thapsigargin in Sf9 insect cells. *Am J Physiol* 267, C1501-1505.
- Valdes, J.A., Flores, S., Fuentes, E.N., Osorio-Fuentealba, C., Jaimovich, E., and Molina, A. (2013). IGF-1 induces IP3 -dependent calcium signal involved in the regulation of myostatin gene expression mediated by NFAT during myoblast differentiation. *J Cell Physiol* 228, 1452-1463.
- Venkatachalam, K., and Montell, C. (2007). TRP channels. *Annu Rev Biochem* 76, 387-417.
- Venkatachalam, K., van Rossum, D.B., Patterson, R.L., Ma, H.T., and Gill, D.L. (2002). The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry. *Nat Cell Biol* 4, E263-272.
- Vig, M., Peinelt, C., Beck, A., Koomoa, D.L., Rabah, D., Koblan-Huberson, M., Kraft, S., Turner, H., Fleig, A., Penner, R., *et al.* (2006). CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca(2+) entry. *Science* 312, 1220-1223.
- von Holleben, M., Gohla, A., Janssen, K.P., Iritani, B.M., and Beer-Hammer, S. (2011). Immunoinhibitory adapter protein Src homology domain 3 lymphocyte protein 2 (SLy2) regulates actin dynamics and B cell spreading. *J Biol Chem* 286, 13489-13501.
- Wang, Y., Deng, X., Hewavitharana, T., Soboloff, J., and Gill, D.L. (2008). Stim, ORAI and TRPC channels in the control of calcium entry signals in smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 35, 1127-1133.
- Wang, Y., Deng, X., Mancarella, S., Hendron, E., Eguchi, S., Soboloff, J., Tang, X.D., and Gill, D.L. (2010). The calcium store sensor, STIM1, reciprocally controls Orai and CaV1.2 channels. *Science* 330, 105-109.
- Watanabe, T., Noritake, J., Kakeno, M., Matsui, T., Harada, T., Wang, S., Itoh, N., Sato, K., Matsuzawa, K., Iwamatsu, A., *et al.* (2009). Phosphorylation of CLASP2 by GSK-3beta regulates its interaction with IQGAP1, EB1 and microtubules. *J Cell Sci* 122, 2969-2979.
- Weaver, A.M., Heuser, J.E., Karginov, A.V., Lee, W.L., Parsons, J.T., and Cooper, J.A. (2002). Interaction of cortactin and N-WASP with Arp2/3 complex. *Curr Biol* 12, 1270-1278.
- Weaver, A.M., Karginov, A.V., Kinley, A.W., Weed, S.A., Li, Y., Parsons, J.T., and Cooper, J.A. (2001). Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. *Current biology : CB* 11, 370-374.
- Webb, D.J., Donais, K., Whitmore, L.A., Thomas, S.M., Turner, C.E., Parsons, J.T., and Horwitz, A.F. (2004). FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol* 6, 154-161.
- Webb, D.J., Parsons, J.T., and Horwitz, A.F. (2002). Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again. *Nature cell biology* 4, E97-100.
- Weed, S.A., Karginov, A.V., Schafer, D.A., Weaver, A.M., Kinley, A.W., Cooper, J.A., and Parsons, J.T. (2000). Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex. *The Journal of cell biology* 151, 29-40.
- Wei, C., Wang, X., Chen, M., Ouyang, K., Song, L.S., and Cheng, H. (2009). Calcium flickers steer cell migration. *Nature* 457, 901-905.
- Wei, C., Wang, X., Zheng, M., and Cheng, H. (2012). Calcium gradients underlying cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 24, 254-261.
- Williams, R.T., Manji, S.S., Parker, N.J., Hancock, M.S., Van Stekelenburg, L., Eid, J.P., Senior, P.V., Kazenwadel, J.S., Shandala, T., Saint, R., *et al.* (2001). Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins. *Biochem J* 357, 673-685.

- Williams, R.T., Senior, P.V., Van Stekelenburg, L., Layton, J.E., Smith, P.J., and Dziadek, M.A. (2002). Stromal interaction molecule 1 (STIM1), a transmembrane protein with growth suppressor activity, contains an extracellular SAM domain modified by N-linked glycosylation. *Biochim Biophys Acta* *1596*, 131-137.
- Wong, F., Schaefer, E.L., Roop, B.C., LaMendola, J.N., Johnson-Seaton, D., and Shao, D. (1989). Proper function of the *Drosophila* *trp* gene product during pupal development is important for normal visual transduction in the adult. *Neuron* *3*, 81-94.
- Wu, H., and Parsons, J.T. (1993). Cortactin, an 80/85-kilodalton pp60src substrate, is a filamentous actin-binding protein enriched in the cell cortex. *J Cell Biol* *120*, 1417-1426.
- Wu, H., Reynolds, A.B., Kanner, S.B., Vines, R.R., and Parsons, J.T. (1991). Identification and characterization of a novel cytoskeleton-associated pp60src substrate. *Molecular and cellular biology* *11*, 5113-5124.
- Wu, M.M., Buchanan, J., Luik, R.M., and Lewis, R.S. (2006). Ca²⁺ store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *The Journal of cell biology* *174*, 803-813.
- Yamaguchi, H., Wyckoff, J., and Condeelis, J. (2005). Cell migration in tumors. *Curr Opin Cell Biol* *17*, 559-564.
- Yang, N., Tang, Y., Wang, F., Zhang, H., Xu, D., Shen, Y., Sun, S., and Yang, G. (2013). Blockade of store-operated Ca²⁺ entry inhibits hepatocarcinoma cell migration and invasion by regulating focal adhesion turnover. *Cancer Lett* *330*, 163-169.
- Yang, S., Zhang, J.J., and Huang, X.Y. (2009). Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis. *Cancer cell* *15*, 124-134.
- Yang, X., Jin, H., Cai, X., Li, S., and Shen, Y. (2012). Structural and mechanistic insights into the activation of Stromal interaction molecule 1 (STIM1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *109*, 5657-5662.
- Yao, Y., Ferrer-Montiel, A.V., Montal, M., and Tsien, R.Y. (1999). Activation of store-operated Ca²⁺ current in *Xenopus* oocytes requires SNAP-25 but not a diffusible messenger. *Cell* *98*, 475-485.
- Yeromin, A.V., Zhang, S.L., Jiang, W., Yu, Y., Safrina, O., and Cahalan, M.D. (2006). Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature* *443*, 226-229.
- Yoon, S.O., Park, S.J., Yun, C.H., and Chung, A.S. (2003). Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. *J Biochem Mol Biol* *36*, 128-137.
- Yoshida, J., Iwabuchi, K., Matsui, T., Ishibashi, T., Masuoka, T., and Nishio, M. (2012). Knockdown of stromal interaction molecule 1 (STIM1) suppresses store-operated calcium entry, cell proliferation and tumorigenicity in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Biochemical pharmacology* *84*, 1592-1603.
- Yu, F., Sun, L., and Machaca, K. (2009). Orai1 internalization and STIM1 clustering inhibition modulate SOCE inactivation during meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 17401-17406.
- Yuan, J.P., Zeng, W., Dorwart, M.R., Choi, Y.J., Worley, P.F., and Muallem, S. (2009). SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels. *Nature cell biology* *11*, 337-343.
- Yuan, J.P., Zeng, W., Huang, G.N., Worley, P.F., and Muallem, S. (2007). STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nature cell biology* *9*, 636-645.
- Zeng, W., Yuan, J.P., Kim, M.S., Choi, Y.J., Huang, G.N., Worley, P.F., and Muallem, S. (2008). STIM1 gates TRPC channels, but not Orai1, by electrostatic interaction. *Molecular cell* *32*, 439-448.
- Zhang, S.L., Kozak, J.A., Jiang, W., Yeromin, A.V., Chen, J., Yu, Y., Penna, A., Shen, W., Chi, V., and Cahalan, M.D. (2008). Store-dependent and -independent modes regulating Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel activity of human Orai1 and Orai3. *J Biol Chem* *283*, 17662-17671.
- Zhang, S.L., Yeromin, A.V., Zhang, X.H., Yu, Y., Safrina, O., Penna, A., Roos, J., Stauderman, K.A., and Cahalan, M.D. (2006). Genome-wide RNAi screen of Ca²⁺ influx identifies genes that regulate Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 9357-9362.

- Zhou, Y., Mancarella, S., Wang, Y., Yue, C., Ritchie, M., Gill, D.L., and Soboloff, J. (2009). The short N-terminal domains of STIM1 and STIM2 control the activation kinetics of Orai1 channels. *J Biol Chem* 284, 19164-19168.
- Zhou, Y., Meraner, P., Kwon, H.T., Machnes, D., Oh-hora, M., Zimmer, J., Huang, Y., Stura, A., Rao, A., and Hogan, P.G. STIM1 gates the store-operated calcium channel ORAI1 in vitro. *Nat Struct Mol Biol* 17, 112-116.
- Zhu-Mauldin, X., Marsh, S.A., Zou, L., Marchase, R.B., and Chatham, J.C. (2012). Modification of STIM1 by O-linked N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) Attenuates Store-operated Calcium Entry in Neonatal Cardiomyocytes. *The Journal of biological chemistry* 287, 39094-39106.
- Zumbrunn, J., Kinoshita, K., Hyman, A.A., and Nathke, I.S. (2001). Binding of the adenomatous polyposis coli protein to microtubules increases microtubule stability and is regulated by GSK3 beta phosphorylation. *Curr Biol* 11, 44-49.

ANEXO

ANEXO I. *Relación de plásmidos utilizados en este estudio.*

NOMBRE DEL PLÁSMIDO	PROTEÍNA	ESPECIE	GENBANK	PLÁSMIDO PARENTAL	ENZIMAS DE RESTRICCIÓN
pCMV-Flag-Empty	-	-	-	pCMV-Flag-1	-
pEGFP-Empty	-	-	-	pEGFP-N1	-
EB1-pEGFP	EB1-GFP	Mouse	NM_007896	pEGFP-N1	XhoI/SacII
Orai1-pECFP-N1 (Addgene: #6900-1)	ORAI1-CFP	Human	NM_032790	pECFP-N1	-
pCMV-Flag-STIM1	Flag-STIM1-WT	Mouse	NM_009287	pCMV-Flag-1	BamHI/NotI
pCMV-Flag-STIM1-S575A/S608A/S621A	Flag-STIM1-3A	Mouse	NM_009287	pCMV-Flag-1	BamHI/NotI
pCMV-Flag-STIM1-S575E/S608E/S621E	Flag-STIM1-3E	Mouse	NM_009287	pCMV-Flag-1	BamHI/NotI
FRT-Flag-STIM1-EB1	Flag-STIM1-EB1	Mouse	NM_009287 + NM_007896	FRT-Flag	BamHI/XhoI
pCMV-Flag-STIM1-S575A	Flag-STIM1-S575A	Mouse	NM_009287	pCMV-Flag-1	BamHI/NotI
pCMV-Flag-STIM1-S575E	Flag-STIM1-S575E	Mouse	NM_009287	pCMV-Flag-1	BamHI/NotI
pCMV-Flag-STIM1-S608A	Flag-STIM1-S608A	Mouse	NM_009287	pCMV-Flag-1	BamHI/NotI

pCMV-Flag-STIM1-S608E	Flag_STIM1-S608E	Mouse	NM_009287	pCMV-Flag-1	BamHI/NotI
pCMV-Flag-STIM1-S621A	Flag-STIM1-S621A	Mouse	NM_009287	pCMV-Flag-1	BamHI/NotI
pCMV-Flag-STIM1-S621E	Flag-STIM1-S621E	Mouse	NM_009287	pCMV-Flag-1	BamHI/NotI
STIM1-pmCherry	STIM1-WT-Cherry	Mouse	NM_009287	pCMV-mCherry-N1	XhoI/BamHI
STIM1-S575A/S608A/S621A-pmCherry	STIM1-3A-Cherry	Mouse	NM_009287	pCMV-mCherry-N1	XhoI/BamHI
STIM1-S575E/S608E/S621E-pmCherry	STIM1-3E-Cherry	Mouse	NM_009287	pCMV-mCherry-N1	XhoI/BamHI
pCMV-Tag-3B-STIM1-GFP	Myc-STIM1-WT-GFP	Mouse	NM_009287	pCMV-Tag-3B	BamHI/XhoI
pCMV-Tag-3B-STIM1-S575A/S608A/S621A-GFP	Myc-STIM1-3A-GFP	Mouse	NM_009287	pCMV-Tag-3B	BamHI/XhoI
pCMV-Tag-3B-STIM1-S575E/S608E/S621E-GFP	Myc-STIM1-3E-GFP	Mouse	NM_009287	pCMV-Tag-3B	BamHI/XhoI
HA-NFAT1-pEGFP-N1 (Addgene: #11107)	NFAT-GFP	Mouse	NM_001037178.2	pEGFP-N1	-
CTTN-pmCherry (Addgene: #27676)	CTTN-Cherry	Mouse	NM_001252572	pCMV-mCherry-N1	-
pEGFP-C1-CTTN (Addgene: #26722)	GFP-CTTN	Mouse	NM_001252572	pEGFP-C1	-

PXN-pEGFP-N3 (Addgene: #15233)	PXN-GFP	Chicken	NM_204984.1	pEGFP-N3	-
ZXN-pEGFP-N1	ZXN-GFP	Human	NM_001010972	pEGFP-N1	BamHI/HindIII