



TESIS DOCTORAL

**Regulación de la actividad y localización subcelular del canal de
Ca²⁺ ORAI1 por el citoesqueleto en el frente de migración**

Noelia Espinosa Bermejo

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

Conformidad de los directores:

Dr. Francisco Javier Martín Romero

Dra. Eulalia Pozo Guisado

Esta tesis cuenta con la autorización del director y codirectora de la misma y de la Comisión Académica del programa. Dichas autorizaciones constan en el Servicio de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Extremadura.

2023



TESIS DOCTORAL

**Regulación de la actividad y localización subcelular del canal de
Ca²⁺ ORAI1 por el citoesqueleto en el frente de migración**

Noelia Espinosa Bermejo

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

2023

Financiación

Mi incorporación al Grupo de Investigación “Señalización Celular en Patologías Clínicas” (BBB010) y la realización de esta Tesis Doctoral han sido posible gracias a la financiación procedente de:

- Una beca de formación en Investigación dentro del Plan de Iniciación a la Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación de la Universidad de Extremadura. Duración: 01/02/2019-15/07/2019.
- Una ayuda predoctoral (**PD18040**) para la financiación de contratos predoctorales para formación de doctores en los centros públicos de I+D pertenecientes al Sistema Extremeño De Ciencia, Tecnología e Innovación en el ejercicio 2019, cofinanciada por la Consejería De Economía, Ciencia y Agenda Digital de la Junta de Extremadura y el Fondo Social Europeo (FSE).
- Proyecto de Investigación **BFU2017-82716-P** obtenido en la convocatoria de 2017 dentro del Plan de Ayudas a proyectos I+D correspondiente al Programa Estatal de Fomento de la Investigación Científica y Técnica de Excelencia, Subprograma Estatal de Generación de Conocimiento en el marco del Plan Estatal de I+D+i 2013-2016. Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. Gobierno de España.
- Ayuda **IB16088** para la realización de proyectos de investigación en los Centros Públicos de I+D+i de Extremadura. Cofinanciada por la Consejería de Economía e Infraestructuras de la Junta de Extremadura y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).
- Ayuda **GR18084** para la realización de actividades de investigación y desarrollo tecnológico, de divulgación y de transferencia de conocimiento por los Grupos de Investigación de Extremadura. Cofinanciada por la Consejería de Economía, Competitividad e Innovación de la Junta de Extremadura y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).
- Ayuda **GR21101** para la realización de actividades de investigación y desarrollo tecnológico, de divulgación y de transferencia del conocimiento por los Grupos de Investigación de Extremadura. Cofinanciada por la Consejería De Economía, Ciencia y Agenda Digital de la Junta de Extremadura y el Fondo Social Europeo (FSE).



JUNTA DE EXTREMADURA

Consejería de Economía, Ciencia y Agenda Digital

Reconocimientos

La realización de los ensayos experimentales en larvas de pez cebra se llevó a cabo en el grupo de investigación “Inmunidad, Inflamación y Cáncer” dirigido por el Profesor Victoriano Mulero Méndez en la Universidad de Murcia. La experimentación realizada fue aprobada por los Comités de Bioética de la Universidad de Murcia (referencias #75/2014, #216/2014 y #395/2017) cumpliendo la normativa de la *Directiva 2010/63/EU* del Parlamento Europeo y el Consejo de la Unión Europea y el *Real Decreto 53/2013*.

La línea celular U2OS FLP-In T-REx utilizada en esta Tesis Doctoral fue cedida por el Dr. Gopal Sapkota de la Universidad de Dundee (Reino Unido). El plásmido empleado para la transfección transitoria de mCherry-CTTN (*Addgene #27676*) fue proporcionado por el Dr. Christien Merrifield (*Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales, CNRS, Gif sur Yvette, Francia*). Los plásmidos empleados para la transfección transitoria de EGFP-RAC1-WT (*Addgene #13719*) y EGFP-RAC1-Q61L (*Addgene #13720*) fueron amablemente proporcionados por el Dr. Klaus Hahn (Universidad de Carolina del Norte, EE.UU.) y el plásmido para la transfección transitoria de mCherry-RAC1-G12V por el Dr. Francesc Tebar (Universidad de Barcelona, España).

Producción científica

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

Publicaciones:

- Lopez-Guerrero AM*, **Espinosa-Bermejo N***, Sanchez-Lopez I, Macartney T, Pascual-Caro C, Orantos-Aguilera Y, Rodriguez-Ruiz L, Perez-Oliva AB, Mulero V, Pozo-Guisado E, Martin-Romero FJ. *"RAC1-Dependent ORAI1 Translocation to the Leading Edge Supports Lamellipodia Formation and Directional Persistence"*. Sci Rep. 2020 Apr 20;10(1):6580. doi: 10.1038/s41598-020-63353-5.

*Ambas autoras comparten primera autoría de este trabajo.

Presentaciones a congresos científicos:

- Lopez-Guerrero AM, Pascual-Caro C, **Espinosa-Bermejo N**, Pozo-Guisado E, Martin-Romero FJ. *"Rac1-cortactin regulates ORAI1 localization at membrane ruffling sites"*. The 43rd FEBS (Federation of European Biochemical Societies) Congress. Entidad organizadora: Czech Society for Biochemistry and Molecular Biology. Praga (República Checa). Julio, 2018.
- Lopez-Guerrero AM, Pascual-Caro C, **Espinosa-Bermejo N**, Pozo-Guisado E, Martin-Romero FJ. *"Regulation of cortical cytoskeleton dynamics and cell migration by STIM1 and ORAI1"*. 29th Ion Channel Meeting. Entidad Organizadora: Association "Canaux Ioniques". Sète (Francia). Septiembre, 2018.
- **Espinosa-Bermejo N**, Lopez-Guerrero AM, Sanchez-Lopez I, Pascual-Caro C, Pozo-Guisado E, Martin-Romero FJ. *"ORAI1 translocation to the leading edge triggered by RAC1 potentiates lamellipodia formation and cell migration"*. VII Congreso Red Española Canales Iónicos. Entidad Organizadora: Red Española de Canales Iónicos. Cáceres (España). Mayo, 2019.
- **Espinosa-Bermejo N**, Sanchez-Lopez I. *"Una aproximación al estudio molecular de la migración e invasividad de células tumorales: Translocación del canal de Ca(2+) ORAI1 al frente de migración"*. V Congreso multidisciplinar de jóvenes investigadores de Extremadura. Entidad Organizadora: Vicerrectorado De Extensión Universitaria y Oficina de Responsabilidad Social Universitaria de la

Universidad de Extremadura.
Badajoz (España). Mayo, 2019.

- **Espinosa-Bermejo N**, Lopez-Guerrero AM, Sanchez-Lopez I, Pascual-Caro C, Pozo-Guisado E, Martin-Romero FJ. *"RAC1 controls ORAI1 translocation and externalization at the leading edge to potentiate cell migration"*. VIII Congreso de la Sociedad Española de Biología Celular. Entidad Organizadora: Sociedad Española de Biología Celular.
Badajoz (España). Octubre, 2019.

- Sanchez-Lopez I, **Espinosa-Bermejo N**, Rodriguez-Ruiz L, Perez-Oliva AB, Mulero V, Pozo-Guisado E, Martin-Romero FJ. *"The plasma membrane Ca²⁺ channel ORAI1 is required for lamellipodia formation, persistence, and cell directness"*. VIII Congreso de la Sociedad Española de Biología Celular. Entidad organizadora: Sociedad Española de Biología Celular.
Badajoz (España). Octubre, 2019.

- **Espinosa-Bermejo N**, Lopez-Guerrero AM, Pascual-Caro C, Pozo-Guisado E, Martin-Romero FJ. *"The Ca²⁺ channel ORAI1 is essential for lamellipodia formation and directional persistence in osteosarcoma U2OS cells"*. ASCB/EMBO 2019 Meeting. Entidades organizadoras: *American Society for Cell Biology (ASCB)* y *European Molecular Biology Organization (EMBO)*.
Washington DC (Estados Unidos de América). Diciembre, 2019.

Agradecimientos

Aunque tendemos a pensar que todo acontecimiento tiene necesariamente un inicio fijado, yo siempre me he sentido muy unida a las palabras que Graham Greene plasmó en una de sus más conocidas novelas: “Una historia no tiene comienzo ni fin; arbitrariamente uno elige el momento de la experiencia desde el cual mira hacia atrás o hacia adelante”. Y la Tesis Doctoral, en lo que a mí respecta, no escapa a tan magnífica cita. El laberinto vital de la memoria me conduce a mi etapa de estudiante de Bachillerato y a una magnífica docente, Inmaculada Espárrago, quien no sólo cultivó en mí el ánimo de la curiosidad científica, sino que me alentó a continuar la senda académica cursando los estudios de Biología en la Universidad. De algún modo, con ella empezó a germinar el proyecto que se materializa con la realización de este trabajo de Investigación. ¡Gracias siempre, querida Inmaculada!

Tras varios años y experiencias que ahora pueden resultar lejanos, logré sin duda uno de los hitos decisivos a la hora de iniciar mi andadura en el notable campo de la Investigación científica: Conocer al Doctor Francisco Javier Martín Romero, primero como docente y posteriormente como investigador. Fue él quien me animó a querer profundizar y conocer de primera mano en qué consistía esto de la Investigación, una labor tan valiosa como abstracta cuando es nombrada a menudo desde fuera. De esta forma, y tras varios intentos en la búsqueda de financiación, el Doctor Martín Romero se convirtió en el director de esta Tesis Doctoral junto a la Doctora Eulalia Pozo Guisado, codirectora de este trabajo y apoyo pleno y constante para lograr la consecución del mismo. A ellos debo agradecerles esta magnífica oportunidad. En primer lugar, por la rigurosidad y profesionalidad que aplican en el trabajo que realizan; y, en segundo término, pero no menos importante, por la enorme implicación que demuestran con sus doctorandos. No hay palabras precisas para describir la gratitud por la dedicación y constante tutorización que brindan a quienes tenemos la suerte de compartir laboratorio y aprender con ellos y, sobre todo, de ellos. Un segundo baluarte, tan valioso como lo anteriormente citado, es la atmósfera de compañerismo que he experimentado en todas las fases de esta etapa predoctoral. En mis inicios fui acogida por la Doctora Aida López y el Doctor Carlos Pascual, quienes en todo momento ejercieron de guía e iluminación en las constantes dudas que surgen en un proyecto de semejante envergadura; el cual es difícil siempre, pero especialmente complicado en los primeros meses. Tras ellos vinieron Irene Sánchez, Yolanda Orantos, Marian Caro y Marta Fontán. Junto a ellas he vivido sin duda la gestación madura de esta Tesis. Han sido muchísimas las horas y los momentos compartidos, tanto dentro como fuera del laboratorio. Aunque no vamos a engañarnos a estas alturas de la película, principalmente dentro, pues esta profesión no entiende de horarios ni fechas clave marcadas en el calendario. En estos últimos años ellas han sido apoyo constante, sin importar el día o la hora. Siempre juntas en las dudas para el cálculo de la molaridad o la preparación de tampones, pero también una valiosa compañía en las reflexiones, canciones y memes compartidos para sobrellevar los agobios. Y cuando los astros se han alineado y las células nos lo han permitido, cenas de sushi y algún que otro *escape room*. ¡Porque siempre hay que estar

preparada para los múltiples escenarios que pueden darse en un laboratorio, y quedarse encerrada no es una excepción! Mil gracias por todo, chicas. Y, sobre todo, muchísimo valor a las que recogéis el testigo. Sé que os va a ir fenomenal, todos los ánimos y mis mejores deseos en los meses que vienen. ¡Vosotras podéis, *FemLab forever!*

Más allá de la esfera profesional, no puedo dejar de agradecer a la Asociación de Doctorandos de la Universidad de Extremadura, ADUEX, su apoyo y lucha constante por la visibilización del colectivo predoctoral. Gracias a ellos pude conocer las doctocañas y tomar contacto con doctorandos de otras áreas con inquietudes comunes. Aunque la pandemia frenó durante años la parte más social de estas iniciativas, sin duda puedo decir que he conocido a gente maravillosa y que me llevo amistades que espero conservar por siempre. Son muchos los nombres y no quisiera faltar al sentimiento de gratitud dejando alguno sin citar, sé que muchos de los que tengáis oportunidad de leer estas palabras sabréis sin duda reconocerlos en ellas.

Asimismo, quiero dirigir mi atención a personas y lugares que, sin relación alguna con la Ciencia, me han acompañado a lo largo de estos años. Uno de esos sitios, como no podía ser de otro modo, ha sido la Escuela de Idiomas de Badajoz. En ella pude profundizar en el conocimiento del francés, lengua que siempre irá ligada en mi corazón a la Ilustración de las Ideas y el saber, con un hueco especialmente reservado a las Ciencias Naturales, el Cine y la Literatura. Sin duda, tres de mis grandes pasiones. Por ello quisiera tener unas palabras especiales para Eva Robustillo, profesora y Doctora en Literatura Francesa, quien además de enseñarme el idioma, me ha apoyado con consejos y ánimos desde mis inicios en la carrera investigadora. Junto a ella, gratitud inmensa a todos mis compañeros, tanto de francés como también de alemán. Recordaré por siempre la sonrisa y eterna amabilidad de Gonzalo, compañero de fatigas en los exámenes orales de la lengua de Goethe, a Eva y nuestras charlas nocturnas de camino a casa, así como a Brigitte por su admiración sincera y la frase que con tanto cariño siempre me dedicaba: *Ich bewundere dich!*

Otras personas que sin duda han sido faro durante esta travesía han sido mis amigos, tanto quienes viven en Badajoz como aquellos que por múltiples razones y circunstancias se encuentran dispersos geográficamente. Es en la proximidad y sinceridad del vínculo donde reside el valor del afecto. Por ello empiezo citando a Marina Murillo, la primera persona que conocí cuando empecé la Universidad. Eterna compañera en las aulas universitarias y en el salón de casa estudiando juntas. Desde que terminamos la carrera, mi admiración por ti no ha cesado de crecer. En lo profesional, por supuesto, pero si cabe aún más en lo personal. Me enorgullece haber compartido parte del camino que te ha llevado a convertirte en la docente tan excepcional que hoy eres. ¡Te quiero y te admiro infinito, amiga! También quiero recordar a mi *austenholic* preferida, Ara Reina, una auténtica jefaza en el noble arte de las Letras y del baile. Eres parte indispensable de mi vida y sin duda has sido luz y alegría en algunos de los momentos más difíciles en estos últimos años. Te quiero y te admiro en tu fortaleza y

en tu sincera entrega a los demás. Nos debemos un futuro viaje, amiga. *¡Yo tan Thelma y tú tan Louise!* Y el tercer as de esta tríada fantástica está reservado a otra mujer maravillosa, Pilar Jiménez. Eres bondad y calidez, amiga. Siempre es buena señal no tener que ir de médicos, pero contigo tus pacientes están en las mejores manos que una pueda pensar y desear. Mil gracias siempre por tu escucha activa y tus consejos. ¡Te quiero, amiga! Junto a ellas, sois muchísimos los que me habéis acompañado. No puedo dejar de dedicar una especial atención a Carlos Guiberteau y Antonio Soto, mis *sanfernadinos* preferidos. Gracias por las visitas a la Filmoteca y los desayunos sabatinos. Sin saberlo, en esas charlas compartidas me dabais la fuerza necesaria para continuar. A ti, Carlos, debo valorarte tu temple y tu enorme sensibilidad. Nunca dejarán de maravillarme. Gracias a ti esta tesis irá por siempre ligada al poema de Valente con el firme compromiso de continuidad y esperanza futura para ir *“de comienzo en comienzo por comienzos que no tienen fin”*. A ti, Antonio, te alabo tu curiosidad sincera y la capacidad de emoción que te despierta todo lo que te rodea. Cree en ti, pues no hay tesoro más valioso que una curiosidad cognitiva ligada a la emoción. Gracias por tus canciones —¿Hay alguien con mejor gusto musical que tú? Mucho lo dudo, amigo— y por resolverme siempre las dudas informáticas. Espero no haber sido demasiado pesada, y si así ha sido, mis disculpas y mi firme promesa de que quedas invitado a una rica cena en nuestro futuro viaje a La Provenza. También merecen un lugar especial aquí Juan Pardo y Sara Martín, quienes me habéis apoyado desde el inicio en esto y aguantado en no pocas ocasiones las ocurrencias que se me venían a la mente al establecer símiles entre Cine y Ciencia. Y por supuesto, gracias a Beatriz García Barreales, buena amiga y una de las personas favoritas que me ha regalado la Tesis. Me fascina tu entusiasmo y tu vitalidad. Y sin duda, el amor que profesamos a los gatos. Ya sabes que el viaje a París fue especial —gracias también a Ignacio, Ana y José Luis—, así que tenemos que repetir próximamente otro nuevo cuando ya seamos Doctoras. ¡Te toca a ti elegir destino! No puedo olvidarme tampoco de mi querido Sergio Gavilán, eres bondad y conocimiento. Todos mis mejores deseos en tu faceta docente e investigadora, pero por favor, no dejes nunca la Literatura. La gran novela de ciencia-ficción de esta década ha de salir de tu pluma y estará a la altura de tu admirado Zamiatin. Gracias por tu confianza extrema en este proyecto de tesis, por tu lucidez y por tu amabilidad. Especial reconocimiento también a Jano, por tu alegría y apoyo. ¡Como buen dios romano que eres sé que no hay techo para ti en todo lo que te propongas! Gracias también a Elena Paredes, por tu paciencia y tu bondad infinitas escuchándome en los pocos cafés que hemos podido compartir este 2023. Espero vernos pronto, ya sea aquí o en Madrid; y si es posible, con la maja de Inés. Y del lado cacereño he de nombrar a Pedro Sanz, tan amante como yo del ciclismo y los gatos, aunque no así del dulce para pena mía. Aunque nuestro querido Pogačar ya dé por perdido este Tour de Francia, espero que la entrega de esta tesis sea motivo suficiente para que vengas a la capital pacense y escapemos a Portugal a tomar buen café y un pastel de nata. ¡Y no olvides la novela de McCarthy al bajar! Y, por

supuesto, mención especial merece también en este apartado la buena gente de 84, *Charing Cross Road*. ¡Os quiero, chicos!

Otras personas que acuden a mi memoria, aunque probablemente no pueda ser precisa en el reconocimiento a todas, son Ana Ordiales, Cecilia y María José Tovar. A ti, Ana, gracias siempre por los ánimos cuando nos encontrábamos corriendo por los pasillos entre protocolo y protocolo experimental y por las charlas de los viernes por la tarde. ¡Las echaré mucho de menos! A Cecilia, mujer de sonrisa amplia y corazón alegre, gracias siempre por tus palabras y tus consejos de madre. Y a María José, sin duda una de las personas más entusiastas a la hora de escucharme hablar y animarme, gracias infinitas. ¡Tenemos una comida pendiente con Juanjo para recordar viejos tiempos, prometido queda!

También tiene parte importante en esta tesis Bruno, quien siempre confió en mis capacidades y me animó a ir más allá y no ponerme barreras nunca. Gracias por tu apoyo y por tu amistad sincera. Porque como dejó escrito Fiamma Hasse, *“não sentimos dentro do coração que somos filhos dilectos do tempo e que, se hoje amamos, foi depois de termos amado ontem”*. ¡Gracias siempre!

Y, por último, mi dedicatoria final es para mi familia. Nexo y soporte fundamental, como no podía ser de otro modo, en esta etapa. Quiero agradecer la confianza y el cariño de todos mis tíos y primos. Gracias por creer en mí y tenerme siempre presente en vuestros pensamientos, especialmente en estos últimos meses tan duros. A mis padres, Plácido y María, debo agradecerles la educación y la sensibilidad que siempre nos han inculcado a mí y a mis hermanos. Yo puedo ser bióloga, pero nadie conoce el medio natural como tú, papá. Gracias por los libros y cuentos que me leías desde que tengo memoria, por no permitir nunca que ninguna situación me sobrepasara sin extraer una valiosa lección. Gracias a ti, mamá, por enseñarme el camino de la fortaleza y la humildad. Por mostrarme que con pasión y entrega todo se puede conseguir y, sobre todo, que se puede y se ha de ser buena persona en el camino que elijamos andar. Ambos nos habéis enseñado el valor del conocimiento y el compañerismo; vosotros sois, sin duda, mis principales maestros de vida. A mi hermano Daniel, gracias infinitas por el apoyo. Si hay alguien que puede superarme en esto de ser disciplinado eres tú. Eres un crack en todo lo que te propones. Y, por qué no decirlo, te has comportado como un hermano mayor estos últimos meses *“para que me cuidara y comiera bien”*. Cómo ha cambiado la historia, pequeñajo. Y, por supuesto, unas palabras especiales también para el benjamín de la familia, Raúl. Contigo conseguí, probablemente, uno de mis mayores hitos vitales: Contagiarte el amor por el francés y las Ciencias. Aunque tú prefieras las Matemáticas y a Descartes, ya sabes que en mí siempre tendrás a tu bióloga de confianza. Eres pura sensibilidad e inteligencia. Mil gracias por todas nuestras conversaciones y por tus ánimos sempiternos, fuera cual fuera la cuestión abordada. Y a mi Rita, ¡gracias eternas por ser refugio y compañía!

*Those who dwell, as scientists or laymen, among the beauties and
mysteries of the Earth are never alone or weary of life.*

*— Quienes habitan, como científicos o profanos, entre las bellezas y
los misterios de la Tierra nunca están solos ni se cansan de vivir —*

Rachel Carson

*Tout phénomène s'inscrit dans un réseau de relations.
L'absolutisme n'a pas sa place en science.*

*—Todo fenómeno forma parte de una red de relaciones.
El absolutismo no tiene cabida en ciencia—*

Bruno Latour

Abreviaturas, acrónimos y siglas

Δ: Delección (*Deletion*)

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

aa: Aminoácido (*Amino acid*)

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

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

ARP2/3: complejo de la proteína 2/3 relacionada con la actina (*Actin related protein 2/3*)

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

BSA: Albúmina de suero bovino (*Bovine Serum Albumin*)

CAD: Dominio activador de CRAC (*CRAC Activating Domain*)

CaM: Calmodulina (*Calmodulin*)

Cas: Genes asociados a CRISPR (*CRISPR-associated genes*)

Cas9n: Nickasa Cas9 (*Cas9 nickase*)

CCh: Carbacol (*Carbachol*)

CDI: Inactivación dependiente de calcio (*Calcium-Dependent Inactivation*)

cDNA: DNA complementario (*complementary DNA*)

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

CRAC: Canales de Ca²⁺ activados por Ca²⁺ (*Calcium-Release Activated Channels*)

CRISPR: Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)

DNA: Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)

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

DMSO: Dimetil-sulfóxido (*Dimethyl Sulfoxide*)

DTT: Ditiotreitól (*Dithiothreitol*)

ECM: Matriz extracelular (*Extracellular Matrix*)

EGF: Factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor*)

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor Receptor*)

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

EMT: Transición epitelio-mesénquima (*Epithelial-Mesenchymal Transition*)

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

Fura-2 AM: Fura-2 acetoximetil éster (*Fura-2 acetoxymethyl ester*)

GAP: Proteína activadora de GTPasas (*GTPase-Activating Protein*)

GDI: Inhibidor de la disociación de nucleótidos de guanina (*GDP Dissociation Inhibitor*)

GEF: Factor intercambiador del nucleótido de guanina (*Guanine nucleotide Exchange Factor*)

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

GTPasa: Guanosina trifosfata (*GTPase: Guanosine Triphosphatase*)

HBSS: Solución salina tamponada de Hank (*Hank's Balanced Salt Solution*)

HRP: Peroxidasa de rábano (*Horseradish Peroxidase*)
kDa: Kilodalton
KO: *Knock-out*
LB: Medio Luria Bertani para *E. coli*
MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos (*Mitogen-Activated Protein Kinase*)
MP: Membrana plasmática (*PM: Plasma Membrane*)
NPFs: Factores promotores de la nucleación de actina (*Nucleation-Promoting Factors*)
mRNA: RNA mensajero (*Messenger RNA*)
N-terminal: Amino-terminal (*Amino-terminal*)
pb: pares de bases (*bp: base pair*)
PBS: Tampón fosfato salino (*Phosphate Buffered-Saline*)
PBS-T: Tampón fosfato salino + Tween 0.2% (*Phosphate Buffered-Saline + Tween 0.2%*)
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)
PEI: Polietilenimina (*Poliethylenimine*)
PFA: Paraformaldehído (*Paraformaldehyde*)
PMSF: Fluoruro de fenil metil sulfonilo (*Phenylmethylsulfonyl fluoride*)
PTM: Modificación postraducciona (*Post-Translational Modification*)
RAC1: GTPasa de la familia Rho (*RAS-related C3 botulinum toxin substrate 1*)
RE: Retículo endoplasmático (*ER: Endoplasmic Reticulum*)
RNA: Ácido ribonucleico (*Ribonucleic Acid*)
ROI: Región de interés (*Region of interest*)
rpm: Revoluciones por minuto (*Revolutions per minute*)
RT: Temperatura ambiente (*Room temperature*)
RTK: Receptor tirosina quinasa (*Receptor Tyrosine Kinase*)
RPMI: *Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium*
SD: Desviación estándar (*Standard Deviation*)
SDS: Dodecil sulfato sódico (*Sodium dodecyl sulfate*)
SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida (*Polyacrilamide gel electrophoresis*)
SEM: Error estándar de la media (*Standard Error of the Mean*)
SERCA: Ca²⁺ ATPasa de retículo endo(sarco)plasmático (*SarcoEndoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase*)
SOCs: Canales de calcio operados por depósitos (*Store-Operated Calcium Channels*)
SOCE: Entrada de calcio regulada por depósitos intracelulares (*Store Operated Calcium Entry*)
Tg: Tapsigargina (*Thapsigargin*)
Tris: Tris (hidroximetil)aminometano (*Tris hydroxymethyl aminomethane*)
WASP: Proteínas del síndrome de Wiskott-Aldrich (*Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*)
WCL: Lisados celulares totales (*Whole Cell Lysates*)
WRC: Complejo regulador de WAVE (*WAVE Regulator Complex*)
WT: Silvestre (*Wild-Type*)

Índice

ÍNDICE

RESUMEN	31
SUMMARY	35
INTRODUCCIÓN	39
1. El ion calcio como señalizador intracelular.....	41
1.1. Transportadores y bombas que regulan el incremento y la homeostasis de la concentración de Ca ²⁺ libre en el citosol.....	42
1.2. Señalización intracelular mediada por Ca ²⁺	45
2. Entrada de Ca²⁺ operada por el vaciado de depósitos intracelulares (SOCE)	46
2.1. Mecanismo de activación de los canales SOCs	47
3. Canales ORAI	49
3.1. Estructura molecular y dominios de los canales ORAI1	49
3.1.1. Activación, apertura y cierre del canal ORAI1 dependiente de STIM1: dominios intracelulares	50
3.1.2. Selectividad del canal por Ca ²⁺ : dominios transmembranales TM1, TM3 y lazo extracelular	51
3.2. Mutaciones de ORAI1 relacionadas con ganancia o pérdida de función.....	51
3.3. Modificaciones postraduccionales de ORAI1	53
3.3.1. Fosforilación	54
3.3.2. Glicosilación.....	55
3.3.3. Modulación redox mediante la oxidación de cisteínas.....	56
4. Migración	56
4.1. La mecánica celular y molecular de la migración.....	56
4.2. Regulación por Ca ²⁺ de la dinámica del citoesqueleto y la migración celular.....	60
5. Agentes moduladores en la reorganización del citoesqueleto de actina: RAC1, ARP2/3, el complejo regulador de WAVE y cortactina	61
5.1. RAC1 y las RHO GTPasas como reguladores centrales de la reorganización del citoesqueleto y protrusiones de membrana.....	61
5.1.1. Regulación de las RHO GTPasas y transducción de señales	62
5.1.2. RAC1 y las protrusiones de membrana	64
5.1.2.1. RAC1, agente promotor de la nucleación de actina para la formación de lamelipodios y <i>ruffling</i> de membrana	65

5.2.	Complejo ARP2/3, agente promotor de la nucleación de actina.....	67
5.3.	El complejo regulador de WAVE (WRC) como agente promotor de la nucleación de actina	70
5.4.	Cortactina y la reorganización del citoesqueleto	71
5.4.1.	Estructura molecular y dominios de CTTN.....	71
5.4.2.	Localización de CTTN en ruffles de membrana mediada por RAC1..	73
5.4.3.	CTTN en migración celular y cáncer	74
OBJETIVOS.....		75
RESULTADOS.....		79
CAPÍTULO I.....		81
1.	Estudio del papel del canal de calcio ORAI1 en el frente de migración.....	83
1.1.	Análisis del papel de ORAI1 en la velocidad de migración, distancia total acumulada y la direccionalidad de células U2OS.....	83
1.1.1.	Análisis del impacto de la supresión de ORAI1 en la velocidad de migración celular	84
1.1.2.	Análisis del impacto de la supresión de ORAI1 en la distancia total acumulada de migración	85
1.1.3.	Análisis del impacto de la supresión de ORAI1 en la direccionalidad.....	85
1.2.	Análisis del impacto de la supresión de ORAI1 en la formación de lamelipodios.....	88
1.2.1.	Estudio del impacto de la supresión de ORAI1 en la persistencia direccional	90
1.3.	ORAI1 regula el ratio de actina filamentosa <i>versus</i> actina globular libre en el citosol	92
1.4.	Estudio del potencial invasivo de ORAI1 en la línea celular U2OS a través de xenotransplantes en pez cebra (mutante casper) como modelo experimental.....	95
2.	ORAI1 y la reorganización del citoesqueleto en el frente de migración.....	96
2.1.	El factor de crecimiento epidémico (EGF) induce la translocación de ORAI1 al frente de migración	96
2.1.1.	Interacción de ORAI1 con marcadores del frente de migración.....	96
2.1.2.	La colocalización de ORAI1 y CTTN es modulada por EGF.....	98
3.	RAC1 regula la translocación de ORAI1 al frente de migración	100

3.1.	La actividad de RAC1 controla la localización de CTTN en el frente de migración.....	100
3.2.	Análisis de la relocalización de ORAI1 en el frente de migración en respuesta a la activación o inhibición de RAC1.....	102
3.3.	Análisis del <i>ruffling</i> de membrana en el frente de migración en respuesta a la activación o inhibición de RAC1	105
3.4.	Análisis de la localización de ORAI1 en células que expresan RAC1 inactivo.....	107
3.4.1.	Análisis de la vía secretora mediante la luciferasa Gaussia en células que expresan RAC1 inactivo	110
3.5.	Estudio del papel de RAC1 en la localización subcelular de ORAI1, reorganización del citoesqueleto y migración celular	111
3.5.1.	Análisis de la interacción de la proteína RAC1 en su conformación activa con ORAI1	111
3.5.2.	Estudio del efecto de la inhibición de RAC1 sobre la migración celular.....	114
3.5.2.1.	Análisis de la inhibición de RAC1 sobre la velocidad de migración celular.....	115
3.5.2.2.	Análisis de la inhibición de RAC1 sobre la distancia acumulada	116
3.5.2.3.	Análisis del efecto de la inhibición de RAC1 sobre la direccionalidad ..	116
3.5.2.4.	Análisis de la inhibición de RAC1 sobre la longitud del frente de migración.....	117
3.5.3.	Inhibición de RAC1: Estudio del efecto en la interacción de ORAI1 con marcadores del frente de migración (CTTN y CYFIP1)	118
3.5.4.	Evaluación de ORAI1 en la superficie celular en respuesta a la inhibición de RAC1.....	120
3.5.5.	Evaluación de la inhibición de RAC1 en la actividad del canal de calcio ORAI1.....	123
CAPÍTULO II.....		127
MODIFICACIÓN POSTRADUCCIONAL DE ORAI1: LA FOSFORILACIÓN		129
1. Función de los residuos Thr295, Ser298 y Tyr300 en la actividad del canal ORAI1.....		132
1.1.	Análisis del papel de la fosforilación de Thr295 y Ser298 en la actividad del canal ORAI1	133
1.2.	Análisis del papel de la fosforilación de la Tyr300 en la actividad del canal ORAI1.....	135

2. Determinación de la fosforilación de ORAI1 en los residuos Thr295 y Ser298 mediante anticuerpos	136
2.1. Generación de anticuerpos específicos para el reconocimiento de los residuos Thr295 y Ser298 fosforilados.....	136
2.2. Modulación del nivel de fosforilación de ORAI1	137
2.2.1. Modulación de la fosforilación de ORAI1 por EGF.....	137
2.2.2. Análisis de la fosforilación de ORAI1 en la Thr295 y Ser298 en relación con la actividad del canal	139
3. Estudio de la localización de ORAI1 fosforilado en la Thr295 y Ser298.....	141
3.1. Localización de ORAI1 mutado a alanina en los residuos de Thr295 y Ser298.....	143
DISCUSIÓN.....	147
CONCLUSIONES.....	163
MATERIALES Y MÉTODOS.....	167
1. Cultivos celulares	169
2. Líneas celulares.....	169
2.1. Líneas celulares empleadas	169
2.2. Generación de líneas estables mediante el sistema FLP-In T-REx	170
2.2.1. Inducción de la expresión de ORAI1-GFP en la línea celular U2OS.....	171
2.3. Generación de líneas celulares con expresión estable de proteína ectópica mediante transducción retroviral	172
3. Clonaje molecular y transfección.....	175
3.1. Cuantificación del DNA.....	175
3.2. Transformación bacteriana	175
3.3. Obtención de DNA plasmídico.....	175
3.4. Construcciones de DNA y transfección transitoria.....	175
4. Tratamiento de las líneas celulares.....	176
4.1. Tratamiento de las líneas U2OS y HEK293	176
5. Preparación de lisados celulares e inmunoblot	177
5.1. Preparación de lisados celulares	177
5.2. Medida de la concentración de proteína	178
5.3. Ensayos de pull-down y co-inmunoprecipitación	178

5.4.	Electroforesis en condiciones desnaturalizantes y transferencia a membranas de nitrocelulosa	178
5.5.	Inmunodetección.....	179
6.	Ensayo de biotilación de proteínas de superficie celular	181
7.	Ensayos de actividad de RAC1	181
8.	Inmunolocalización	182
8.1.	Análisis por epifluorescencia en célula fijada.....	183
8.2.	Análisis por epifluorescencia en célula viva	183
9.	Ensayo de secreción de la luciferasa <i>Gaussia</i>	183
10.	Ensayos de migración y motilidad celular	184
10.1.	Análisis de imágenes	185
11.	Medida de la concentración de calcio libre intracelular	186
11.1.	Carga con Fura-2 AM en células U2OS	187
11.2.	Medida de los valores de fluorescencia	188
11.3.	Calibración de la medida	188
11.4.	Activación de SOCE con taspargina	188
11.5.	Activación de SOCE con ATP y carbacol	189
12.	Ensayo de invasión <i>in vivo</i>	189
12.1.	Cálculo del grado de invasividad celular	190
13.	Ensayo <i>in vivo</i> del ratio actina-F/actina-G	190
	BIBLIOGRAFÍA	193
	ANEXO I. Relación de construcciones empleadas en este estudio.....	221

Resumen

La migración celular es un proceso fisiológico que requiere de la reorganización del citoesqueleto de actina para la formación de protrusiones de membrana y generar un frente de migración polarizado. Esta reorganización del citoesqueleto se conoce como *ruffling* (ondulaciones) de membrana y es activada por la polimerización de la actina cortical a través del complejo ARP2/3 y la proteína WAVE mediante un proceso regulado por la actividad RAC1. Se conoce que la entrada de Ca^{2+} extracelular y la organización espaciotemporal de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es esencial en la reorganización del citoesqueleto durante la migración celular. En este sentido, numerosos estudios han mostrado que SOCE (*entrada de calcio operada por el vaciado de depósitos intracelulares*) es esencial para la migración celular. Así, el objetivo principal de esta Tesis Doctoral es estudiar el papel de la proteína ORAI1 en el frente de migración celular. Para desarrollar esta investigación se ha utilizado la línea celular de osteosarcoma humano U2OS, una línea celular con alta actividad tumorigénica. Esta línea celular se modificó mediante edición genómica con CRISPR/Cas9 para suprimir la expresión de ORAI1, y nuestros resultados muestran que las células deficientes en ORAI1 (ORAI1-KO) presentan una reducción significativa del *ruffling* de membrana, lo cual conduce a una pérdida de la persistencia direccional y a la ralentización de la migración celular. Además, la ausencia de ORAI1 disminuye el potencial invasivo de las células U2OS en el pez cebra (*Danio rerio*), mutante casper, como modelo animal, lo que sugiere que ORAI1 participa directamente tanto en procesos de migración tumoral como en procesos metastáticos. En este trabajo hemos observado que mediante un mecanismo dependiente de la actividad RAC1, que puede ser estimulado por EGF, ORAI1 interacciona con CTTN, ARP2/3 y CYFIP1, que son agentes promotores de la nucleación de actina para la generación de lamelipodios en el frente de migración. Además, mediante el análisis de la fosforilación de residuos de ORAI1 hemos observado que la inhibición de la fosforilación de la Thr295 y Ser298 induce un aumento en la entrada de Ca^{2+} en la célula y un enriquecimiento de ORAI1 en vesículas intracelulares, lo que pone de manifiesto un nuevo mecanismo de regulación de SOCE a través de la fosforilación/desfosforilación de estos residuos. En conjunto, estos resultados nos permiten establecer un modelo en el cual ORAI1 forma parte de un complejo macromolecular junto a CTTN, ARP2/3 y CYFIP1 en el frente de migración, en el cual RAC1 controla la translocación de ORAI1 a la membrana plasmática, donde participa en la señalización de Ca^{2+} polarizada y en la generación del *ruffling* de membrana.

Summary

Cell migration is a physiological process that requires reorganization of the actin cytoskeleton for the formation of membrane protrusions to generate a polarized migration front or leading edge. This reorganization of the cytoskeleton is known as membrane ruffling and is triggered by the polymerization of cortical actin through the ARP2/3 complex and the WAVE protein via a process regulated by RAC1 activity. It is known that extracellular Ca^{2+} entry and the spatiotemporal organization of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is essential in the reorganization of the cytoskeleton during cell migration. In this regard, numerous studies have shown that SOCE (store-operated calcium entry) is essential for cell migration. Thus, the main objective of this PhD Thesis is to study the role of the ORAI1 protein in the leading edge. The human osteosarcoma cell line U2OS, a cell line with high tumorigenic activity, has been used to develop this research. This cell line was modified by genome editing with CRISPR/Cas9 to suppress ORAI1 expression, and our results show that cells deficient in ORAI1 (ORAI1-KO) exhibit a significant reduction in membrane ruffling, leading to a loss of directional persistence and slowing of cell migration. Furthermore, the absence of ORAI1 decreases the invasive potential of U2OS cells in zebrafish (*Danio rerio*) casper mutant, suggesting that ORAI1 is directly involved in both tumor migration and metastatic processes. In this work we have observed that ORAI1 interacts with CTTN, ARP2/3 and CYFIP1, through an EGF-dependent activation of RAC1. CTTN, ARP2/3 and CYFIP1 are actin nucleation-promoting agents for the generation of lamellipodia at the leading edge, suggesting a role for ORAI1 in this subcellular location. Furthermore, by analyzing the phosphorylation of ORAI1 residues we observed that inhibition of Thr295 and Ser298 phosphorylation induces an increase in extracellular Ca^{2+} entry and an enrichment of ORAI1 in intracellular vesicles, revealing a new mechanism of SOCE regulation through phosphorylation/dephosphorylation of these residues. Taken together, these results allow us to establish a model in which ORAI1 is part of a macromolecular complex together with CTTN, ARP2/3 and CYFIP1 at the leading edge, in which RAC1 controls the translocation of ORAI1 to the plasma membrane, where it participates in polarized Ca^{2+} signaling and in the generation of membrane ruffling.

Introducción

1. El ion calcio como señalizador intracelular

La concentración de Ca^{2+} libre intracelular regula numerosos procesos celulares y fisiológicos, como exocitosis, contracción de filamentos del citoesqueleto, división celular o fecundación (Berridge, 1997; Berridge et al., 2000). Este papel se encuentra altamente conservado en organismos procariotas y eucariotas, y su acción está mediada por proteínas sensibles a la concentración de Ca^{2+} que actúan como efectores de este segundo mensajero en diferentes rutas de señalización.

En condiciones de reposo, la concentración de calcio libre en el citosol ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) está en torno a 100 nM, mientras que la concentración en el medio extracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$) es 1-2 mM, del orden de diez mil veces superior. A partir de este gradiente químico se pueden generar incrementos transitorios y localizados en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, ya sea por la despolarización de membranas o por la estimulación de moléculas de señalización extracelular (Bootman et al., 2001). A través de las variaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se modula la activación de diferentes rutas de señalización celular. Dada su importancia en la fisiología celular, esta señalización mediada por Ca^{2+} requiere un estricto control espaciotemporal que es regulado a través de agentes movilizadores de Ca^{2+} (canales, bombas y proteínas tamponadoras) y de los diferentes compartimentos celulares (membrana plasmática, retículo (sarco)endoplasmático, mitocondria y aparato de Golgi) (Berridge et al., 2003; Clapham, 2007).

Los mecanismos que modulan la homeostasis intracelular de Ca^{2+} pueden operar a través de la extrusión de este catión al medio extracelular o al interior de orgánulos subcelulares, tales como el retículo endoplasmático (principal reservorio intracelular de Ca^{2+}) y la mitocondria, o bien mediante la unión a proteínas con una alta afinidad al ion Ca^{2+} , también conocidas como CBP (*Ca²⁺ binding proteins*), como es el caso de la calmodulina (Berridge et al., 2000; Carafoli et al., 2001; Yáñez et al., 2012). En el primer caso intervienen las bombas, canales y transportadores de la membrana plasmática y del retículo endoplasmático. A través de estímulos, estos canales y bombas se activan, produciéndose una entrada de Ca^{2+} al citosol y un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que se transmite en forma de ondas para desencadenar una respuesta al estímulo, con la consiguiente posterior extrusión de Ca^{2+} para restaurar la concentración basal citosólica (100 nM). Asimismo, la extrusión del Ca^{2+} puede a su vez participar en señalización intercelular a través de receptores CaR (*extracellular Ca²⁺-sensing receptor*) (Hofer et al., 2000).

La coordinación entre los diferentes transportadores regula la señalización de Ca^{2+} temporal y espacialmente, lo cual permite que los picos/ondas de Ca^{2+} que se generan en respuesta a la estimulación tengan una duración y localización determinada en relación con la cascada de señalización y el proceso celular en el que participan. De este

Introducción

modo, el rango temporal puede comprender desde microsegundos hasta horas, tal y como se representa en la figura 1.

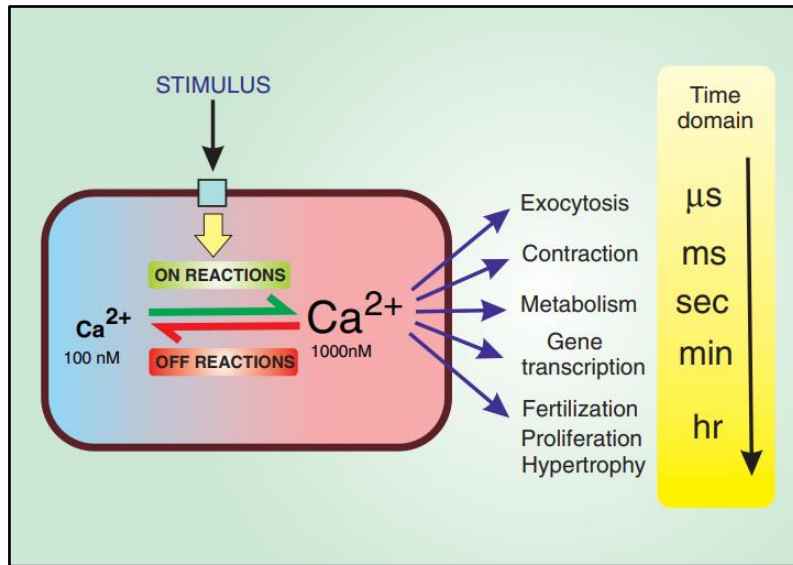


Figura 1. Regulación de la señalización dependiente de Ca^{2+} . La concentración de Ca^{2+} libre citosólico en células en reposo es aproximadamente de 100 nM. Esta concentración puede aumentar hasta 10 veces (1 μM) en respuesta a estímulos que activan la movilización de Ca^{2+} , recuperándose la concentración basal cuando finaliza el estímulo. A través de estas variaciones, el Ca^{2+} participa como segundo mensajero en diferentes rutas de señalización que regulan diferentes procesos celulares. El incremento de Ca^{2+} que regula estos procesos requiere un estricto control espaciotemporal. Fuente de la imagen (Berridge, 2012).

1.1. Transportadores y bombas que regulan el incremento y la homeostasis de la concentración de Ca^{2+} libre en el citosol

Dada la importancia de una correcta coordinación espaciotemporal en la señalización del ion Ca^{2+} , la distribución celular de los canales y transportadores de este catión es crucial. En base a su localización, los principales transportadores implicados en el incremento de Ca^{2+} citosólico se clasifican en:

I. Canales localizados en la membrana plasmática que median el influjo de Ca^{2+} intracelular

- Canales operados por voltaje (VOCs, *voltage-operated calcium channels*): son canales sensibles al voltaje cuya apertura se regula por la carga eléctrica que recorre la membrana plasmática. Se activan en respuesta a la despolarización de la membrana plasmática y pueden ser de tres tipos: Ca_v1 (canales de tipo-L), Ca_v2 (N-,P/Q y de tipo R) y Ca_v2 (canales de tipo T) (Catterall, 1998; Catterall & Zheng, 2015).

- Canales operados por receptores (ROCs, *receptor-operated calcium channels*): se activan por la unión de un agonista al dominio extracelular del canal. Los ROCs más conocidos son los activados por la unión a glutamato, acetilcolina y ATP, como es el caso de los receptores P2X (Frings, 1997; Madden, 2002; Vial et al., 2004). En este grupo destaca la familia de canales TRP (*transient receptor potential*), los cuales participan en proliferación celular y en ciclos de contracción y relajación del músculo liso, entre otras funciones (Taberner et al., 2015). En concreto, los miembros de la subfamilia TRPC (*transient receptor potential canonical*) participan en la organización de los canales de Ca^{2+} que responden al vaciado de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} , como es el caso de TRPC1, un canal descrito en la formación de complejos junto a la familia de canales ORAI1 (Ambudkar, 2007; Ambudkar et al., 2007). Otros miembros de esta subfamilia están regulados por la actividad de segundos mensajero lipídicos, como es el caso del canal TRPC6, sensible a diacilglicerol (DAG) (Gudermann et al., 2004).
- Canales operados por depósitos (SOCs, *store-operated calcium channels*): son canales de Ca^{2+} activados por el vaciado de depósitos intracelulares, principalmente del retículo endoplasmático, en respuesta a diferentes estímulos, siendo la activación de la ruta de los fosfoinosítidos una de las más conocidas (Putney, 1986).

II. Canales en la membrana del retículo endoplasmático (RE) implicados en la liberación de Ca^{2+} al citosol:

- IP_3R (*Inositol trisphosphate receptor*): la apertura de estos canales se regula mediante el segundo mensajero IP_3 (Berridge et al., 2000).
- Receptores de rianodina (RyRs, *ryanodine receptors*): pueden encontrarse tanto en células musculares como no musculares, en cuyo caso se estimula la apertura del canal mediante ADP ribosa cíclica (Berridge, 1998). En las células musculares desempeñan un papel crucial en los ciclos de contracción-relajación y se activan en respuesta al vaciado de depósitos intracelulares de Ca^{2+} (Meissner, 1994).

Dado que el ion Ca^{2+} no puede ser degradado y que los niveles que alcanza la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante los procesos de señalización celular podrían llegar a ser tóxicos si se sostuviesen en el tiempo (Bootman et al., 2001), las células cuentan con diferentes sistemas de extrusión de Ca^{2+} que garantizan la restauración del nivel basal (100 nM) regulando la homeostasis intracelular para este catión (figura 2). Estos transportadores son principalmente bombas de Ca^{2+} , las cuales transportan Ca^{2+} del interior celular al medio

Introducción

extracelular o a los reservorios intracelulares mediante el consumo de ATP. Así encontramos, por un lado, la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática (PMCA, *plasma-membrane Ca^{2+} -ATPase*) y la Ca^{2+} -ATPasa del retículo endoplasmático (SERCA, *sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase*), las cuales extruyen Ca^{2+} desde el citoplasma al medio extracelular y al interior del retículo endoplasmático, respectivamente (Ebashi & Lipmann, 1962; Gill et al., 1984; Hasselbach & Makinose, 1961). En la membrana plasmática se localiza, además, el intercambiador iónico $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, que extruye Ca^{2+} al medio extracelular mediante el gradiente de Na^+ , siendo su función especialmente crítica en el tejido nervioso y en el ciclo de contracción y relajación del músculo cardíaco (Blaustein & Lederer, 1999; DiPolo & Beaugé, 2006).

Adicionalmente existen otros sistemas que también participan en la homeostasis citosólica de Ca^{2+} , como el unitransportador de Ca^{2+} MCU (*mitochondrial Ca^{2+} uniporter*) que transporta Ca^{2+} al interior de la mitocondria (Budd & Nicholls, 1996) y la Ca^{2+} -ATPasa de las vías secretoras tipo I (SPCA1, *secretory-pathway Ca^{2+} -ATPase*) en el aparato de Golgi, insensible a tapsigargina y reguladora del tráfico vesicular a través del Golgi (Micaroni et al., 2010; Van Baelen et al., 2004).

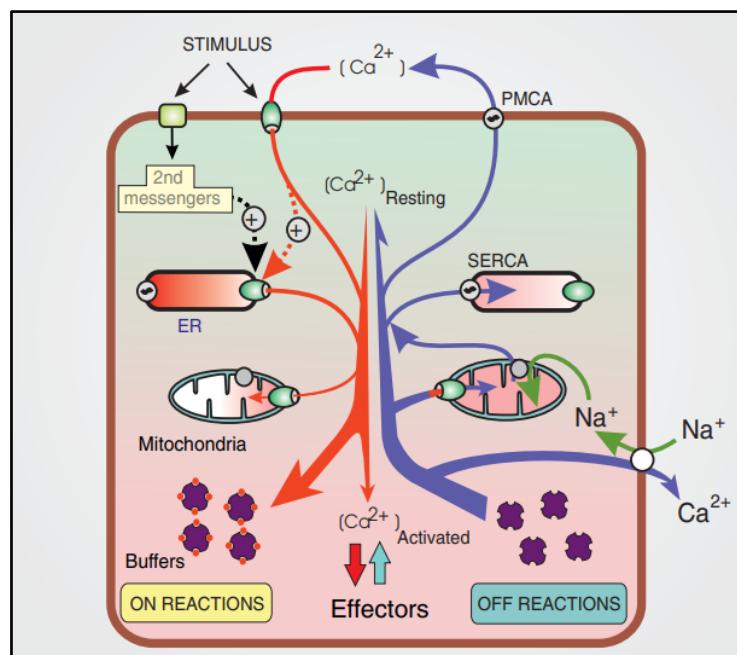


Figura 2. Dinámica de la señalización del Ca^{2+} . La dinámica de la señalización del Ca^{2+} está regulada por la interacción entre las reacciones de activación (ON) y de desactivación (OFF) que controlan el influjo y salida de Ca^{2+} del citosol. Los estímulos externos activan la entrada de Ca^{2+} al citosol (ON REACTIONS) a través de canales en la membrana plasmática y de la membrana de orgánulos que actúan como reservorios intracelulares de Ca^{2+} , tales como el retículo endoplasmático o las mitocondrias. Por otro lado, mediante la combinación de bombas y transportadores de Ca^{2+} se recupera la concentración basal de Ca^{2+} (OFF REACTIONS). Cuando las células están en reposo, estas reacciones OFF mantienen baja la concentración de Ca^{2+} pero se ven temporalmente desbordadas cuando estímulos externos activan las reacciones ON. De este modo, la activación secuencial de las reacciones ON y OFF da lugar a incrementos

transitorios del nivel de Ca^{2+} , rasgo característico de los sistemas de señalización de Ca^{2+} . PMCA, Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática; SERCA, Ca^{2+} -ATPasa del retículo (sarco)endoplásmico. Fuente de la imagen (Berridge, 2012).

1.2. Señalización intracelular mediada por Ca^{2+}

La señalización intracelular mediada por Ca^{2+} puede desencadenarse a partir de la unión de ligandos a receptores, pero también como respuesta a estímulos mecánicos y segundos mensajeros, como es el caso de la despolarización de la membrana plasmática en los canales operados por voltaje o la activación regulada por ácido araquidónico en los canales ARC (*arachidonic acid-regulated Ca^{2+}*) (Catterall, 1998; Shuttleworth, 1996).

La ruta de los fosfoinositoles constituye una de las vías más comunes y estudiadas que estimula la señalización por Ca^{2+} . La unión de ligandos a receptores acoplados a la fosfolipasa C (PLC) provoca la activación de ésta, produciéndose la liberación de inositol-1,4,5-trisfosfato (IP_3) y 1,2-diacilglicerol (DAG) a partir de la hidrólisis de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP_2). El DAG queda retenido en la membrana plasmática al ser hidrofóbico, pero el IP_3 difunde por el citosol e interacciona con su receptor (IP_3R) localizado en el retículo endoplasmático (RE), lo que provoca la liberación de Ca^{2+} desde el lumen del RE hacia el citosol (Berridge, 2005; Streb et al., 1983). Por otro lado, el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el entorno del RE también activa a IP_3R mediante un mecanismo conocido como liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR, *calcium-induced calcium release*). Como respuesta, se activan IP_3R y también otros receptores vecinos como RyR, induciendo la salida de Ca^{2+} al citosol. En respuesta, el incremento del Ca^{2+} libre citosólico modula la activación de varios procesos celulares dependientes de Ca^{2+} , pero la depleción de los niveles de Ca^{2+} en el RE no puede sostenerse en el tiempo. Por ello, la depleción del RE activa vías de entrada de Ca^{2+} extracelular, como pueden ser la operada por depósitos extracelulares (SOCE, *store-operated calcium entry*) o la efectuada por los transportadores TRPC, lo que permite el posterior relleno de los depósitos intracelulares a través de la SERCA (Lewis, 2007). La coordinación entre los diferentes transportadores y bombas que modulan la señalización por Ca^{2+} a partir de la ruta de inositoles se representa en la figura 3.

Introducción

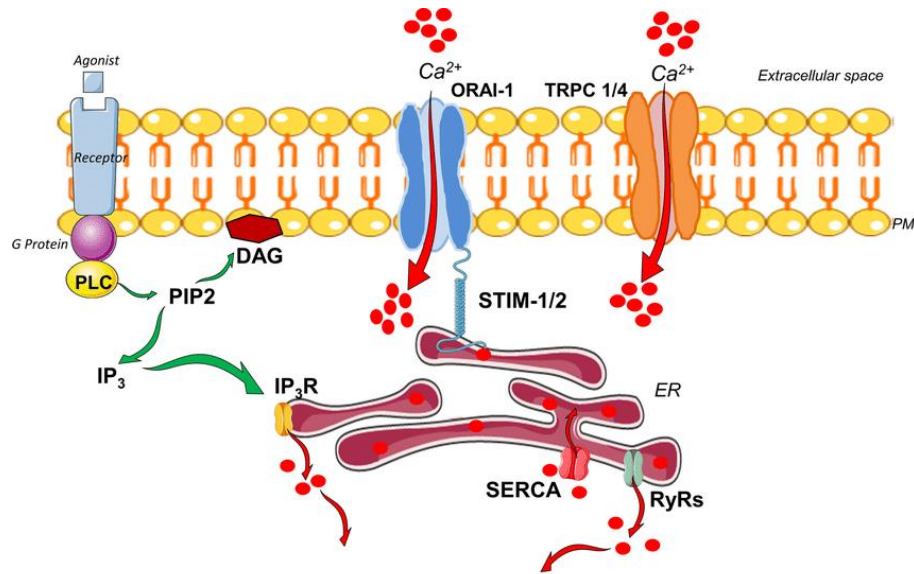


Figura 3. Vaciado de depósitos de Ca^{2+} inducido por la activación de los receptores IP_3 . La unión de un agonista activa receptores de la membrana plasmática asociados a proteínas G-triméricas. Como consecuencia, la subunidad α de la proteína G se disocia y activa a la fosfolipasa C (PLC), la cual cataliza la hidrólisis de fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) liberando diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3). El IP_3 difunde por el citosol y activa los receptores localizados en la membrana del RE (IP_3R), lo que produce el vaciado transitorio de los depósitos de Ca^{2+} al citosol. En la figura también se representa el vaciado de Ca^{2+} inducido por el incremento de Ca^{2+} en el entorno próximo a los receptores IP_3R y RyR, provocando la liberación de Ca^{2+} del RE al citosol. La restauración del nivel basal de Ca^{2+} libre citosólico y el relleno de los depósitos intracelulares se lleva a cabo mediante bombas como la SERCA en coordinación con mecanismos de entrada de Ca^{2+} extracelular a través de SOCE (ORAI1-STIM) y TRPC. Fuente de la imagen (Stanzione et al., 2022).

2. Entrada de Ca^{2+} operada por el vaciado de depósitos intracelulares (SOCE)

Tal y como se ha mencionado previamente, la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos (SOCE) es un sistema de influjo de Ca^{2+} desde el medio extracelular que regula la señalización mediada por este catión en el citosol y la restauración de los niveles de Ca^{2+} en el lumen del RE a través de la bomba SERCA. Es un mecanismo ubicuo y está presente tanto en células excitables como no excitables (Smyth et al., 2010). Este mecanismo está constituido por un sistema de canales localizados en la membrana plasmática denominados SOCs, canales operados por depósitos, y fue descrito por primera vez por James Putney en 1986 (Putney, 1986). Sin embargo, no fue hasta dos décadas después cuando se identificaron las dos principales proteínas que constituyen el mecanismo molecular por el cual opera esta vía de entrada de Ca^{2+} : STIM1 (*Stromal Interaction Molecule 1*) y ORAI1 (Liou et al., 2005; Roos et al., 2005; Soboloff et al., 2006). Por un lado, STIM1 actúa regulando SOCE gracias a su capacidad de transmitir la señal de vaciado de depósitos en el RE tras detectar una disminución en los niveles de Ca^{2+} intraluminal. Por su parte, ORAI1 es una proteína localizada en la membrana plasmática

con cuatro dominios transmembranales que constituye el canal CRAC (I_{CRAC} , corriente de Ca^{2+} activada por liberación de Ca^{2+}), necesario para la activación de SOCE (Soboloff et al., 2006; Vig, Peinelt, et al., 2006; Zhang et al., 2006). CRAC constituye una vía primaria de entrada de Ca^{2+} en las células no excitables, por lo que la corriente de Ca^{2+} que se genera es muy selectiva a este catión y no está influida por el potencial de membrana plasmática. El papel mediador de ORAI1 en SOCE y la generación de la corriente CRAC se descubrió en estudios de pacientes afectados del síndrome de inmunodeficiencia severa combinada (SCID), donde se identificó ORAI1 como la subunidad formadora del poro del canal CRAC gracias a la mutación R91W, responsable de la ausencia de la corriente CRAC (Feske et al., 2006).

2.1. Mecanismo de activación de los canales SOCs

El mecanismo que conecta los niveles de Ca^{2+} citosólicos con la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática está mediado por STIM1 (*Stromal Interaction Molecule 1*), una proteína transmembranal localizada principalmente en el RE que actúa como sensor de Ca^{2+} mediante su dominio EF-hand. La familia de proteínas STIM comprende dos productos génicos, STIM1 y STIM2 (Soboloff et al., 2012), ambas proteínas transmembranales con una región N-terminal que incluye el dominio sensor de Ca^{2+} localizado en el lumen del RE y una región C-terminal localizada en el citosol (Liou et al., 2005; Roos et al., 2005).

Tras la depleción del RE, el Ca^{2+} intraluminal se disocia del dominio EF-hand, lo que induce un cambio conformacional de STIM1, de un estado plegado (en reposo) a una conformación extendida como respuesta a su activación. Tras activarse, STIM1 oligomeriza y se transloca a zonas próximas de la membrana plasmática donde forma yuxtaposiciones RE-MP (Muik et al., 2008). La interacción directa a través de su dominio SOAR (*STIM1-ORAI1 activating region*) activa a ORAI1 e induce su apertura y la entrada de Ca^{2+} activada por el vaciado de depósitos intracelulares, SOCE (figura 4) (Luik et al., 2006; Wu et al., 2006).

Introducción

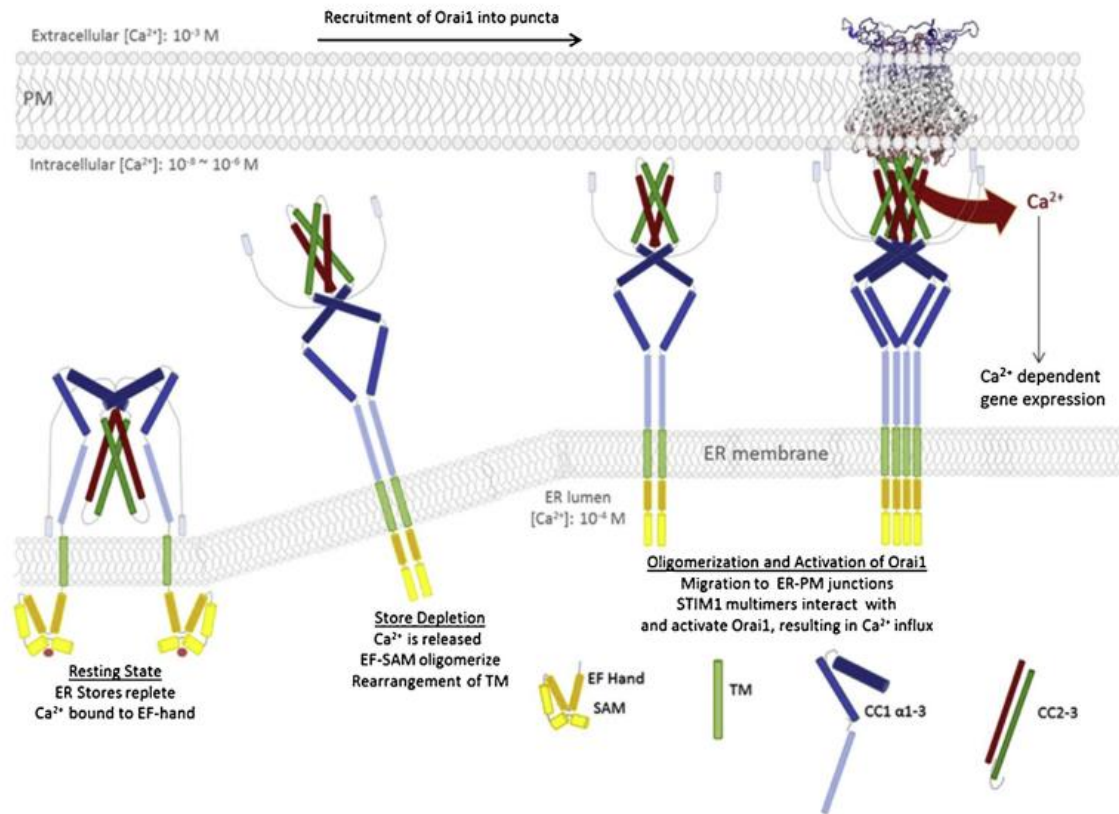


Figura 4. Modelo del proceso de activación de SOCE regulado por STIM1. La región intraluminal de STIM1 contiene un dominio de manos EF de unión a Ca^{2+} (en naranja) y un dominio SAM (en amarillo). La región citosólica de STIM1 incluye un dominio *coiled-coil* (CC1) (en azul), una región mínima de activación de ORAI1 (SOAR o CAD) y una región rica en residuos básicos (K). En estado de reposo el dominio EF-SAM de STIM1 está unido al Ca^{2+} luminal y permanece en forma de monómero. Por otro lado, su dominio citosólico se mantiene plegado e inactivo debido a la interacción entre CC1 y SOAR. Tras el vaciado de los depósitos de Ca^{2+} se produce la disociación de Ca^{2+} del dominio EF-SAM, lo que provoca la activación de STIM1. Como consecuencia, se produce la interacción de varias moléculas de STIM1 a través de los dominios TM y EF-SAM y una reorganización de la porción citosólica de STIM1 que propaga la señal hasta la región citosólica. La proteína adopta una conformación extendida que expone el dominio SOAR/CAD y la región polibásica. Además, STIM1 multimeriza y migra a yuxtaposiciones de RE-MP, donde se activan los canales ORAI1. Fuente de la imagen (Lunz et al., 2019).

Además de los canales ORAI, algunos miembros de la familia de canales TRPC pueden actuar de manera dependiente de STIM1 activando CRAC. Así, se ha descrito que STIM1 activa directamente a los canales TRPC1, TRPC4, TRPC5, que actuarían como canales SOC, e indirectamente a TRPC3 y TRPC6 mediante una heteromultimerización con TRPC1 y TRPC4, respectivamente (Yuan et al., 2009). Sin embargo, la apertura de los canales ORAI y TRPC regulada por STIM1 también es diferente. La activación del canal ORAI1 por STIM1 se produce por la interacción directa entre ambas proteínas a través de la región de activación STIM1-ORAI1, la ya mencionada región SOAR o CAD (*CRAC activation domain*). En cambio, la unión a TRPC1 tiene lugar a través del extremo C-terminal de STIM1, que contiene una zona polibásica que induce la activación del canal SOC mediante un mecanismo de interacción electrostática con el canal (Park et al., 2009; Yuan et al., 2009).

3. Canales ORAI

Las proteínas ORAI pertenecen a los canales CRAC (*calcium release-activated calcium channels*) y constituyen una familia de canales selectivos para la entrada de Ca^{2+} que se encuentran localizados en MP. Esta familia incluye a tres miembros homólogos, denominados ORAI1, ORAI2 y ORAI3 (Feske et al., 2006; Vig, Peinelt, et al., 2006). Se ha descrito la participación de estos canales de Ca^{2+} en diferentes procesos fisiológicos y celulares, como migración, secreción y expresión génica (Prakriya & Lewis, 2015). Aunque las tres proteínas homólogas pueden ser activadas por STIM1 para formar canales SOCs (DeHaven et al., 2007; Lis et al., 2007; Zhang et al., 2008), ORAI1 es la mejor caracterizada en relación a su papel en la activación de SOCE y en la generación de la corriente CRAC (Feske et al., 2006; Feske et al., 2005).

3.1. Estructura molecular y dominios de los canales ORAI1

El canal funcional ORAI está constituido por hexámeros, según determinaron estudios de cristalografía del canal en el modelo *Drosophila melanogaster*, dOrai. A su vez, cada monómero de ORAI contiene cuatro segmentos transmembranales (TM1-TM4) unidos mediante lazos, uno intracelular y dos extracelulares, y los extremos N-terminal y C-terminal orientados hacia el citosol (Mignen et al., 2008; Penna et al., 2008). Las diferencias estructurales más significativas entre las proteínas homólogas se encuentran en el segundo lazo extracelular, mayor en el caso de ORAI3, y en el C-terminal (Shuttleworth, 2012). Respecto a su función, se ha observado SOCE en las tres isoformas cuando se coexpresan con STIM1 (Gross et al., 2007; Gwack et al., 2007; Lis et al., 2007). Sin embargo, ORAI1 es la isoforma predominante que media SOCE en la mayoría de las células y es la proteína de canal CRAC mejor estudiada, lo que requiere un estudio y caracterización más exhaustivo de las proteínas ORAI2 y ORAI3 para comprender en profundidad su función y regulación. La principal diferencia entre ellas se encuentra en la longitud del lazo de unión entre los dominios transmembranales 3 y 4 (S3-S4), más largo en el caso de ORAI3 y con la presencia de un sitio de glicosilación en el dominio S3-S4 en ORAI1 (Cai, 2007; Gwack et al., 2007).

ORAI1, también conocido como CRACM1 (*calcium release-activated calcium modulator 1*), es una proteína de 33 kDa, compuesta por 301 aminoácidos, cuyos dominios transmembranales (TM) se encuentran conservados en las distintas proteínas de la familia ORAI. En el dominio TM1, por ejemplo, se encuentra la región que constituye el poro del canal (Lewis, 2007; McNally et al., 2012; Putney, 2009) (figura 5). En cambio, los lazos extracelulares e intracelulares están menos conservados, exceptuando el segmento que participa en la unión a STIM1 (Hogan & Rao, 2015).

Además de la activación del canal dependiente de STIM1, los canales CRAC poseen una región de inactivación dependiente de Ca^{2+} (CDI) necesaria para volver al estado de reposo. Esta región se encuentra en el extremo N-terminal y el lazo intracelular (Mullins et al., 2009; Srikanth et al., 2010). De manera más concreta, se ha identificado que un péptido ($^{153}\text{NVHNL}^{157}$) del lazo intracelular está implicado en el bloqueo de la corriente CRAC generada en el canal ORAI1 (Srikanth et al., 2010). Por otra parte, la CDI está mediada por la interacción entre residuos de STIM1 del dominio citosólico (ID, *inhibitory domain*) y residuos del N-terminal de ORAI1 (Derler et al., 2009; Lee et al., 2009; Mullins et al., 2009), siendo la calmodulina (CaM) uno de los mediadores de este mecanismo a través de su interacción directa con ORAI1 (Litjens et al., 2004). Adicionalmente, Lee y cols. describieron la regulación de la inactivación por residuos de glutamato en el C-terminal de ORAI; sin embargo, esta inactivación es comparativamente más rápida en ORAI2 y ORAI3 que en ORAI1, siendo menor su relevancia en esta isoforma de la proteína (Lee et al., 2009).

3.1.2. Selectividad del canal por Ca^{2+} : dominios transmembranales TM1, TM3 y lazo extracelular

Los residuos con carga negativa presentes en la hélice C-terminal, así como aquellos presentes en el poro del canal son los responsables de la selectividad del canal al ion Ca^{2+} . Los residuos ácidos de glutamato en las posiciones 106 y 190 (TM1 y TM3) y de aspartato en las posiciones 110, 112 y 114 (región de unión entre TM1 y TM2) confieren al canal la selectividad por Ca^{2+} , de manera que mutaciones en estos residuos provocan un aumento en la permeabilidad a Ca^{2+} (Prakriya et al., 2006; Vig, Peinelt, et al., 2006; Yeromin et al., 2006).

En concreto, la región 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). En el canal funcional, formado por un hexámero, cada monómero se dispone alrededor de un eje central, en el que el TM1 de cada subunidad forma el anillo interior del poro, mientras que los tres TM restantes se disponen en anillos concéntricos alrededor del poro conductor de iones. Se ha descrito, por ejemplo, que la mutación R91W en ORAI1 causa inmunodeficiencia severa por la pérdida del influjo de Ca^{2+} en células T y su incapacidad para ser activados (Feske et al., 2006).

3.2. Mutaciones de ORAI1 relacionadas con ganancia o pérdida de función

En relación con las regiones de ORAI1 implicadas en la interacción y activación del canal CRAC por STIM1, McNally y cols. llevaron a cabo ensayos en células que expresaban mutaciones de ORAI1 en sitios de unión a STIM1, lo que permitió evaluar su participación en la generación de CRAC dependiente de STIM1. En este sentido, tanto las deleciones de ORAI1- Δ 73-85 y ORAI1- Δ 272-279, como las mutaciones simples en los

Introducción

residuos K85A, K85E, L276D y L273S, inhibieron la activación del canal (figura 6) (McNally et al., 2013).

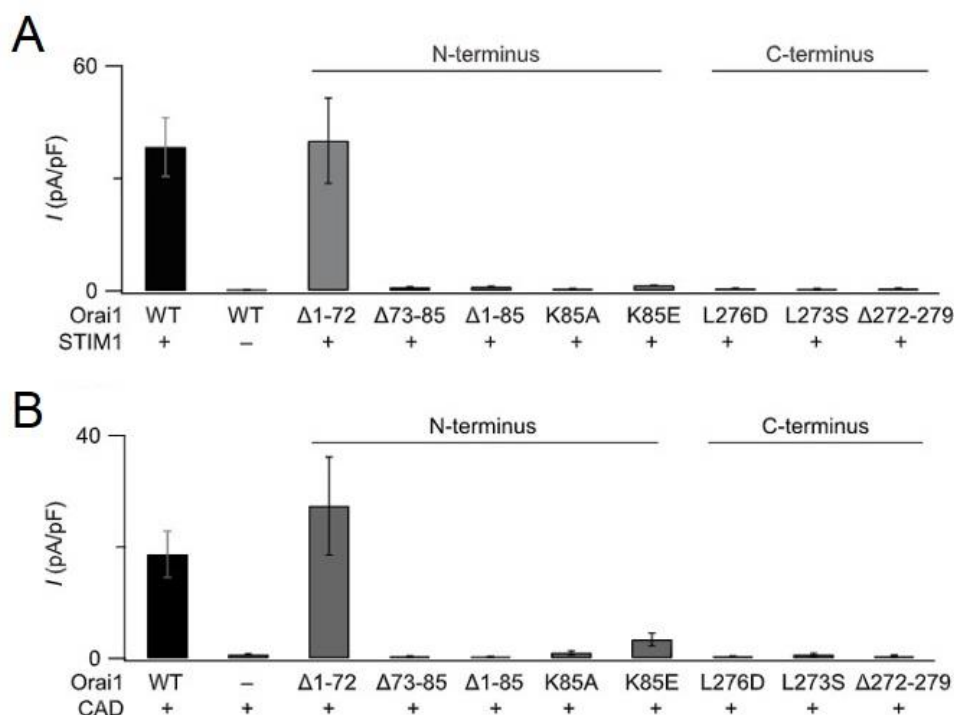


Figura 6. Mutaciones de ORAI1 en sitios de unión a STIM1 que inhiben la activación del canal. En la gráfica se representan los picos de amplitud de corriente [I (pA/pF)] medidos en pulsos de -100mV. En cada condición, ORAI1 se coexpresó con STIM1 (panel A) o con el dominio CAD de STIM1 (panel B) en células HEK293, y la I_{CRAC} se activó mediante el vaciado de los depósitos de Ca^{2+} del RE con tapsigargina (Tg) 1 μ M durante 2 minutos antes del registro electrofisiológico. Cada barra muestra la media \pm SEM de 5-8 células (panel A) y de 5-6 células (panel B). Fuente de la imagen (McNally et al., 2013).

De tales resultados se derivó que mutaciones en residuos del C-terminal (L273, L276) que juegan un papel esencial en el acoplamiento de STIM1 y el acoplamiento y la dimerización del C-terminal de ORAI1 dentro del complejo hexamérico del canal inhiben la activación de ORAI1; es decir, serían mutaciones de pérdida de función. También se han descrito mutaciones que provocan la ganancia de función (GOF, *Gain of function*), como P245L, asociada al desarrollo del síndrome de Stormorken (Bulla et al., 2019) o R91W, asociada al desarrollo de inmunodeficiencia combinada severa (SCID) (Thompson et al., 2009). También existen mutaciones funcionales en residuos que confieren la selectividad de Ca^{2+} al poro del canal, encontrando por ejemplo el canal constitutivamente inactivo al mutar el glutamato 106 a alanina (Yeromin et al., 2006) o el canal activo constitutivamente al mutar la valina 102 a cisteína (Dong et al., 2013; McNally et al., 2012). En la tabla I se recogen los principales mutantes funcionales para ORAI1, así como su localización y su implicación en el desarrollo de patologías.

Mutación	Región	Efecto sobre ORAI1	Patología
R91W	TM1	Constitutivamente abierto	SCID
V102C		Constitutivamente abierto	
E106A		Constitutivamente inactivo	
D110A, D112A, D114A	CAR	Acumulación de Ca ²⁺	
P245L	TM4	Constitutivamente abierto	TAM, síndrome de Stormorken
LVSHK 261-265 ANSGA	TM4 ext	Constitutivamente abierto	
L273D/S	C-terminal	Abolición/reducción de la interacción con STIM1	
L276D/S		Abolición/reducción de la interacción con STIM1	

Tabla I. Mutantes funcionales de ORAI1. En la tabla se recogen diferentes mutaciones de residuos de ORAI1, así como su localización y el efecto funcional de la mutación en la actividad del canal y su unión a la proteína reguladora de SOCE, STIM1.

En esta tabla se marcan los mutantes ORAI1-V102C (canal constitutivamente abierto) y ORAI1-E106A (canal constitutivamente inactivo) por ser mutantes que se utilizarán durante el desarrollo de este trabajo.

3.3. Modificaciones postraduccionales de ORAI1

Con respecto a las modificaciones postraduccionales (PTMs, *post-translational modifications*) descritas en ORAI1, hasta la fecha las más destacables son la fosforilación y la glicosilación.

Introducción

3.3.1. Fosforilación

La fosforilación es una modificación postraduccional reversible que puede desempeñar un papel regulador en multitud de procesos celulares (Cohen, 2000). Esta modificación postraduccional es llevada a cabo por quinasas, enzimas que catalizan la transferencia de un grupo fosfato desde el ATP a la molécula de interés. Existen tres tipos de quinasas: las serina/treonina quinasas, las tirosina quinasas y las de doble especificidad en función de los residuos que fosforilen (Lin et al., 2010; Manning, Plowman, et al., 2002).

Respecto a la fosforilación de ORAI1, Kawasaki y cols. describieron mediante ensayos de quinasas *in vitro* que ORAI1 contiene sitios para la fosforilación por parte de la proteína quinasa C (PKC) y observaron que ORAI1 es fosforilada por la subunidad PKC β en los residuos Ser27 y Ser30 del extremo N-terminal (figura 7), provocando esta fosforilación la inhibición de SOCE (Kawasaki et al., 2010). Estudios posteriores describieron que la fosforilación sostenida de ORAI1 en las Ser27 y Ser30 provoca una supresión constitutiva de la actividad de ORAI1 en el melanoma invasivo (Hooper et al., 2015).

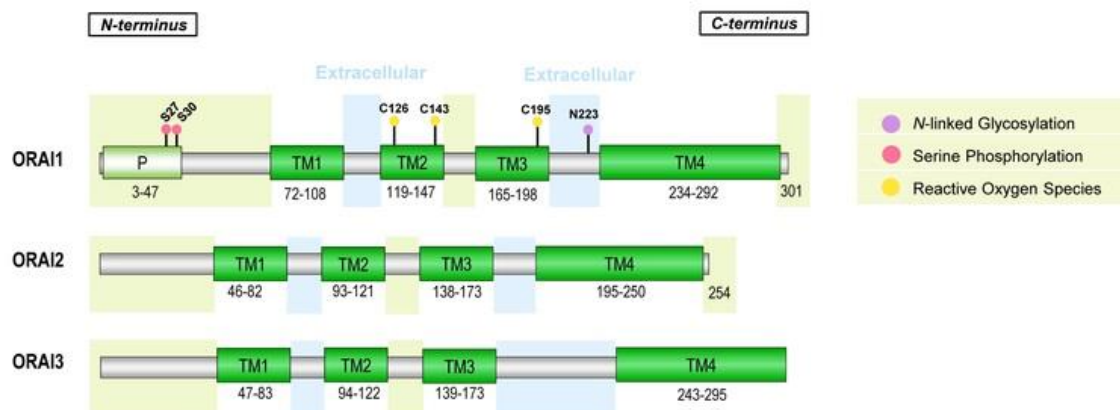


Figura 7. Arquitectura de los dominios de ORAI1-3 y sus modificaciones postraduccionales. ORAI1 (301 aminoácidos), ORAI2 (254 aminoácidos) y ORAI3 (295 aminoácidos) presentan 4 dominios transmembrana (en verde), dos lazos extracelulares que comunican los dominios TM1-TM2 y TM3-TM4 (en azul) y un lazo intracelular entre los dominios TM2-TM3, con los extremos N y C citosólicos. ORAI1 presenta dos sitios de fosforilación en las serinas, S27 y S30, así como una asparagina, N223, susceptible de glicosilación. Las cisteínas C126, C143 y C195 de ORAI1 son dianas de H₂O₂ y de la modulación por ROS (*Reactive Oxygen Species*). No hay descritas modificaciones postraduccionales para ORAI2 y ORAI3. Fuente de la imagen (Johnson et al., 2022).

Teniendo en cuenta la localización de estos residuos, los autores sugirieron que esta fosforilación podría afectar a la interacción con STIM1 y la regulación de la apertura del canal. Sin embargo, puesto que se conoce que la delección de los aminoácidos 1-72 no afecta ni atenúa la actividad de ORAI1 en la generación de corrientes CRAC (McNally et al., 2013), lo más probable es que los residuos Ser27 y Ser30 sólo desempeñen una

función principalmente reguladora a través de su fosforilación pero no completamente determinante en la activación del canal. Por otra parte, también se han descrito sitios de fosforilación para la proteína quinasa A (PKA). En concreto, la Ser34 de ORAI1 es un sitio de la fosforilación mediada por la PKA, modificación que desencadena la inactivación rápida dependiente de Ca^{2+} (CDI) de los canales ORAI1 y, consecuentemente, una menor interacción entre STIM1 y ORAI1, disminuyendo los niveles de SOCE (Zhang et al., 2019).

3.3.2. Glicosilación

Otra de las PTMs observadas en ORAI1 ha sido la glicosilación, la cual consiste en la unión covalente de un oligosacárido a determinados residuos de una proteína diana y que es habitual en el retículo endoplásmico (RE), el aparato de Golgi, el citoplasma o, menos frecuentemente, en el núcleo y las mitocondrias de las células eucariotas (Akella et al., 2019; Eichler, 2019). A través de esta modificación postraduccional se controla, entre otras funciones, la regulación, la estabilidad y la localización subcelular de las proteínas (Hart et al., 2007). Las dos principales formas de glicosilación son la glicosilación ligada a un átomo de nitrógeno y la glicosilación ligada a un átomo de oxígeno (Eichler, 2019). En la glicosilación ligada a N, el oligosacárido se une a la amina de los residuos de asparagina; generalmente ocurre en la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. La glicosilación ligada a O se produce cuando un oligosacárido se une al grupo hidroxilo de la serina o la treonina.

En lo que respecta a ORAI1, se ha descrito la presencia de un sitio de glicosilación ligado a N en la Asn223 (o bien N223) de ORAI1 (figura 7), pero hasta la fecha aún no se conoce ninguno para ORAI2 y ORAI3 (Gwack et al., 2007; Niemeyer, 2016). En función del tipo celular, puede variar el papel funcional que desempeña esta modificación postraduccional en ORAI1. Así, por ejemplo, no se han observado diferencias en la función ni en la localización en células HEK293 al mutar el residuo 223 a alanina (Kilch et al., 2013). En cambio, sí se han visto cambios en fibroblastos y células T-Jurkat, donde la expresión de ORAI1-N223A potenció SOCE, lo que indicaría que la glicosilación atenúa la función de la proteína ORAI1 en estos tipos celulares (Gwack et al., 2007; Kappel et al., 2019). Aunque las razones de estas diferencias no se han podido explicar en detalle, una de las hipótesis que se barajan es la vinculación específica de la glicosilación al tipo de célula en función del momento de incorporación del ácido siálico terminal (Dörr et al., 2016; Niemeyer, 2016). Además, también se ha observado que la alteración de la glicosilación en ORAI1 afecta al envejecimiento, cáncer y las enfermedades inmunitarias (Dörr et al., 2016; Kappel et al., 2019). Por ejemplo, un incremento en la enzima β -galactósido α -2,6-sialiltransferasa 1 (ST6GAL1), la cual glicosila a ORAI1 y reduce SOCE debido a la unión de ácidos siálicos α -2,6, se ha vinculado a una mayor invasividad y propagación metastásica (Kappel et al., 2019). La desulfatación de ORAI1 conduce a un

Introducción

incremento de la entrada de Ca^{2+} mediada por ORAI1 y a la desregulación de Siglec-8, lectinas de tipo inmunoglobulina de unión a ácido siálico que participan en el desarrollo de patologías asociadas a mastocitos y eosinófilos (Dörr et al., 2016; Kappel et al., 2019). En lo que respecta a la O-glicosilación, hasta la fecha no se ha descrito ninguna en ORAI1.

3.3.3. Modulación redox mediante la oxidación de cisteínas

En concentraciones bajas, las especies reactivas de oxígeno (ROS) derivadas del metabolismo de oxígeno molecular pueden actuar como segundos mensajeros en procesos fisiológicos y celulares a través de modificaciones postraduccionales. Debido a la alta reactividad de los residuos de cisteína en las proteínas, éstos pueden ser diana de las ROS. ORAI1 contiene tres cisteínas (C126, C143 y C195) que son susceptibles de ser moduladas por ROS al ser dianas de H_2O_2 (Bogeski & Niemeyer, 2014; Niemeyer, 2017). Por su parte, ORAI2 contiene tres cisteínas en sitios homólogos, mientras que ORAI3 no contiene el tercer sitio homólogo en C195, sino dos cisteínas adicionales entre los segmentos T3 y T4 (Nunes & Demaurex, 2014). En ORAI1, la oxidación de la C195 por H_2O_2 provoca la inhibición de SOCE en células de músculo liso vascular, células HEK293 y células T Jurkat, mientras que en células T CD4^+ también se observó la inhibición de SOCE en respuesta a la modulación redox en el sitio homólogo C195 de ORAI2 (Ben-Kasus Nissim et al., 2017; Bogeski et al., 2010).

4. Migración

La migración celular desempeña un papel central en una amplia variedad de fenómenos biológicos. En la embriogénesis, la migración celular participa en todos los procesos morfogénéticos que van desde la gastrulación hasta el desarrollo del sistema nervioso (Reig et al., 2014). Ya en el organismo adulto la migración sigue jugando un papel esencial, tanto en procesos fisiológicos normales como en el desarrollo de diversas patologías, como el cáncer o las enfermedades cardiovasculares (Friedl & Wolf, 2003; Friedl et al., 1998). En la metástasis, las células tumorales migran de la masa tumoral inicial al torrente sanguíneo para establecerse en otras áreas. En los últimos años, gracias al auge de la ingeniería tisular, se ha potenciado su estudio en aplicaciones tecnológicas debido al papel que desempeña en el andamiaje de biomateriales.

4.1. La mecánica celular y molecular de la migración

Para entender la mecánica del proceso migratorio es necesario conocer cómo se integran los agentes moleculares que operan conjuntamente promoviendo la migración. La migración celular es un proceso fisicoquímico que está coordinado tanto espacial como temporalmente en la célula. El movimiento celular se produce a través de seis etapas interdependientes que pueden solaparse en el tiempo, distinguiéndose una

primera etapa donde la célula se polariza, seguida de otra donde se generan protrusiones de membrana principalmente en el frente de avance polarizado y un ciclo posterior de migración.

I. Polarización de la célula

Las células se polarizan en respuesta a agentes promotores de la migración. Como consecuencia, se va a establecer un frente de migración o de avance que en adelante marcará la dirección del movimiento celular y un extremo posterior, también denominado eje de retracción (Lauffenburger & Horwitz, 1996).

Además de la distribución celular asimétrica, también tiene lugar una polarización a nivel molecular a través de la generación de gradientes de pequeñas moléculas entre el frente de migración y el polo posterior de la célula. Un ejemplo es el tráfico vesicular direccionado desde el aparato de Golgi hacia el frente de avance y reorganización del citoesqueleto. Es decir, la polarización celular está modulada por una serie de señales bioquímicas y biofísicas que se presentan espacial y temporalmente, las cuales pueden ser tanto intracelulares como extracelulares (Friedl et al., 1998; Lauffenburger & Horwitz, 1996). Entre las vías de señalización que participan en la polarización celular se encuentran GTPasas de la familia RHO, PI3Ks, PTEN (*phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate 3-phosphatase*), integrinas, microtúbulos y transporte de vesículas.

II. Protrusiones de membrana y *ruffling* de membrana

En respuesta a la acción de los diferentes agentes que promueven la migración se desencadenan varias rutas de señalización, como la activación de las proteínas G acopladas a receptores tirosina quinasa, la estimulación de GEFs (factor intercambiador de guanina) mediada por CDC42 y la activación de RAC1, a través de las cuales se regula la reorganización del citoesqueleto cortical de actina (Hall, 1998; Ridley, 2001). Como consecuencia, se generan una serie de prolongaciones transitorias de la membrana celular que se desarrollan principalmente en la zona de avance o eje anterior de la célula polarizada, también denominado frente de migración. El proceso de emisión de las estructuras mencionadas se conoce como *ruffling* (u ondulaciones) de membrana y son principalmente de dos tipos, lamelipodios y filopodios (Ridley, 2001). Ambos se forman por la polimerización de la actina cortical aunque difieren en su organización, siendo los lamelipodios proyecciones de la membrana plasmática que pueden extenderse en largos haces en un mismo sentido (Small et al., 2002), mientras que los filopodios presentan una morfología más cilíndrica y estrellada. La proyección de filopodios y lamelipodios se debe a una polimerización de la actina cortical y para su estabilización es necesaria la adhesión a la matriz extracelular o a otras células a través de receptores de

Introducción

adhesión ligados al citoesqueleto de actina. Además, existen otras protrusiones que también participan en migración, como los invadopodios y las protuberancias irregulares, conocidas como *blebs* (figura 8).

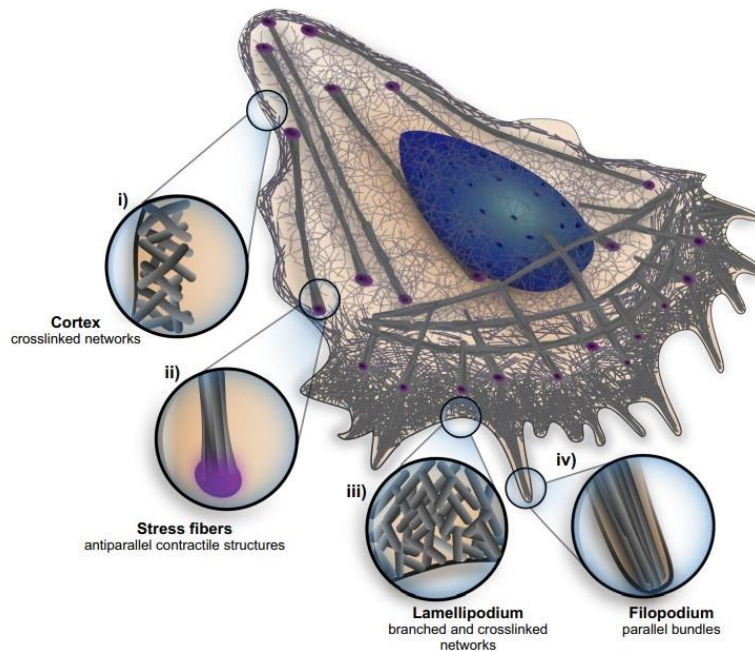


Figura 8. Arquitectura del citoesqueleto de actina. En la imagen se representa una célula con los diferentes componentes que forman el citoesqueleto de actina: i) Córtez; ii) Fibras de estrés, las cuales son estructuras contráctiles antiparalelas; iii) Lamelipodios, constituidos por la polimerización de fibras de actina entrecruzadas; iv) Filopodios, *bundles* paralelos. Fuente de la imagen (Blanchoin et al., 2014).

III. Ciclo de migración celular

Una vez se ha polarizado la célula y se han formado las protrusiones, se establece un frente de avance que marca la dirección del movimiento. Para definir cómo se mueven las células en dirección a diversas señales es fundamental comprender los fundamentos de la migración celular, siendo uno de los modelos más estandarizados sobre superficies bidimensionales el propuesto por Michael Abercrombie. El ciclo de migración tiene lugar a través de cuatro pasos que coordinan espacial y temporalmente las fuerzas del citoesqueleto de actina y miosina con la adhesión extracelular, posibilitando así la migración de la célula.

En la figura 9 se muestra esquematizado el ciclo de migración en células mesenquimales, observándose en la etapa inicial la extensión de protrusiones de membrana, especialmente lamelipodios y filopodios, que determinan la dirección del movimiento celular en respuesta a la polarización celular. A continuación, la célula genera adhesiones focales que permitan anclar las protrusiones al sustrato, lo que da lugar a contactos focales altamente dinámicos que se ensamblan y desensamblan a lo largo del proceso de migración. La tracción del citoesqueleto

tiene lugar mediante un mecanismo contráctil basado en un sistema de fibras de tensión y contracción de actina y miosina. De este modo, las adhesiones se conectan a la maquinaria contráctil y el cuerpo de la célula avanza como resultado de la combinación de las fuerzas de tracción hacia adelante y las de retracción hacia atrás (Giannone et al., 2004; Giannone et al., 2007). Es decir, mediante ciclos de extensión y retracción el lamelipodio actúa como enlace mecánico que conecta las fibras de actina que polimerizan en el eje anterior de la célula con las fibras motoras de miosina del eje posterior. Por último, los antiguos puntos de adhesión se desprenden del sustrato o se disuelven del polo de retracción posterior (Mattila & Lappalainen, 2008).

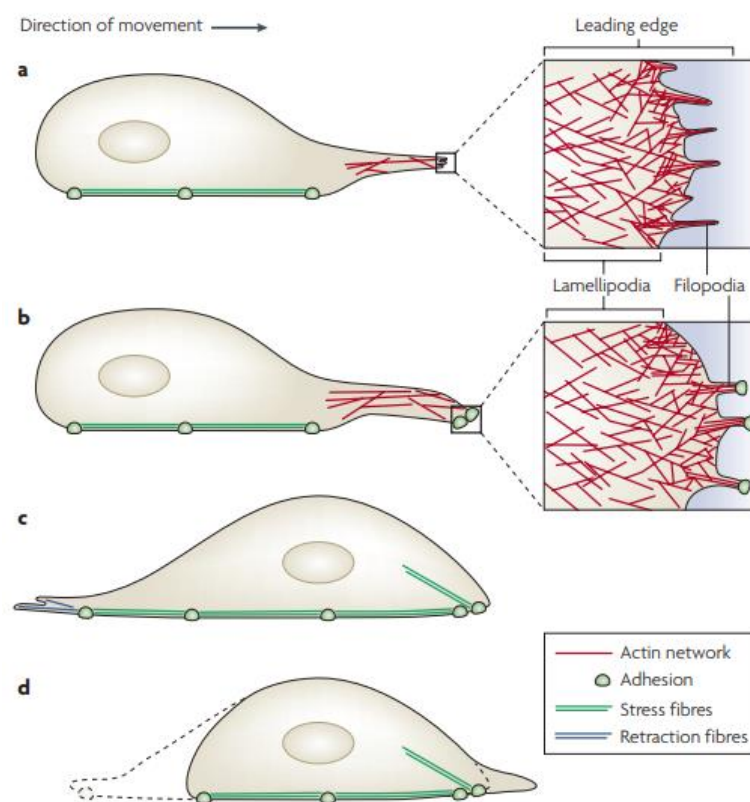


Figura 9. Ciclo de migración celular en células mesenquimales. a) La motilidad se inicia por protrusiones dependientes de actina en el frente de migración, el cual se compone de lamelipodios y filopodios. Estas estructuras protrusivas contienen filamentos de actina con extremos alargados en forma de púa orientados hacia la membrana plasmática. b) Durante la extensión celular se forman nuevas adhesiones con el sustrato bajo el frente de migración. c) A continuación, el núcleo y el cuerpo celular se desplazan hacia adelante mediante fuerzas de contracción basadas en la actomiosina, que pueden estar mediadas por fibras de tensión de adhesión focal, las cuales median también en la adhesión al sustrato. d) Posteriormente, las fibras de retracción tiran de la parte posterior de la célula hacia adelante, lo que provoca que las adhesiones de la parte posterior de la célula se desprendan y el borde posterior se retraiga. Fuente de la imagen (Mattila & Lappalainen, 2008).

Introducción

Los estudios sobre la motilidad celular en sustratos 2D han permitido comprender mejor cómo las características de la superficie, en particular la rigidez del sustrato, afectan a la migración a través de cambios en la organización del citoesqueleto y las fuerzas de tracción aplicadas (Lo et al., 2000). En este sentido, las células que migran sobre superficies bidimensionales (2D) planas utilizan la polimerización de actina para extender el frente de migración de la membrana plasmática durante la migración basada en lamelipodios (Petrie & Yamada, 2012).

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

Uno de los objetivos centrales de esta Tesis Doctoral es estudiar el papel de ORAI1 en el frente de migración. Para que tenga lugar la migración celular se requiere la reorganización del citoesqueleto cortical de actina, la cual se genera gracias a la polarización transitoria de la célula, siendo esencial la entrada de Ca^{2+} extracelular.

La regulación espaciotemporal de Ca^{2+} está implicada en la regulación de la dinámica del citoesqueleto y de las adhesiones focales que controlan la migración celular, de manera que una desregulación en la homeostasis del Ca^{2+} citosólico puede conducir al desarrollo de fenotipos malignos debido a un incremento en el proceso de migración celular (Chen et al., 2013). Durante la migración celular, la organización espacial y temporal de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ proporciona una vía robusta y rápida a través de la cual tiene lugar la activación selectiva de componentes de señalización que tienen un papel esencial en la reorganización del citoesqueleto, las fuerzas de tracción y la dinámica de las adhesiones focales que regulan la migración celular. En este sentido, SOCE, controlada de forma conjunta por ORAI1 y STIM1, constituye en células no excitables una de las vías principales de entrada de Ca^{2+} que participa en la regulación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. De esta forma, se ha descrito que el influjo de Ca^{2+} a través de SOCE regula la migración de células tumorales (Casas-Rua et al., 2015; Chen et al., 2011; Yang et al., 2009) y no tumorales (Bisailon et al., 2010; Che et al., 2015; Schaff et al., 2010). En la última década ha emergido el estudio de STIM1 y ORAI1 como potenciales dianas terapéuticas en tratamiento anti-tumoral, al haberse relacionado una desregulación en los niveles de expresión y funcionalidad de ambas proteínas con una mayor actividad tumorigénica (Fiorio Pla et al., 2016; Vashisht et al., 2015).

En lo que respecta a la activación y localización polarizada de STIM1 en el frente de migración, en 2014 se describió que el gradiente creciente de diacilglicerol en el frente de migración promovía la migración en células endoteliales (Tsai et al., 2014). Por otra parte, se conoce que la señalización iniciada por EGF activa la ruta de la quinasa ERK1/2, que fosforila STIM1 en los residuos de serina 575, 608 y 621 (Pozo-Guisado et al., 2010), y que dicha fosforilación potenciada por EGF estimula la migración celular direccional en células humanas de adenocarcinoma endotelial (Casas-Rua et al., 2015). Por otra parte, en 2017 se observó que el pool de STIM1 fosforilado colocaliza con ORAI1

en el frente de migración (Lopez-Guerrero, Tomas-Martin, et al., 2017). En dicho trabajo también fue descrita la colocalización de ORAI1 con CTTN en células U2OS, HeLa y mioblastos de ratón C2C12.

En este sentido es preciso citar que tanto ORAI1 como STIM1 contribuyen a la tumorigénesis y procesos metastáticos promoviendo la migración celular, no sólo a través de su función canónica activando la entrada de Ca^{2+} por SOCE, como se ha visto en células de adenocarcinoma pancreático y de cáncer de mama (Kondratska et al., 2014; Yang et al., 2009), sino también a partir de mecanismos de señalización independientes del vaciado de depósitos de Ca^{2+} . Con respecto a este último aspecto, se ha descrito la participación de ORAI1 en la tumorigénesis de células de cáncer de mama a través de su interacción con una Ca^{2+} -ATPasa de la vía secretora localizada en el aparato de Golgi, SPCA2 (Feng et al., 2010). Así, el complejo ORAI1-SPCA2 induce el influjo de Ca^{2+} constitutivo e independiente de vaciado de depósitos promoviendo tumorigénesis.

5. Agentes moduladores en la reorganización del citoesqueleto de actina: RAC1, ARP2/3, el complejo regulador de WAVE y cortactina

5.1. RAC1 y las RHO GTPasas como reguladores centrales de la reorganización del citoesqueleto y protrusiones de membrana

Los miembros de la familia de las RHO GTPasas, a la cual pertenece RAC1, operan como reguladores centrales en las cascadas de señalización mediadas por estímulos extracelulares que regulan la organización de actina, así como la progresión del ciclo celular y la expresión génica (Etienne-Manneville & Hall, 2002). Las RHO GTPasas pertenecen a la superfamilia de las RAS GTPasas, de donde toman su nombre debido a su alta homología con las proteínas de la familia RAS (*Ras Homology*, RHO). La superfamilia de las RAS GTPasas, también conocida generalmente como superfamilia de las proteínas G pequeñas, comprende a un grupo de proteínas de unión a GTP de unos 20-30 kDa de tamaño que regulan un amplio espectro de funciones celulares. Toman el nombre de los proto-oncogenes *RAS*, los primeros miembros del grupo de proteínas relacionadas con carcinogénesis que fueron descubiertas a inicios de la década de 1980 (Der et al., 1982; Parada et al., 1982; Santos et al., 1982). Existe una alta frecuencia de mutaciones en los genes *RAS* asociada a un amplio espectro de carcinomas, lo que la convierte en la principal familia de oncogenes mutados en cáncer (19%) (Prior et al., 2020). Esta superfamilia comprende 153 miembros que se distribuyen en cinco familias altamente conservadas en los organismos eucariotas, como puede observarse en la figura 10: *RAS* (*Ras sarcome*), *RHO* (*Ras homology*), *RAB* (*Ras-like proteins in brain*), *ARF* (*ADP-ribosylation factor*) y *RAN* (*Ras-like nuclear*). Todas ellas son proteínas clave en la

Introducción

regulación de diferentes procesos celulares, tales como la diferenciación, la proliferación, el transporte de vesículas y orgánulos, la dinámica nuclear y la regulación del citoesqueleto (Etienne-Manneville & Hall, 2002; Memon, 2004; Takai et al., 2001; Weis, 2003; Zerial & McBride, 2001).

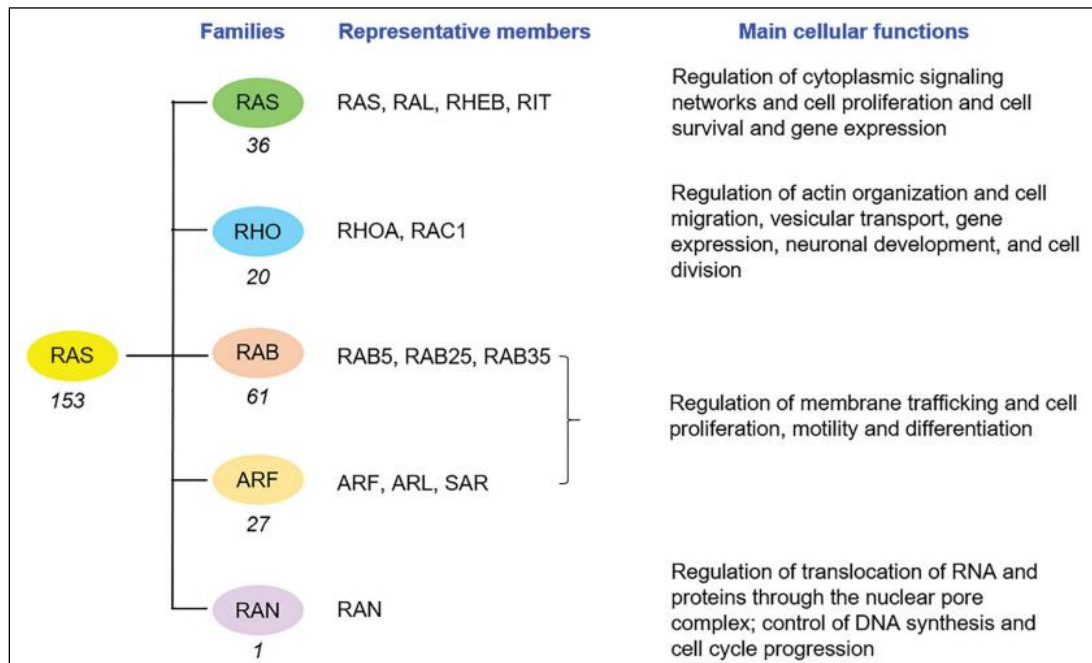


Figura 10. La superfamilia RAS de pequeñas GTPasas. Los 153 miembros de la superfamilia RAS se han clasificado en cinco familias en función de la identificación de secuencias y funciones celulares (Wennerberg et al. 2005; Wittinghofer y Vetter 2011). En el esquema de la figura se muestran algunos de los miembros más representativos de cada familia y sus principales funciones celulares. Fuente de la imagen (Hodge et al., 2020).

Tal y como se indica en la figura 10, las RHO GTPasas regulan la polaridad y la motilidad celular a través de sus efectos sobre el citoesqueleto, el tráfico de membranas y la adhesión celular (Daub et al., 2001; Etienne-Manneville & Hall, 2001, 2002; Van Aelst & D'Souza-Schorey, 1997). Hasta la fecha se han identificado veinte miembros, siendo RAC1, CDC42 y RHOA las proteínas mejor estudiadas y caracterizadas. Dado que estas RHO GTPasas actúan como reguladores centrales en la organización de actina y la formación de protrusiones en el frente de migración de las células, aspecto troncal en esta tesis, procederemos a explicar la regulación y actividad de estas proteínas, con especial atención a RAC1.

5.1.1. Regulación de las RHO GTPasas y transducción de señales

Las RHO GTPasas funcionan como proteínas G monoméricas y modulan la señalización en diversos procesos celulares a través de su multiespecificidad estructural (Biou & Cherfils, 2004), su relocalización subcelular en respuesta a modificaciones

postraduccionales y mediante su unión a proteínas efectoras. Las rutas de señales que activan a las proteínas RHO son muy diversas e incluyen receptores de factores de crecimiento, receptores acoplados a proteínas G e integrinas (Hall, 1998; Hawkins et al., 1995; Price et al., 1998).

Estas GTPasas funcionan como interruptores moleculares binarios, alternando entre un estado inactivo unido a GDP y un estado activo unido a GTP, gracias a un dominio GTPasa (Bourne et al., 1990; Vetter & Wittinghofer, 2001). Este dominio GTPasa, también conocido simplemente como dominio G, lleva a cabo la función básica de unión e hidrólisis de nucleótidos de guanina di/trifosfato (GDP y GTP) y se encuentra altamente conservado en todas las GTPasas de la superfamilia RAS.

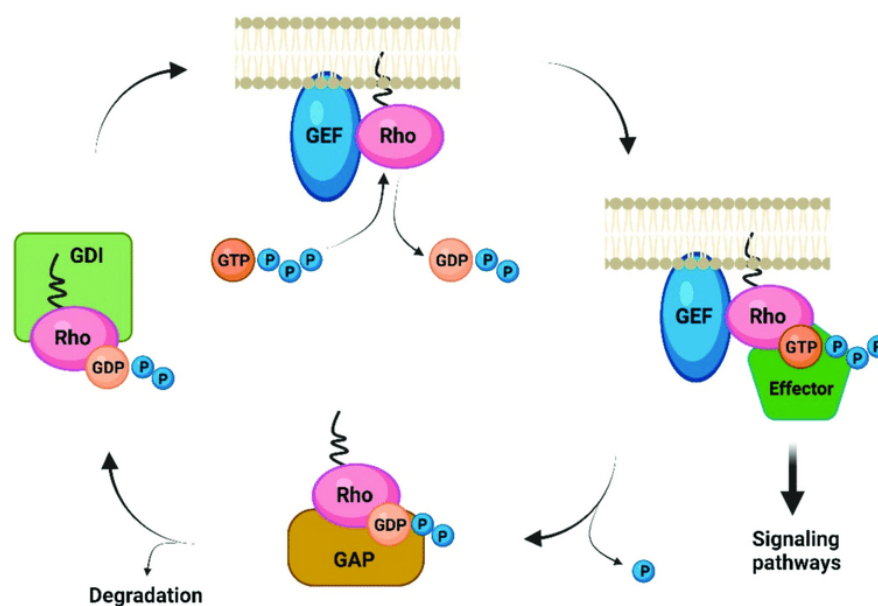


Figura 11. El ciclo de las Rho GTPasas. Los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs) promueven la carga de GTP para activar las GTPasas pequeñas, mientras que las proteínas activadoras de GTPasas (GAPs) estimulan la hidrólisis intrínseca de GTP en GDP para inactivar las GTPasas pequeñas. Los inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina (GDIs) secuestran las GTPasas preniladas unidas a GDP y pueden secuestrarlas entre la membrana plasmática y los compartimentos subcelulares. Fuente de la imagen (Pisanti et al., 2022).

En la figura 11 se muestra el ciclo de las GTPasas pequeñas, el cual alterna entre dos estados básicos: un estado inactivo (RHO-GDP), y un estado activo (RHO-GTP), como aparece representado. La actividad catalítica intrínseca de la hidrólisis de GTP es muy lenta, por lo que existen diferentes reguladores que controlan el estado de unión a GTP de las GTPasas pequeñas. Por un lado, los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs) promueven el intercambio de GDP por GTP, lo que activa a la GTPasa (RHO-GTP). Por su parte, las proteínas activadoras de GTPasas (GAPs) estimulan la hidrólisis de GTP convirtiendo a la proteína del estado activo (RHO-GTP) al inactivo

Introducción

(RHO-GDP). Tanto los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs) como las proteínas activadoras de GTPasas (GAPs) son proteínas multidominio que integran diversas señales en el control espaciotemporal preciso de la activación de las GTPasas pequeñas (Bos et al., 2007). En la familia de las RHO GTPasas existe además un tercer tipo de proteína reguladora clásica en la unión de nucleótidos, los inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina (GDIs), los cuales enmascaran los grupos isoprenilo y retienen a las proteínas inactivas en el citosol (DerMardirossian & Bokoch, 2005; Olofsson, 1999).

El dominio G, además de catalizar la hidrólisis de GDP y GTP, está implicado en la interacción con reguladores del ciclo GDP-GTP y de unión a membrana, así como de la interacción con efectores implicados en esta señalización.

5.1.2. RAC1 y las protrusiones de membrana

Los tres miembros principales de la familia RHO son RAC1, RHOA y CDC42, y cada uno de ellos regula por vías de señalización distintas la adhesión, el ensamblaje y la organización de actina. De este modo, las actividades conjuntas promovidas por RHOA, RAC1 y CDC42 regulan la morfología, adhesión y motilidad celular.

RAC1 puede ser activado por diferentes agonistas, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, *platelet derived growth factor*) o la insulina, y promueve la polimerización de filamentos de actina en la periferia celular para producir lamelipodios y *ruffles* de membrana (Ridley et al., 1992). La activación de CDC42, por su parte, induce la formación de prolongaciones de membrana ricas en actina con forma de dedo, los filopodios (Kozma et al., 1995). RHOA participa en la formación de los filamentos contráctiles de actina-miosina (fibras de tensión o estrés) y regula su anclaje a la membrana plasmática mediante la formación de las adhesiones focales en respuesta a la unión de ligandos extracelulares, como factores de crecimiento (Ridley & Hall, 1992). Además, es conocido que RAC1 y CDC42 también estimulan el ensamblaje de complejos focales multimoleculares en la membrana plasmática (Nobes & Hall, 1995). Estos complejos, asociados a lamelipodios y filopodios, contienen vinculina, paxilina y quinasas de adhesión focal y se forman independientemente de las adhesiones focales inducidas por RHO. En la figura 12 pueden verse las diferentes regiones de la célula donde participan RAC1, CDC42 y RHO orquestando la formación de estructuras y protrusiones para que tenga lugar la migración celular.

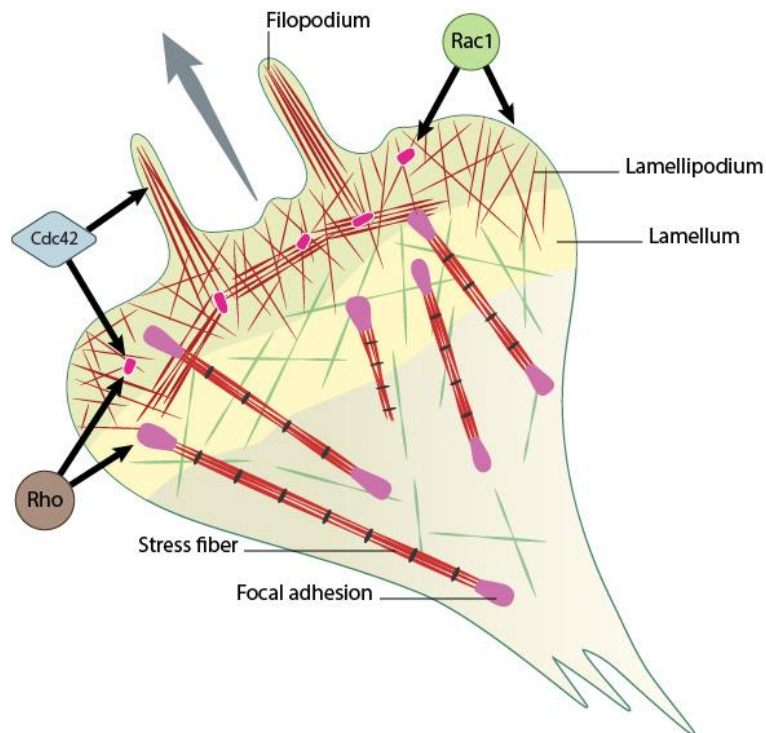


Figura 12. Rho GTPasas y generación de protrusiones durante la migración celular. Las proteínas de la familia Rho actúan en diferentes zonas de la célula (tal como indican las flechas) integrando una red molecular que participa en la formación de estructuras dinámicas necesarias para la migración. La proteína Rho participa en la formación de fibras de tensión (*stress fibers*) a partir del empaquetamiento y reorganización de los filamentos de actina y miosina, así como en la formación de adhesiones focales. Rac1 promueve la polimerización de actina, generando lamelipodios y estableciendo *ruffles* de membrana en el frente de avance, y Cdc42 induce la formación de filopodios a partir de actina (Kozma et al., 1995; Nobes & Hall, 1995; Ridley & Hall, 1992; Ridley et al., 1992). Fuente de la imagen [*Mechanobiology Institute: [What is the role of Rho GTPases in the regulation of focal adhesion assembly? | MBInfo \(mechanobio.info\)](http://www.mechanobiology.info)*].

5.1.2.1. RAC1, agente promotor de la nucleación de actina para la formación de lamelipodios y *ruffling* de membrana

Tanto RAC1, CDC42 y RHO actúan promoviendo la activación de la nucleación de actina y el desarrollo de protrusiones de membrana, así como complejos focales para su adhesión. Esto las convierte en agentes moduladores de la migración y la polaridad celular. Como se representa en la figura 13, la activación de RAC1, CDC42 y RHO puede estar mediada por la estimulación de receptores acoplados a proteínas G (GPCR, *G protein-coupled receptors*), receptores de factores de crecimiento (Hall, 1998) e integrinas (Price et al., 1998) y requiere factores de intercambio GDP-GTP que regulen su actividad (Van Aelst & D'Souza-Schorey, 1997). A través de las múltiples vías de transducción de señales en las que participan, estas RHO GTPasas actúan sobre más de 100 dianas diferentes y se activan tanto en respuesta a agentes solubles, factores de crecimiento (Hawkins et al., 1995; Nobes & Hall, 1995; Ridley & Hall, 1992; Ridley et al.,

Introducción

1992) o en respuesta a proteínas de la matriz extracelular (ECM) (Barry et al., 1997; Clark et al., 1998; Price et al., 1998; Ren et al., 1999).

En la figura 13 se representa de forma esquemática cómo la activación de RHO, RAC1 y CDC42 modula diferentes vías de señalización que regulan la motilidad celular. Por una parte, RHO modula la formación de adhesiones focales y fibras de estrés en combinación con las proteínas efectoras Rock (*Rho-associated coiled-coil kinase1/2*) y mDia (Watanabe et al., 1999). Por otra parte, la activación de RAC1 induce el *ruffling* de membrana y la formación de lamelipodios al estimular la polimerización de actina a través de la activación del complejo ARP2/3 y la proteína WAVE (Miki et al., 1998), mientras que CDC42 lo hace a través de N-WASP para dar lugar a filopodios (Symons et al., 1996).

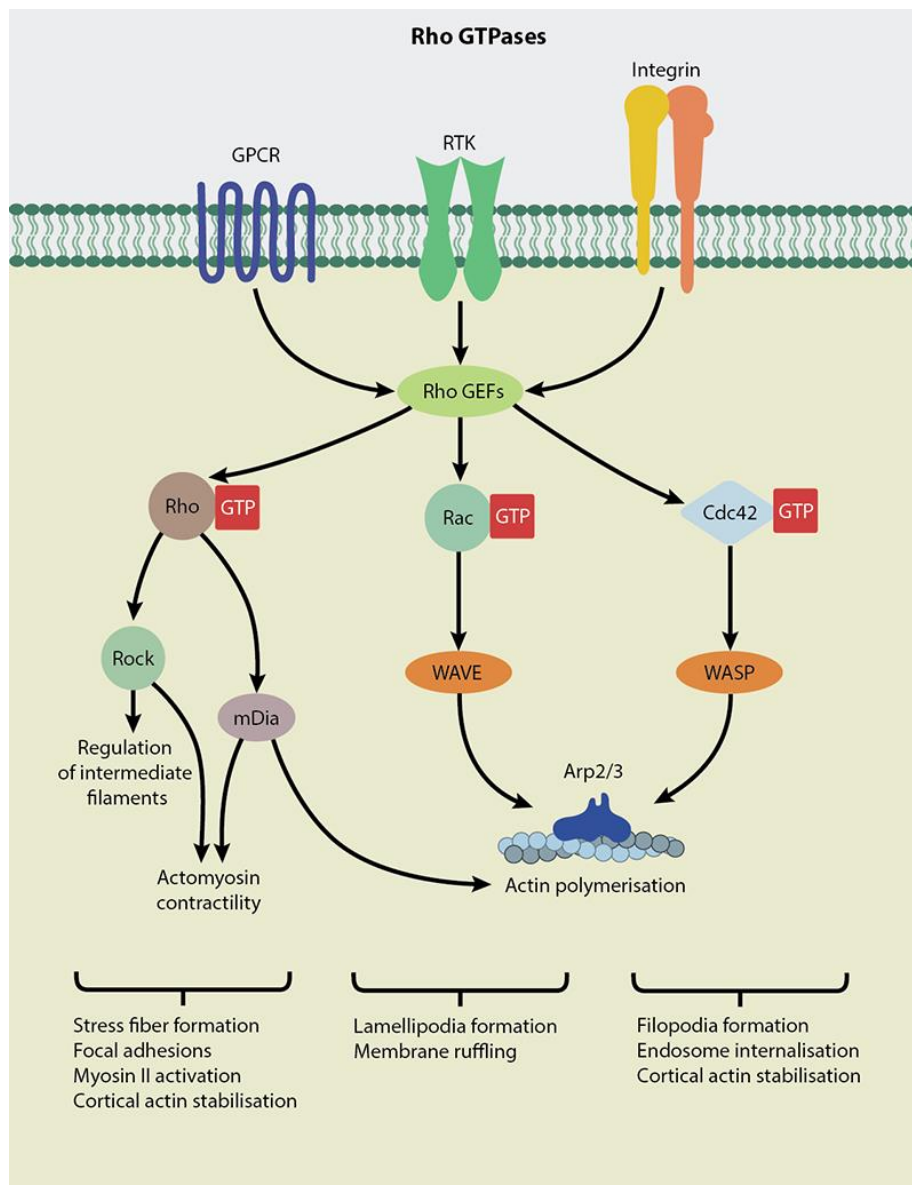


Figura 13. Regulación de la reorganización de la actina y la contractilidad de la actomiosina por Rho, Rac y Cdc42. Rho media el ensamblaje de anillos contráctiles de actomiosina y la regulación de filamentos intermedios a través de dos efectores principales, mDia y Rock (quinasa asociada a Rho). Por su parte, Rac y Cdc42 activan el complejo Arp2/3 a través de las proteínas WAVE y WASP, promoviendo así la polimerización de actina y el posterior desarrollo de lamelipodios y filopodios, respectivamente. Fuente de la imagen [*MechanoBiology Institute: [What are Rho GTPases? | MBInfo \(mechanobio.info\)](http://www.mechanobio.info)*].

Una de las vías que activa a CDC42 y RAC1 tiene lugar a través de PAK, en coordinación con las vías de señalización de las tirosinas quinasa. En el caso de los receptores tirosina quinasa como EGFR o PDGFR, la unión del ligando provoca la activación de CDC42 y RAC1 y la subsiguiente cascada de señalización corriente abajo que conduce a la activación del complejo ARP2/3 y el reordenamiento cortical de actina. Por otra parte, estas GTPasas regulan la adhesión célula-célula y a la matriz celular (Schoenwaelder & Burridge, 1999) a través de la señalización promovida por las integrinas mediante el reclutamiento de GEFs y GAPs en los complejos de adhesión, así como de proteínas de andamiaje y señalización como la paxilina (Brown & Turner, 2004) y la proteína tirosina quinasa de adhesión focal, FAK (Parsons, 2003). De este modo, tras la unión del ligando, la señalización mediada por integrinas recluta GEFs para activar a RAC1 y/o CDC42, promoviendo la formación de lamelipodios y filopodios respectivamente (Brugnera et al., 2002; Côté & Vuori, 2002). Tras esto, se activa RAC1 y tiene lugar la interacción con efectores posteriores que conducen a la adhesión y expansión celular inicial a través de la vía de señalización SRC-FAK (Sharma & Mayer, 2008). La formación, maduración y desensamblaje de la adhesión es un continuo proceso impulsado por el equilibrio entre la polimerización de actina y la contracción de actomiosina.

5.2. Complejo ARP2/3, agente promotor de la nucleación de actina

En el citoesqueleto, los filamentos de actina funcionan como generadores de fuerza, andamios estructurales y vías para las proteínas motoras. La polimerización y el desensamblaje de la actina es, por tanto, un proceso dinámico y esencial durante la reorganización del citoesqueleto para que tenga lugar el movimiento de las células. Este proceso depende de la transición regulada de la actina celular entre su estado monomérico (actina-G) y su estado filamentoso (actina-F), así la actina filamentosa es el resultado del ensamblaje de monómeros de actina globular. El primer paso en la polimerización de la actina es la nucleación, proceso en el que se forma un núcleo de actina con al menos tres monómeros. Una vez nucleada, la elongación del filamento de actina proporciona la fuerza motriz de los movimientos celulares. La nucleación espontánea de nuevos filamentos de actina es un proceso lento e ineficaz, por lo que se requiere una maquinaria molecular encargada de promover la nucleación de actina. Diversas moléculas de señalización, como tirosina quinasa y GTPasas de la familia RHO como RAC1 y CDC42, actúan en la activación de agentes promotores de la nucleación de

Introducción

actina. Se han descrito tres clases principales de proteínas que promueven el ensamblaje de actina: el complejo ARP2/3 (Welch, DePace, et al., 1997; Welch, Iwamatsu, et al., 1997; Welch et al., 1998), forminas (Pruyne et al., 2002) y proteínas con un motivo de repeticiones en tándem de unión a monómeros de actina-G (*tandem-monomer-binding nucleators*), como Spire y Cobl (Ahuja et al., 2007; Quinlan et al., 2005; Quinlan & Kerkhoff, 2008). En la figura 14 se representan los diferentes modos de nucleación de actina según el agente promotor de la nucleación, bien a partir de ramificación de filamentos de actina preexistentes promovidos por el complejo ARP2/3 y sus factores promotores de nucleación, o bien mediante la generación de filamentos en formas no ramificadas por forminas y nucleadores con dominios en tándem.

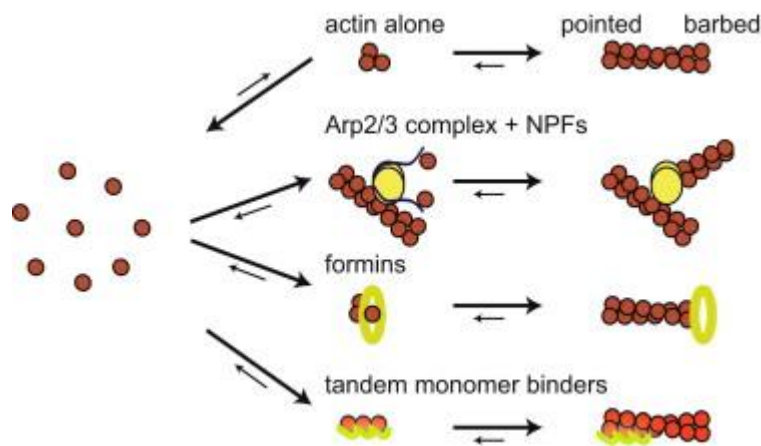


Figura 14. Mecanismos de nucleación de actina. Además de la nucleación espontánea de actina, que es un proceso lento que limita la velocidad de ensamblaje de los filamentos de actina, existen tres clases de factores nucleadores que promueven el ensamblaje de actina filamentosa. I. El complejo Arp2/3 es activado por factores promotores de la nucleación (NPFs) para catalizar la ramificación de un nuevo filamento de actina a partir de otro preexistente. II. Las forminas nuclean un filamento y luego permanecen asociadas al extremo de elongación a medida que el filamento crece. III. Las proteínas con motivos en tándem de unión a monómeros de actina globular (*tandem monomer binders*) nuclean un filamento y pueden permanecer unidas al extremo de crecimiento lento. Fuente de la imagen (Welch & Way, 2013).

De ellos, el complejo ARP2/3 es el principal agente que participa en la formación de protrusiones basadas en actina que son fundamentales en la motilidad celular, como lamelipodios y filopodios. La localización del complejo ARP2/3 en zonas del córtex celular de actina en especies de invertebrados, así como en lamelipodios de fibroblastos humanos, permitió su identificación como uno de los principales agentes catalizadores de la polimerización de actina (Kelleher et al., 1995; Mullins et al., 1997; Welch, DePace, et al., 1997). Así, el mecanismo de ensamblaje promovido por la maquinaria del complejo ARP2/3 y las proteínas con las que interactúa dan lugar a la ramificación de actina a partir de la red de filamentos localizados en el frente de migración. A continuación, se detalla la maquinaria molecular que opera conjuntamente en la nucleación de actina filamentosa y, consecuentemente, su participación en la migración

celular al promover la protrusión de lamelipodios y el establecimiento de *ruffles* de membrana a través de la actividad dirigida por RAC1.

El complejo ARP2/3 está formado por siete proteínas altamente conservadas en los organismos eucariotas: dos subunidades con homología con la actina (ARP2 y ARP3) de donde toma nombre el complejo y cinco polipéptidos únicos (ARPC1-5, *Actin-Related Protein Complex 1-5*) (Machesky et al., 1994; Robinson et al., 2001; Welch, DePace, et al., 1997). Una vez activo, el complejo ARP2/3 se une a filamentos de actina preexistentes, catalizando la unión de monómeros de actina al extremo positivo, formando un nuevo filamento en un ángulo de 70° y siguiendo un modelo de ramificación lateral (Amann & Pollard, 2001; Mullins et al., 1998). Tal y como puede observarse en la figura 15, los filamentos de actina son estructuras polares con un extremo positivo donde se produce la nucleación de actina y un extremo negativo a partir del cual se produce el desensamblaje y la desramificación del filamento con la participación de ADF/cofilina (Blanchoin et al., 2000; Carlier et al., 1999).

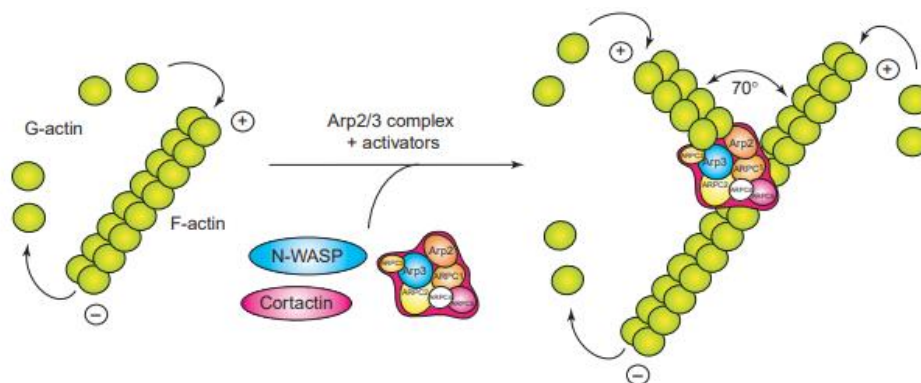


Figura 15. Nucleación de actina a partir del complejo Arp2/3 y dos factores promotores de la nucleación, N-WASP y cortactina. Cortactina y N-WASP, proteína de la familia WASP (*Wiskott-Aldrich Syndrome proteins*), son activadores del complejo Arp2/3, el cual promueve la nucleación de actina a partir de filamentos preexistentes. Estos filamentos presentan un extremo positivo, al cual se unen los monómeros de actina globular, y un extremo negativo a partir del cual se produce el desensamblaje. Fuente de la imagen (Selbach & Backert, 2005).

Para que se produzca la nucleación de actina promovida por el complejo ARP2/3, éste debe activarse por factores promotores de nucleación, NPFs. En su activación pueden participar tanto proteínas de la familia WASP (del Síndrome Wiskott-Aldrich) como la proteína cortactina, las cuales constituyen los principales activadores conocidos hasta la fecha de ARP2/3. Las proteínas WASP son factores canónicos promotores de nucleación (clase I), mientras que cortactina pertenece a la clase II de NPFs, distinguiéndose ambos tipos según su mecanismo de actuación.

Introducción

Los NPFs de clase I están constituidos por la familia de proteínas WASP, proteínas modulares con un dominio VCA (*Verprolin-Cofilin homology-Acidic*) conservado en su extremo C-terminal que se encarga del reclutamiento de la actina monomérica al sitio de polimerización e interactúa con el complejo ARP2/3 (Machesky & Insall, 1998). De este modo, se forma un trímero constituido por ARP2/3-WASP-actina-G que va a actuar como núcleo en la ramificación de actina. Las proteínas WASP están constituidas por cinco grupos: WASP, el miembro fundador que está codificado por el gen mutado en el síndrome de Wiskott-Aldrich (Derry et al., 1994) y sólo se expresa en las células hematopoyéticas; por su parte, su homólogo neuronal N-WASP se expresa de forma ubicua (Miki et al., 1996); tres isoformas de WAVE (Miki et al., 1996; Suetsugu et al., 1999), proteínas homólogas de la verprolina de la familia WASP (*WASP-family verprolin homolog*), también conocidas como SCAR o supresor del receptor de AMPc; WASH (*WASP/Scar homolog*) (Linardopoulou et al., 2007) y un último grupo constituido por WHAMM (*WASP homolog associated with actin, membranes and microtubules*) (Campellone et al., 2008) y JMY (*junction-mediating regulatory protein*) (Zuchero et al., 2009).

Por su parte, cortactina puede activar de manera débil a ARP2/3 mediante su unión a un dominio ácido en su extremo N-terminal, o bien indirectamente promoviendo la unión de N-WASP a ARP2/3 (Weaver et al., 2002). De manera simultánea, cortactina se une a la actina-F a partir de un dominio ABR (*Actin-Binding Region*), lo cual pone de relieve su importancia no sólo en la activación de la polimerización de actina, sino también en la estabilización de la ramificación de actina inducida por el complejo ARP2/3 (Carlier et al., 1999; Weaver et al., 2001).

5.3. El complejo regulador de WAVE (WRC) como agente promotor de la nucleación de actina

Miembros de la familia WASP, las proteínas WAVE, también denominadas proteínas SCAR (*Suppressor of cAMP receptor*), carecen de un dominio de unión de proteínas-G y se encuentran bajo la regulación de la actividad de RAC1, actuando a partir de la formación de complejos proteicos que contienen efectores intermediarios en la activación de la nucleación de actina junto a ARP2/3. La participación de WAVE en el ensamblaje de actina está muy acotado a las proyecciones de membrana en el frente de migración, donde induce la formación de lamelipodios y el *ruffling* de membrana (Kunda et al., 2003; Takenawa & Miki, 2001). Las proteínas WAVE forman parte de un complejo heteropentamérico denominado complejo regulador de WAVE, WRC (*WAVE Regulator Complex*), constituido por las proteínas WAVE, CYFIP1, NCKAP1 (o Nap1), ABI1 (o una de sus proteínas parálogas ABI2 o NESH) y HSPC300 o BRK1. En este sentido, la proteína CYFIP1 (*Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1*), también conocida como SRA1 (*Specific RAC1-activated protein*) (Takenawa & Suetsugu, 2007) participa en la regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina en el frente de migración al mediar la activación

de WRC a través de su unión a RAC1-GTP (Z. Chen et al., 2010; Eden et al., 2002; Kobayashi et al., 1998).

El complejo regulador de WAVE se localiza en áreas de polimerización de actina del frente de migración, donde participa promoviendo la ramificación de actina junto a ARP2/3 a través de la activación de RAC1, en combinación con la transducción mediada por fosfoinosítidos, proteínas efectoras con dominio SH3 y quinasas (Z. Chen et al., 2010; Eden et al., 2002; Takenawa & Suetsugu, 2007). Asimismo, también se ha descrito que la fosforilación en residuos de tirosina y serina de WAVE1-3, promovida por ABI1 en WAVE2-3 (Leng et al., 2005; Sossey-Alaoui et al., 2007; Stuart et al., 2006) o dependiente de Src en WAVE1 (Ardern et al., 2006), es necesaria para la activación del complejo regulador de WAVE y la regulación de la nucleación de actina con ARP2/3, lo que sugiere un papel sinérgico de la actividad de RAC1 y la fosforilación en la reorganización del citoesqueleto y el *ruffling* de membrana.

En este sentido, se ha descrito la pérdida del *ruffling* de membrana periférico y una menor motilidad en células deficientes en WAVE1 y WAVE2, así como una menor migración a través de la matriz extracelular (Suetsugu et al., 2003; Yamazaki et al., 2003; Yan et al., 2003), lo que confirmó el papel de WAVE en la reorganización controlada por RAC1 del citoesqueleto de actina cortical necesaria en la motilidad y migración celular.

5.4. Cortactina y la reorganización del citoesqueleto

Cortactina (CTTN) es un conocido marcador del citoesqueleto de actina en el frente de migración que se identificó inicialmente como una proteína fosforilada en residuos de tirosina en embriones de pollo infectados con v-Src (Kanner et al., 1990). Estudios posteriores describieron que, además de ser un sustrato de la tirosina quinasa Src, CTTN colocalizaba con actina-F en protuberancias celulares, podosomas y córtex celular (Wu & Parsons, 1993; Wu et al., 1991). Desde entonces, diversos estudios se han centrado en descifrar las vías y mecanismos a través de los cuales CTTN participa como proteína de andamiaje en la señalización y reorganización del citoesqueleto de actina. A su vez, está implicada en el control de endocitosis, organización y guía del axón, adhesión celular, migración e invasión (Knöll & Drescher, 2004; Lynch et al., 2003; Schuurin et al., 1993; Tilghman & Hoover, 2002).

5.4.1. Estructura molecular y dominios de CTTN

CTTN es un integrador de la señalización que regula la organización del citoesqueleto de actina, lo que concuerda con su estructura y los socios de unión identificados. CTTN es una proteína multidominio y su estructura molecular se basa en: (1) un dominio rico en aminoácidos ácidos en el extremo N-terminal (NTA, *N-terminal acidic*), (2) una secuencia que se repite en tándem seis veces y media, que constituye la

Introducción

región de unión a la actina filamentosa, (3) seguida de una α -hélice, (4) una región rica en prolina, y (5) un dominio SH3 (*Src homology domain*) en su extremo C-terminal que interactúa con múltiples efectores del citoesqueleto de actina que contienen secuencias ricas en prolina de interacción con el dominio SH3 (figura 16).

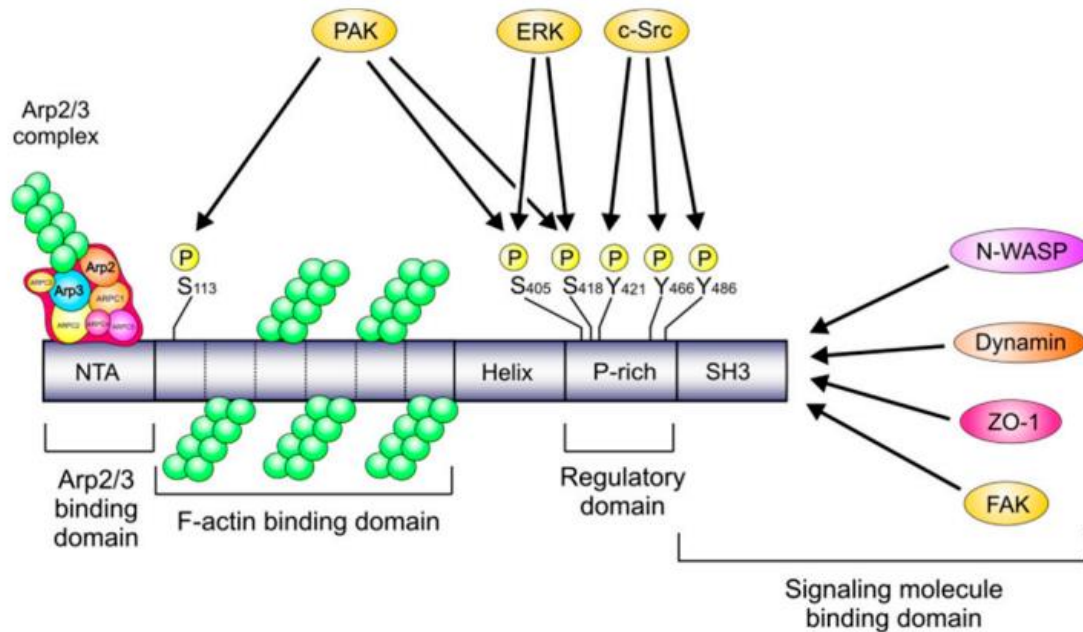


Figura 16. Estructura molecular de cortactina. En este esquema se muestran los diferentes dominios de cortactina. En el extremo N-terminal están los dominios NTA y de “repeticiones de cortactina” que se unen a actina-F, participando ambos en la estabilización de las ramificaciones de actina-F mediadas por Arp2/3. Seguidamente aparece un dominio α -hélice y otro rico en prolina que contiene residuos de serina y tirosina dianas de la fosforilación por las quinasas ERK1/2, PAK, y c-Src. Por último, el extremo C-terminal contiene el dominio de unión a moléculas de señalización, denominado dominio SH3, el cual interactúa con gran diversidad de proteínas, como N-WASP, dinamina, ZO-1 y FAK. Fuente de la imagen (Sharafutdinov et al., 2020).

Generalmente, el dominio NTA de CTTN interactúa con el complejo proteico ARP2/3 (Higgs & Pollard, 2001; Weed et al., 2000), mientras que la región de unión a la actina se une directamente a la actina-F (Wu & Parsons, 1993). Tanto el dominio NTA como el de unión a actina-F son necesarios para regular correctamente el ensamblaje de la actina ramificada (Uruno et al., 2001; Weed et al., 2000). Además de interactuar directamente con ARP2/3 a través de su dominio NTA, CTTN también promueve la actividad de nucleación de actina indirectamente a través del dominio SH3, el cual se une a una región rica en prolina de la N-WASP, induciendo así la actividad de nucleación de ARP2/3 (Weaver et al., 2002; Weaver et al., 2001). Por su parte, el dominio de α -hélice contiene sitio de corte para calpaína (Huang et al., 1997; Perrin et al., 2006) y el dominio rico en prolina contiene múltiples sitios de fosforilación, en particular residuos de serina y tirosina susceptibles de fosforilación por las serina/treonina quinasas ERK1/2, PAK y por la tirosina quinasa c-Src.

De este modo, CTTN modula la nucleación dendrítica de los filamentos de actina mediante una activación del complejo ARP2/3 promoviendo la formación y estabilización de la red de actina necesaria para la formación de lamelipodios en el frente de avance de células en migración.

5.4.2. Localización de CTTN en *ruffles* de membrana mediada por RAC1

CTTN es una proteína diana en la transducción de la señalización mediada por RAC1 que induce el *ruffling* de membrana y la formación de lamelipodios. Por una parte, los trabajos de Weed y cols. describieron la translocación y el enriquecimiento de CTTN desde zonas citoplasmáticas a *ruffles* de membrana como respuesta a la activación de RAC1 mediada por los factores de crecimiento PMA y PDGF (Weed et al., 1998). En ese mismo trabajo observaron que la localización de CTTN en áreas corticales dependía de la actividad de RAC1, de modo que la expresión del mutante constitutivamente activo RAC1-Q61L provocaba una translocación de CTTN a la periferia celular. De manera opuesta, en la expresión del mutante negativo RAC1-T17N observaron una acumulación intracelular de CTTN y el bloqueo de su translocación a zonas del córtex celular. Este hallazgo, sumado a la observación en estudios previos de la inhibición del *ruffling* de membrana en respuesta a factores de crecimiento en células que expresan el mutante negativo de RAC1 (T17N) (Ridley et al., 1992), permitió determinar el papel de RAC1 como regulador de la localización de CTTN en la formación de *ruffling* de membrana. Asimismo, los trabajos desarrollados por Weed y cols. permitieron establecer que el reclutamiento de CTTN a zonas del esqueleto cortical de actina es mediado por la serina/treonina quinasa PAK1 (Vidal et al., 2002).

Se ha descrito que la translocación de CTTN a la periferia celular está regulada por la actividad RAC1 a través de la fosforilación de CTTN en los residuos Y421 y Y466 por Src (Head et al., 2003; Huang et al., 1998). La fosforilación de CTTN en estos residuos de tirosina promueve la motilidad celular (Huang et al., 1998) y estimula el corte de CTTN por calpaína, necesario para la formación de protrusiones de membrana en el frente de migración (Perrin et al., 2006). Estos hallazgos resaltan la importancia de esta modificación postraduccional en migración celular al favorecer el enriquecimiento de CTTN en *ruffles* de membrana y lamelipodios, lo que vincula una coordinación entre la actividad de Src y la reorganización del citoesqueleto promovida por RAC1 (Timpson et al., 2001). En consonancia con este hecho, también se ha visto que la fosforilación de CTTN en residuos de tirosina media el reclutamiento de proteínas con dominio SH2, como NCK1, proteína adaptadora que conecta CTTN con N-WASP y WIP, potenciando de este modo la activación del complejo ARP2/3 y la nucleación de actina (Tehrani et al., 2007). Por otro lado, CTTN también es fosforilada en residuos de serinas y treoninas que se localizan principalmente en las repeticiones de unión a actina-F y la región rica en prolina. Por ejemplo, la quinasa PAK1 (*p21 associated kinase*) fosforila *in vitro* la serina 113 localizada en la primera repetición de CTTN (Vidal et al., 2002; Webb et al., 2006), y

Introducción

la quinasa ERK1/2 fosforila a las serinas 405 y 418, lo que promueve la localización de CTTN en el frente de migración, observándose una menor persistencia lamelipodial en células tumorales al mutar ambos residuos (Campbell et al., 1999). La fosforilación simultánea, además, de serinas y tirosinas por ERK y Src confirmó el importante papel de las PTMs en la actividad de CTTN en relación con la reorganización de actina, ya que puede integrar señales procedentes de rutas de señalización distintas para activar la nucleación (Kelley et al., 2010, 2011).

En resumen, la función de CTTN promoviendo la polimerización de actina está regulada por su localización subcelular, controlada por la actividad de RAC1, y por modificaciones postraduccionales, fundamentalmente fosforilaciones, de tirosina por Src, y serinas por ERK1/2 y PAK1.

5.4.3. CTTN en migración celular y cáncer

CTTN se ha relacionado con el desarrollo de diferentes enfermedades humanas, destacando principalmente su papel como marcador tumoral. La sobre-expresión de CTTN por amplificación génica se ha descrito en varios carcinomas humanos, tales como cáncer de mama, vejiga y carcinoma hepatocelular (Bringuier et al., 1996; Campbell et al., 1996; Yuan et al., 2003). Así, se ha establecido una correlación entre la sobre-expresión de esta proteína con metástasis (Li et al., 2001; Schuurin, 1995; Schuurin et al., 1992) y una peor prognosis en una amplia variedad de tumores, que comprenden el cáncer de mama, carcinoma renal y osteosarcoma, entre otros (Folio et al., 2011; Schuurin et al., 1992; Wang et al., 2009).

En relación con el papel de CTTN como factor promotor de la progresión tumoral, estudios llevados a cabo *in vitro* en fibroblastos pusieron de manifiesto que la sobre-expresión de CTTN inducía una mayor motilidad e invasividad (Patel et al., 1998). Asimismo, la fosforilación de CTTN es pro-migratoria y promueve la invasividad en células endoteliales (Huang et al., 1998). Existen, además, mecanismos adicionales por los que CTTN participa en la migración celular, como el *splicing* alternativo del dominio de unión de CTTN a actina-F, que puede dar lugar a las variedades SV1-cortactina, que carece de la sexta repetición (exón 11) o SV2-cortactina, la cual carece de la quinta y sexta repetición (exones 10 y 11). En ambas se observa una menor migración en comparación con las células que sobre-expresan cortactina silvestre (van Rossum et al., 2003).

Objetivos

La migración celular es un proceso que requiere de la reorganización del citoesqueleto de actina para la formación de protrusiones de membrana y generar un frente de migración polarizado. Numerosos estudios han puesto de manifiesto que la migración celular es un proceso modulado por la coordinación espaciotemporal de la concentración de Ca^{2+} intracelular. En esta Tesis Doctoral nos planteamos como objetivo general **estudiar el papel del canal de Ca^{2+} ORAI1 en migración celular, las vías moleculares que regulan su relocalización en el frente de migración y la modulación de su función por fosforilación**. Con tal finalidad, establecimos los siguientes objetivos específicos:

- Determinar el impacto de la supresión de ORAI1 sobre la migración celular y la formación de lamelipodios en el frente de migración.
- Analizar el impacto de la supresión de ORAI1 sobre el potencial de invasividad celular, utilizando para ello el pez cebra como modelo animal.
- Estudiar la localización de ORAI1 en el frente de migración, así como su interacción con agentes promotores de la nucleación de actina.
- Determinar si RAC1, que dirige a CTTN a la actina cortical, controla la relocalización de ORAI1 en el frente de migración celular.
- Identificar el mapa de residuos fosforilados de ORAI1, así como abordar el estudio del papel de la fosforilación de ORAI1 en los residuos de treonina 295, serina 298 y tirosina 300, todos ellos correspondientes al extremo C-terminal.
- Estudiar el papel de la fosforilación de estos residuos sobre la actividad del canal de Ca^{2+} ORAI1 y su distribución subcelular.

Resultados

Capítulo I

1. Estudio del papel del canal de calcio ORAI1 en el frente de migración

Uno de los objetivos centrales de esta Tesis Doctoral es estudiar el papel de ORAI1 en el frente de migración celular. Para una migración celular eficiente se requiere la reorganización del citoesqueleto cortical de actina, la cual se genera gracias a la polarización transitoria de la célula, siendo esencial en este proceso la entrada de Ca^{2+} extracelular. En este sentido, en trabajos de investigación desarrollados previamente en nuestro laboratorio se observó que la ausencia tanto de ORAI1 como de su regulador STIM1 conduce a una fuerte pérdida del *ruffling* de membrana, es decir, afecta a la reorganización de la actina cortical necesaria para la formación de filopodios y lamelipodios en el frente de migración (Lopez-Guerrero, Tomas-Martin, et al., 2017). En base a este resultado, decidimos estudiar cómo afecta la ausencia de ORAI1 a diferentes parámetros de la migración celular. Con ello se persigue poder describir la función y participación de ORAI1 en esta región de avance de las células en migración. Para desarrollar esta investigación se ha usado como modelo de estudio la línea celular de osteosarcoma humano U2OS, una línea tumoral establecida que presenta alta actividad tumorigénica.

1.1. Análisis del papel de ORAI1 en la velocidad de migración, distancia total acumulada y la direccionalidad de células U2OS

El movimiento celular se clasifica tanto por la velocidad de motilidad celular no direccional como por la velocidad de migración celular direccional. De este modo, se entiende por motilidad celular el movimiento celular aleatorio, mientras que la migración celular sería el movimiento direccional de la célula como respuesta a señales químicas y/o mecánicas, pudiendo ser causa inicial de su actividad invasiva y metastática.

Si bien no se conocen en detalle todas las cascadas de señalización que participan promoviendo las dinámicas de reorganización del citoesqueleto, sí se ha descrito la participación del ion Ca^{2+} en migración (Brundage et al., 1991; Cox & Huttenlocher, 1998; Pettit & Fay, 1998). En base a ello, decidimos abordar el estudio del perfil de migración en células defectivas para la expresión de ORAI1 en una línea generada mediante la técnica de edición genómica CRISPR/Cas9. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de motilidad celular 2D aleatorio sembrando células U2OS *wild-type* (WT) y U2OS ORAI1-KO en placas ibidi de 35 mm de diámetro pretratadas con colágeno tal y como se detalla en el apartado de Materiales y Métodos. Una vez transcurridas 2-4 horas desde la siembra, se procedió a monitorizar la migración celular con un microscopio Nikon Ti-E durante un mínimo de 4 horas, tomando fotografías con una frecuencia de 2 minutos. En la figura 17 se puede ver el trazado de la migración de las células WT (en negro) y el trazado de las células ORAI1-KO (en rojo). A partir de las imágenes obtenidas se realizó

Resultados: Capítulo I

la evaluación de los diferentes parámetros, tales como la velocidad de migración, la distancia acumulada y la direccionalidad. A continuación, se detalla el resultado del análisis para cada uno de ellos.

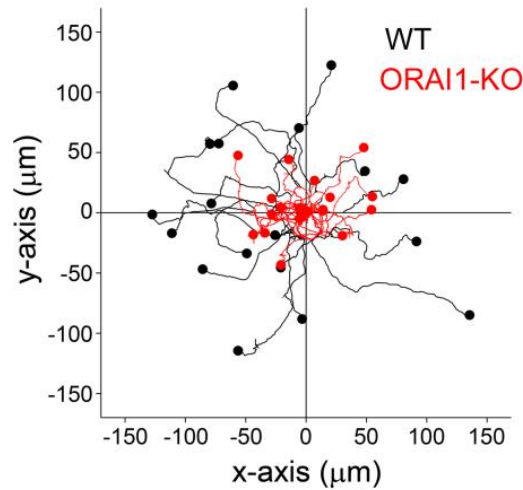


Figura 17. Ensayo de motilidad en células U2OS WT y ORAI1-KO. Las células se sembraron en placas de 35 mm pretratadas con colágeno. El ensayo se llevó a cabo incubando las células en un medio libre de bicarbonato Leibovitz's L-15 suplementado con 10% de suero a 37°C. Una vez transcurridas 2 horas desde la siembra, se monitorizó un ensayo de motilidad celular durante 4 horas tomando imágenes cada 2 minutos con un objetivo de campo claro de un microscopio Nikon Ti-E. En la imagen se muestran trazas representativas de 19 células por condición, correspondiendo el color negro a las células WT y el color rojo a las células ORAI1-KO.

1.1.1. Análisis del impacto de la supresión de ORAI1 en la velocidad de migración celular

A través del ensayo aleatorio de motilidad descrito en la figura 17 y el posterior análisis de las imágenes tomadas se pudo evaluar la velocidad de migración que presentan las células. Ésta se calcula determinando la distancia que migra la célula en un intervalo de tiempo determinado. En la gráfica de barras de la figura 18 se observa que la velocidad de migración disminuye de forma significativa cuando se suprime la expresión de ORAI1 en la célula.

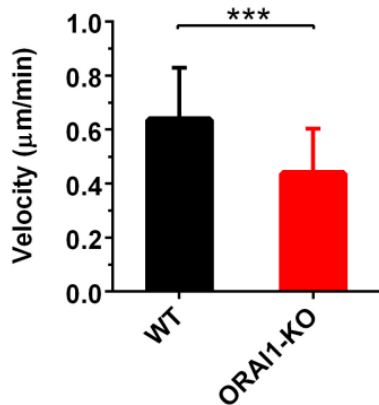
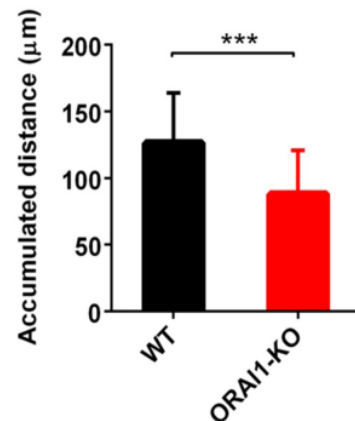


Figura 18. Análisis de la velocidad de migración de células U2OS WT y ORAI1-KO. A partir de las imágenes tomadas del ensayo de motilidad se evaluó la velocidad de migración ($\mu\text{m}/\text{min}$), la cual se representa en la gráfica de barras, correspondiendo el color negro a las células WT y el color rojo a las células ORAI1-KO. Los datos corresponden a 3 ensayos independientes ($n = 44$ células WT; $n = 78$ células KO). Las muestras se analizaron con el test estadístico t-Student para muestras independientes. (***) $p < 0.001$.

1.1.2. Análisis del impacto de la supresión de ORAI1 en la distancia total acumulada de migración

A través del ensayo de motilidad aleatoria descrito previamente y el posterior análisis de las imágenes tomadas se pudo evaluar en células U2OS WT y ORAI1-KO la distancia acumulada de migración, es decir, la distancia total que ha recorrido cada célula desde el punto inicial donde empezó a migrar hasta el punto final de la trayectoria. En la figura 19 se observa que la distancia acumulada de las células al migrar fue significativamente menor en células ORAI1-KO que en células WT.

Figura 19. Análisis de la distancia acumulada de migración de las células U2OS WT y ORAI1-KO. En la gráfica se representa la distancia acumulada (μm) durante la migración de las células WT (negro) y ORAI1-KO (rojo) evaluada a partir de las imágenes obtenidas del ensayo de motilidad celular. Los datos corresponden a 3 ensayos independientes ($n = 44$ células WT; $n = 78$ células KO). Las muestras se analizaron con el test estadístico t-Student para muestras independientes. (***) $p < 0.001$.



1.1.3. Análisis del impacto de la supresión de ORAI1 en la direccionalidad

El movimiento celular direccional implica la coordinación de múltiples procesos subcelulares. Para que las células migren eficazmente, las señales de polarización y las prolongaciones de la membrana celular deben estabilizarse para formar lamelipodios y protrusiones dominantes que permitan el avance de la célula a través del frente de migración. La direccionalidad es un parámetro de la migración celular a partir del cual es posible medir la eficiencia de las células al migrar manteniendo una polarización, es

Resultados: Capítulo I

decir, siguiendo un gradiente direccional de migración. De este modo, en términos matemáticos se puede decir que la direccionalidad mide la rectilinealidad de las trayectorias celulares durante la migración.

A partir de las imágenes obtenidas en el ensayo de motilidad (figura 17) evaluamos el efecto de la ausencia de ORAI1 en la direccionalidad de las células en migración. En la gráfica de los datos resultantes (figura 20) se observa que la direccionalidad celular se ve reducida significativamente en las células U2OS ORAI1-KO respecto a la línea WT (de 0.63 a 0.43). Esto nos indica que las células deficientes en la expresión de ORAI1 presentan un patrón de migración más aleatorio respecto al que muestran las células WT.

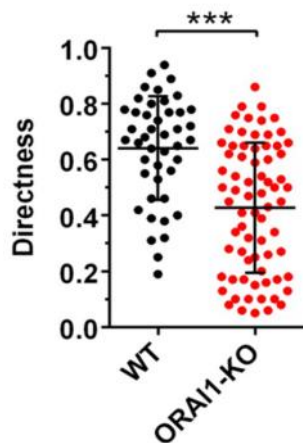


Figura 20. Análisis de la direccionalidad de las células U2OS WT y ORAI1-KO. En la gráfica de puntos se representa la direccionalidad celular evaluada en las dos condiciones experimentales del ensayo de motilidad, correspondiendo el color negro a las células WT y el color rojo a las células ORAI1-KO. Los datos corresponden a 3 ensayos independientes (n = 44 células WT; n = 78 células KO). Las muestras se analizaron con el test estadístico t-Student para muestras independientes. (***) $p < 0.001$.

Con el fin de confirmar que los efectos observados en la migración de la célula se deben al impacto de la supresión del canal de calcio ORAI1, se realizó un ensayo de motilidad adicional utilizando células U2OS WT y células U2OS ORAI1-KO que sobreexpresan de forma estable la proteína ORAI1. A partir de las imágenes tomadas se evaluó la direccionalidad de las células. Los resultados de la figura 21 muestran que la sobreexpresión ectópica de ORAI1 en las células ORAI1-KO rescata un fenotipo similar a las células WT en cuanto a la direccionalidad, ya que no se observan diferencias estadísticamente significativas en ambas condiciones. Este resultado nos permite confirmar que la atenuación de la migración y polaridad celular observada en los ensayos descritos (figuras 17-20) se debe exclusivamente a la ausencia de la proteína ORAI1.

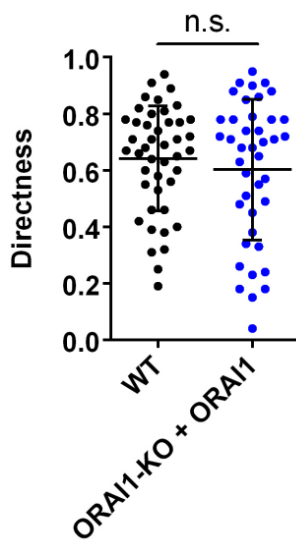


Figura 21. Análisis de direccionalidad en células U2OS ORAI1-KO tras la sobre-expresión ectópica de ORAI1. Células U2OS WT y células U2OS ORAI1-KO transducidas retroviralmente para la expresión estable de ORAI1 se sembraron en placas pretratadas con colágeno. Las células se incubaron en medio Leibovitz's L-15 libre de bicarbonato suplementado con 10% de suero a 37°C y tras 2 horas se monitorizó un ensayo de motilidad tomando fotografías con un microscopio Nikon Ti-E. Las imágenes fueron analizadas para evaluar la direccionalidad de las células, la cual aparece representada en la gráfica de puntos (símbolos negros, WT; símbolos azules, ORAI1-KO + ORAI1). Los datos representados corresponden a 3 ensayos independientes en el que se analizaron al menos 40 células por condición. Las muestras se analizaron con el test estadístico t-Student para muestras independientes. (n.s., no significativo) $p > 0.05$.

De manera complementaria al ensayo de motilidad celular en el que se analizó la direccionalidad de células que sobre-expresan ectópicamente ORAI1 de manera estable sobre la línea ORAI-KO, decidimos evaluar la entrada de Ca^{2+} extracelular operada por depósitos (SOCE) con objeto de determinar si la sobre-expresión de ORAI1 en las células KO recupera el fenotipo WT para la función del canal. La medida de SOCE se llevó a cabo siguiendo el protocolo estándar que aparece detallado en Materiales y Métodos. Para ello, las células U2OS WT, ORAI1-KO y ORAI1-KO + ORAI1 se cargaron con fura-2 AM durante 1 hora, procediéndose inmediatamente después a lavar las células en medio HBSS libre de Ca^{2+} y monitorizándose la actividad del canal mediante microscopía de epifluorescencia. En el minuto 2 del ensayo las células se trataron con taspigargina 1 μM para inducir el vaciado de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} . Cinco minutos más tarde, se añadió al medio extracelular CaCl_2 2 mM. La cuantificación de la entrada de calcio extracelular operada por depósitos (SOCE) se representa para cada línea celular en la figura 22.

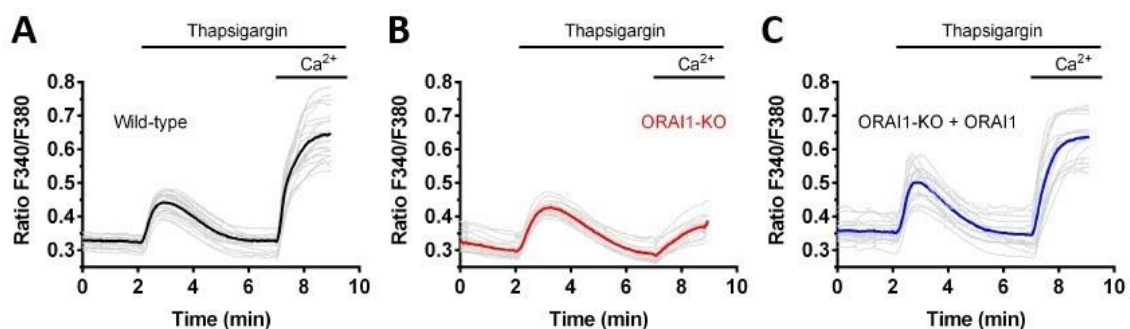


Figura 22. Medida de SOCE en células U2OS WT, ORAI1-KO y células ORAI1-KO que sobre-expresan ectópicamente ORAI1. Para evaluar SOCE, las células U2OS WT (A), ORAI1-KO (B) y ORAI1-KO + ORAI1 expresado ectópicamente (C) se cultivaron en cubres tratados con colágeno y 1 hora antes de iniciar la medida se cargaron con fura-2 AM. En el tiempo 0 de las gráficas las células se lavaron en medio HBSS libre de Ca^{2+} , a los 2 minutos se añadió Tg 1 μM en el mismo medio y 5 minutos más tarde se añadió CaCl_2

Resultados: Capítulo I

2 mM en el medio extracelular. El ratio F340/F380 se monitorizó tal y como se detalla en el apartado de Materiales y Métodos. Los datos representan la media de 3 ensayos independientes por condición experimental.

En los resultados se observa que las células defectivas para la expresión de ORAI1 (figura 22.B) no presentan entrada de Ca^{2+} extracelular tras el vaciado de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} . Si nos fijamos en la figura 22.C, correspondiente a las células que sobre-expresan ORAI1 de manera estable, los valores del ratio F340/F380 en la entrada de Ca^{2+} extracelular se posicionan en un rango similar al de las células U2OS WT (figura 22.A). De este modo, se confirmó que las líneas generadas mediante transducción retroviral para la expresión de ORAI1 tienen un fenotipo funcional similar al de las células WT y que la recuperación de SOCE permite restablecer el patrón de migración de las células U2OS WT.

1.2. Análisis del impacto de la supresión de ORAI1 en la formación de lamelipodios

Con el fin de profundizar más en el papel de ORAI1 en la migración celular, se abordó el estudio de la longitud del frente de migración, es decir, la longitud de la lámina que se extiende a lo largo de la parte frontal de las células móviles. Para ello, se realizó un ensayo de motilidad en células U2OS WT y ORAI1-KO. Las células se incubaron en medio Leibovitz's L-15 durante 2 horas para permitir la adhesión de las células a la placa de cultivo. A continuación, se monitorizó la motilidad de las células tomando secuencialmente fotografías cada 2 minutos durante 4-6 horas. Posteriormente se trabajó con estas imágenes para evaluar el tamaño de los lamelipodios y calcular la circularidad celular. En la figura 23 se muestran dos imágenes representativas del ensayo donde pueden apreciarse diferencias significativas en el tamaño de las células WT y células ORAI1-KO en migración, con sus respectivas extensiones formando lamelipodios.

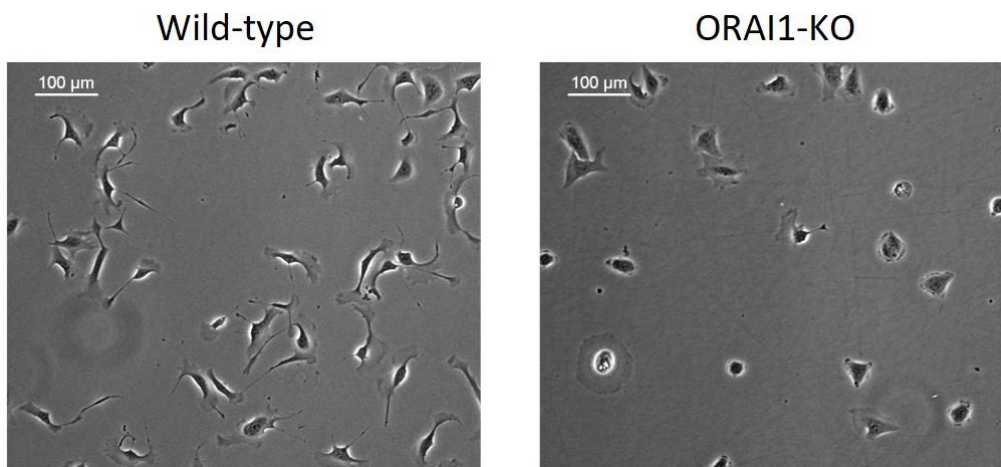


Figura 23. Ensayo de motilidad en células U2OS WT y ORAI1-KO. Las células se sembraron en placas pretratadas con colágeno y se incubaron en medio Leibovitz's L-15 suplementado con 10% de suero a 37°C. Tras 2 horas se monitorizó la motilidad celular tomando imágenes con una frecuencia de 2 minutos

durante 4-6 horas. Las grabaciones se llevaron a cabo con el software NIS-AR bajo microscopía de contraste de fase usando un objetivo Nikon Plan Achromat 10×. En esta figura se muestran dos imágenes representativas del ensayo, a la izquierda la correspondiente a las células WT, y a la derecha una imagen de las células ORAI1-KO. A partir de las imágenes tomadas se evaluó la longitud del frente de migración en células WT y ORAI1-KO, cuyos datos aparecen representados en la figura 24. Barra de escala = 100 μm.

En la figura 24 se representan a mayor aumento microscópico imágenes de células U2OS WT y ORAI1-KO. En la gráfica de puntos se representa la cuantificación del tamaño del frente de migración (μm) y la circularidad celular, la cual se calcula a partir del área total y el perímetro de una célula individual [Circularidad = $(4 \times \pi \times \text{área}) / \text{perímetro}$]. El análisis de los resultados muestra que las células defectivas para la expresión de ORAI1 presentan lamelipodios de menor tamaño, además de presentar mayor circularidad. Por tanto, la conclusión que se deriva de ambos análisis es que la supresión de ORAI1 reduce la formación de lamelipodios y conlleva a la pérdida en la polarización celular en comparación con la línea celular WT durante el proceso de migración.

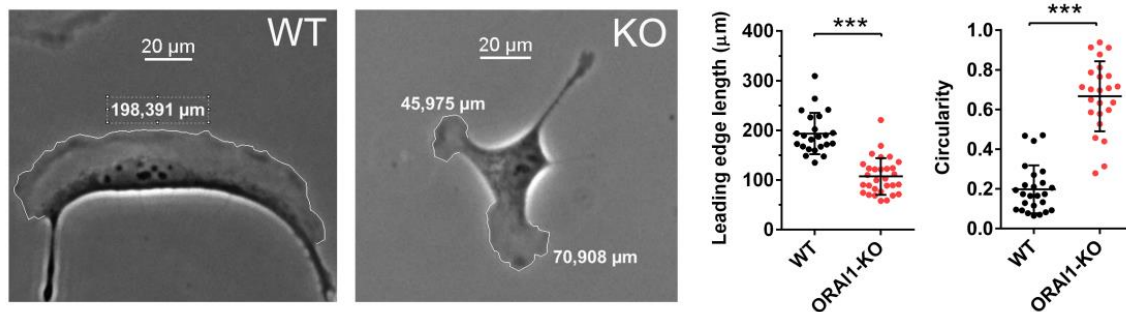


Figura 24. Análisis de la formación de lamelipodios en ausencia de ORAI1. Las células U2OS WT y ORAI1-KO se sembraron en placas pretratadas con colágeno en medio Leibovitz's L-15 suplementado con 10% de suero. Tras la siembra, las células se incubaron a 37°C y una vez transcurrido el tiempo mínimo para la adherencia celular (2-4 horas) se procedió a realizar un ensayo de motilidad celular usando un microscopio Nikon-Ti, con el que se tomaron imágenes del cultivo celular con una frecuencia de 2 minutos durante 4-6 horas, usando un objetivo de campo claro 10×. En la figura se muestran dos imágenes representativas del experimento donde se midió la longitud del frente de migración en células WT y ORAI1-KO. Barra de escala = 20 μm. A la derecha se muestran los datos relativos a la longitud del frente de migración y a la circularidad (WT, símbolos negros; ORAI1-KO, símbolos rojos). En el caso de la longitud del frente de migración, los datos corresponden a 3 experimentos independientes con un mínimo de 22 células por condición. Por su parte, el índice de circularidad se midió a partir de 2 experimentos independientes con al menos 20 células por condición. Las muestras se analizaron con el test estadístico t-Student para muestras independientes. (***) $p < 0.001$.

Por otro lado, se realizó un ensayo de motilidad celular en condiciones similares a las descritas en la figura 24, pero utilizando en este caso células ORAI1-KO que sobre-expresan de forma estable ORAI1. Los resultados se muestran en la figura 25, en la cual se observa que no había diferencias significativas entre la línea que expresa ectópicamente ORAI1 y la línea WT, es decir, la sobre-expresión de ORAI1 revierte el

Resultados: Capítulo I

fenotipo WT. De tal resultado, junto al análisis de la direccionalidad celular, se concluye que la alteración en la migración celular es consecuencia directa de la ausencia de ORAI1.

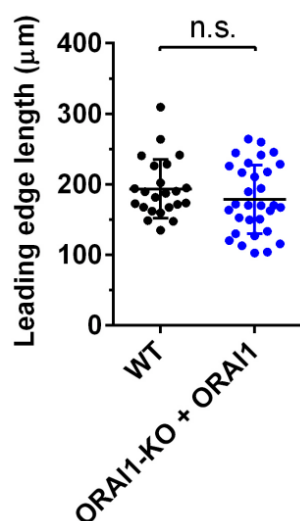


Figura 25. Análisis de la longitud del frente de migración en células ORAI1-KO tras la sobre-expresión ectópica de ORAI1. Se realizó un ensayo de motilidad celular en el que se sembraron células U2OS WT y células U2OS ORAI1-KO previamente transducidas para la expresión estable de ORAI1. Se monitorizó durante 4-6 horas la motilidad celular tomando imágenes cada 2 minutos con un objetivo de campo claro. Las imágenes se analizaron posteriormente para evaluar la longitud del frente de migración (μm) de ambas condiciones experimentales. Las muestras se analizaron con el test estadístico t-Student para muestras independientes. (n.s., no significativo) $p > 0.05$.

1.2.1. Estudio del impacto de la supresión de ORAI1 en la persistencia direccional

Las etapas iniciales de la migración celular se caracterizan por la formación de protuberancias muy dinámicas, también denominadas protrusiones lamelipodiales, en el frente de migración celular y estas protuberancias son las responsables de determinar la dirección del movimiento celular. Por otro lado, un incremento en la formación de lamelipodios laterales disminuye la persistencia direccional de la célula favoreciendo una migración aleatoria (Petrie et al., 2009).

En vista de los resultados observados en las células ORAI1-KO, que presentan una débil polarización junto con un tamaño reducido de los lamelipodios, decidimos estudiar cómo afecta la ausencia de ORAI1 a la distancia de protrusión y a la persistencia de los lamelipodios. Para ello se llevó a cabo un ensayo de motilidad en el que se monitorizó la migración de las células U2OS WT y ORAI1-KO tomando imágenes durante 4-6 horas. Las protrusiones lamelipodiales se analizaron midiendo la persistencia en la migración y la distancia de protrusión mediante quimografía (Bear et al., 2002; Hinz et al., 1999), tal y como se detalla en Materiales y Métodos.

En la figura 26 se muestra la actividad lamelipodial a lo largo de un eje espacial y temporal a partir de imágenes de una célula WT. El quimógrafo o representación gráfica resultante de combinar varias imágenes secuenciales se representa en el panel inferior. Los contornos ascendentes y descendentes del frente de migración indican eventos de protrusión y retracción en el tiempo, respectivamente. Los tonos oscuros durante los eventos de retracción corresponderían a ondulaciones, *ruffles*, de membrana.

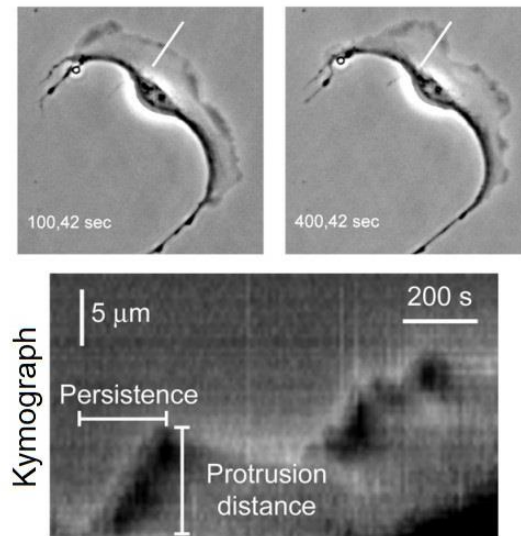


Figura 26. Medida de la distancia de protrusión y de la persistencia mediante quimografía. Se realizaron ensayos de motilidad y se monitorizó la migración celular tomando imágenes bajo microscopía de campo brillante. En el panel superior se muestra una célula individual WT a dos tiempos diferentes y las líneas blancas permiten observar la evolución de la protrusión durante este período de tiempo sobre la propia línea. El quimógrafo resultante de combinar varias imágenes secuenciales aparece en el panel inferior de la figura. Para medir la distancia de protrusión y la persistencia en el quimógrafo definido se empleó una profundidad de campo de 3 píxeles en el área seleccionada del frente de migración y se estableció una escala espacial y temporal (panel inferior). Las barras indican los ejes de escala espacial (5 μm) y de escala temporal (200 segundos).

La cuantificación de los resultados correspondientes a la distancia de protrusión y a la persistencia se muestran en la figura 27. En dicha cuantificación se puede observar que la distancia de protrusión disminuye más de la mitad en el caso de las células ORAI1-KO respecto a las células WT. El tiempo medio que la membrana está involucrada en protrusiones individuales sin cambiar de orientación (persistencia direccional) es de 100 segundos aproximadamente para las células ORAI1-KO, pero es 3 veces superior en las células WT. Estos resultados confirman, por tanto, que la supresión de ORAI1 en la célula conduce a una reducción significativa en la extensión de los lamelipodios de nueva formación, así como a una menor persistencia lamelipodial.

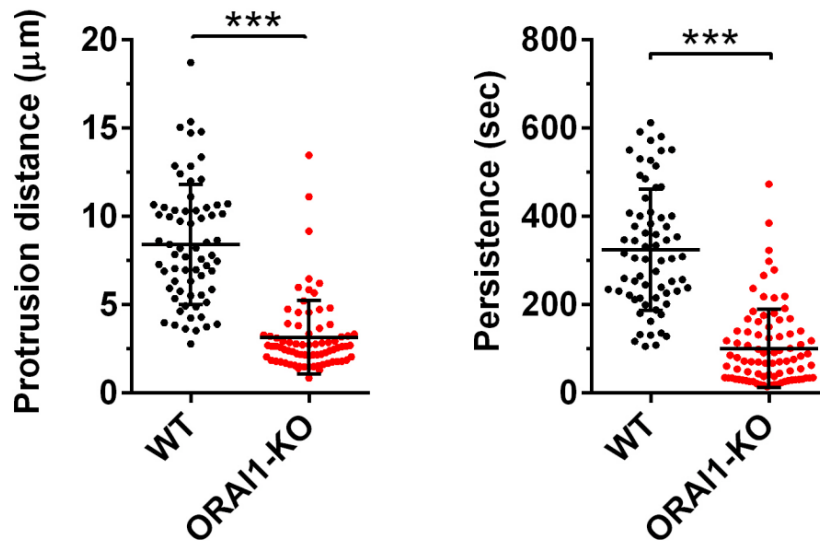


Figura 27. Análisis del impacto de la supresión de ORAI1 en la distancia de protrusión y persistencia direccional. A partir de un ensayo de motilidad se monitorizó la migración de células U2OS WT y ORAI1-KO tomando imágenes a intervalos regulares de tiempo para realizar un posterior análisis mediante quimografía y evaluar la distancia de protrusión (μm) y la persistencia (segundos) de las células U2OS WT (símbolos negros) y ORAI1-KO (símbolos rojos). La cuantificación representada corresponde a datos individuales de dos experimentos independientes. El análisis estadístico se llevó a cabo con el test estadístico t-Student para muestras independientes. (***) $p < 0.001$.

En resumen, podemos sugerir que los defectos en la formación de los lamelipodios y en la migración celular son consecuencia directa de la ausencia de ORAI1. De este modo, los lamelipodios de menor tamaño observados en la línea celular ORAI1-KO conducen a una menor persistencia direccional, al ser menor la distancia recorrida en un sentido. Por otro lado, una mayor circularidad está relacionada con la pérdida de polaridad, ya que los lamelipodios existentes no constituyen un frente de migración con protrusión dominante.

1.3. ORAI1 regula el ratio de actina filamentosa *versus* actina globular libre en el citosol

En base a los resultados mostrados, podríamos concluir que ORAI1 modula positivamente la persistencia lamelipodial. Dado que una mayor ramificación de actina y disminución de la elongación da lugar a lamelipodios lentos pero persistentes, nos planteamos si ORAI1 pudiera potenciar un incremento en la ramificación de actina en detrimento de la elongación. De ese modo, se podría explicar que el influjo de Ca^{2+} a través de ORAI1 en el frente de migración podría modular el ratio de la ramificación y elongación de actina, potenciando la ramificación y contribuyendo así a generar lamelipodios persistentes. Esta hipótesis estaría relacionada directamente con una mayor dinámica en el desensamblaje de la actina filamentosa para la formación de

ramificaciones, y por lo tanto estaría también relacionada con una mayor presencia de actina globular en la célula frente a la actina filamentosa. Con el fin de determinar si ORAI1 participa potenciando la ramificación de actina, decidimos analizar el ratio de actina filamentosa y de actina globular libre (actina-F/actina-G). Para ello se llevó a cabo un ensayo para obtener fracciones de actina globular y actina filamentosa *in vivo* a partir de células U2OS WT y ORAI1-KO, según se detalla en el apartado de Materiales y Métodos, y se analizó mediante inmunoblot la cantidad de actina filamentosa y de actina globular en ambas líneas celulares, utilizando para su detección un anticuerpo anti-actina. Por otra parte, también se evaluó el nivel de actina total en las células WT y ORAI1-KO a partir de lisados totales (WCL, *whole cell lysates*) (figura 28).

Los resultados obtenidos muestran que la ausencia de ORAI1 en la célula provoca un notable incremento en el ratio actina-F/actina-G, sin que exista variación alguna en los niveles de expresión de actina total entre la línea WT y la línea defectiva en la expresión de ORAI1 (ver WCL). Este resultado podría indicar que la entrada de Ca^{2+} a través de ORAI1 podría potenciar el desensamblaje de la actina-F, contribuyendo de este modo al reciclaje de la actina y permitiendo así su ramificación y formación de lamelipodios. Por otro lado, en las células ORAI1-KO la estabilidad de la actina-F podría inhibir la dinámica de formación de ramificaciones de actinas y por tanto la formación de lamelipodios.

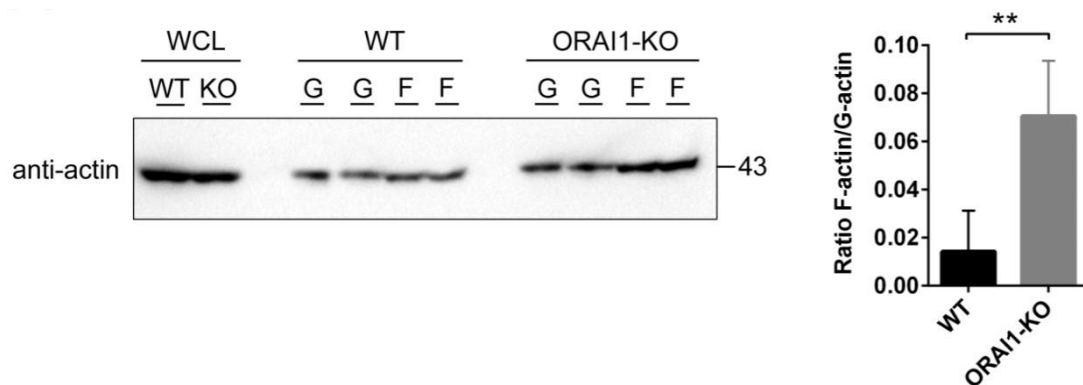


Figura 28. La deficiencia de ORAI1 incrementa el ratio de actina filamentosa *versus* actina globular (actina-F/actina-G). Las células U2OS WT y ORAI1-KO se cultivaron hasta alcanzar una confluencia óptima en torno al 60%. Las células se lisaron y se procesaron como se indica en el apartado de Materiales y Métodos para precipitar actina-F, quedando en el sobrenadante la actina-G solubilizada. Seguidamente, la actina-F precipitada se resuspendió en un tampón para potenciar su despolimerización. La cantidad de actina-F y actina-G se analizó por inmunoblot con un anticuerpo anti-actina. El nivel de expresión de actina en lisados totales (WCL) se evaluó utilizando 25 μg de proteína. La cuantificación del ratio actina-F/actina-G que se muestra en la gráfica de barras (derecha) se calculó en base a una relación 1:16, dado que los niveles de actina-G fueron significativamente superiores que los de actina-F. El blot es representativo de 3 experimentos independientes. Los resultados de la gráfica corresponden a 3 experimentos independientes.

Resultados: Capítulo I

Una vez obtenido este resultado nos planteamos si existe alguna proteína de unión a actina (ABP, *actin-binding proteins*) sensible a Ca^{2+} , que sea responsable del ensamblaje/desensamblaje de la actina-F, y que se comporte de diferente modo en las células WT y células ORAI1-KO. En este sentido, se ha descrito que gelsolina es una conocida ABP estimulada por Ca^{2+} que actúa como efector de RAC1 (De Corte et al., 2002; Sun et al., 1999). Tras ser activada por Ca^{2+} , gelsolina participa en el ensamblaje/desensamblaje de actina-F, pudiendo actuar como proteína de unión o bien como proteína responsable de cortar las fibras de actina existentes. De este modo, el siguiente paso fue evaluar el nivel de gelsolina que coprecipita con actina filamentosa en las células WT y ORAI1-KO. Para ello, se analizó mediante inmunoblot la cantidad de gelsolina coprecipitada a partir de las muestras de actina-F obtenidas en el anterior ensayo experimental. Los resultados se representan en la figura 29, en la que se observa mayor nivel de gelsolina precipitada con actina-F en las células WT que en ausencia de ORAI1. Este resultado sugiere que gelsolina requiere el influjo de Ca^{2+} a través de ORAI1 para su activación, lo cual explicaría el requerimiento de Ca^{2+} a través de ORAI1 para la formación de ramificaciones persistentes y formación de lamelipodios en el frente de migración.

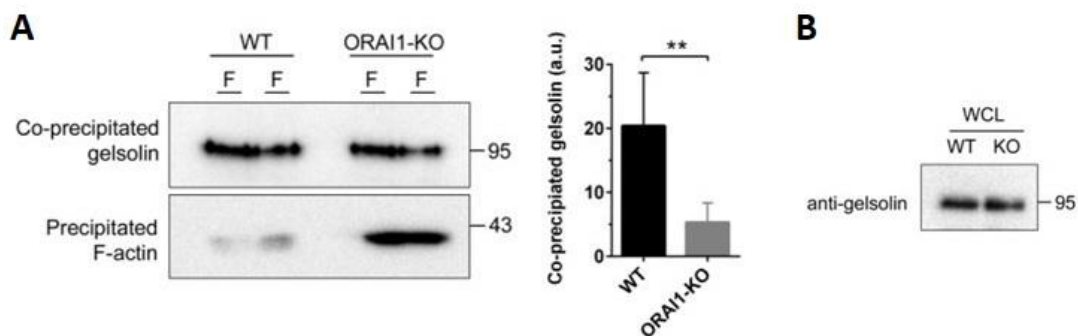


Figura 29. La ausencia de ORAI1 disminuye el nivel de gelsolina que coprecipita con actina filamentosa.

Panel A: Las células U2OS WT y ORAI1-KO se sembraron en medio DMEM completo y cuando se alcanzó la confluencia óptima, se precipitó actina-F a partir de un ensayo de fraccionamiento *in vivo* siguiendo las instrucciones que se indican en el apartado de Materiales y Métodos. Mediante inmunoblot se analizó el nivel de gelsolina que coprecipita con actina, utilizando para ello un anticuerpo anti-gelsolina. El nivel de actina-F precipitada se evaluó con un anticuerpo anti-actina. Los blots son representativos de 3 experimentos independientes y su cuantificación se representa en la gráfica de barras. *Panel B:* El nivel de expresión de gelsolina en las líneas WT y ORAI1-KO se evaluó mediante inmunoblot a partir de 25 μg de proteína de lisado total (WCL). El blot es representativo de 3 experimentos independientes.

Este resultado nos permite concluir que el canal de Ca^{2+} ORAI1 es esencial para mediar la unión de gelsolina a actina-F y permitir el ensamblaje/desensamblaje de actina-F durante la formación de lamelipodios, lo que permite explicar la necesidad de ORAI1 en el frente de migración.

1.4. Estudio del potencial invasivo de ORAI1 en la línea celular U2OS a través de xenotransplantes en pez cebra (mutante casper) como modelo experimental

Tal y como se ha citado previamente en la Introducción, se ha observado una relación directa entre los niveles de expresión de ORAI1 y la actividad tumorigénica en las células. Asimismo, se conoce que tanto la persistencia direccional como la polarización son dos factores clave para que se produzca una migración celular eficiente, siendo la migración un paso esencial en las primeras etapas de invasión en el proceso metastásico. De este modo, y en base a los resultados obtenidos en los análisis anteriores, nos propusimos conocer el papel de ORAI1 un paso más allá de la migración celular: la invasividad tumoral. En este sentido, para confirmar si ORAI1 juega un papel clave, no solo en el frente de migración sino también en las etapas iniciales de invasividad, se realizaron ensayos de invasión *in vivo*. Tal y como se detalla en el apartado Materiales y Métodos, las células U2OS WT y ORAI1-KO se micro-inyectaron en el saco vitelino de larvas del pez cebra (mutante casper) y 5 días más tarde se procedió a analizar la diseminación de las células al resto del animal por microscopía de fluorescencia.

Los resultados del análisis de microscopía se muestran en la figura 30, donde se observa un mayor nivel de diseminación de células tumorales en aquellas larvas en las que se inyectaron células U2OS WT. En la gráfica de barras (figura 30) se representa el porcentaje de larvas no invadidas e invadidas, con la consiguiente subdivisión en base al número de focos tumorales para esta condición. En el caso de las células WT, la tasa de larvas que son invadidas es superior a la que presentan las células ORAI1-KO. Además, en el subgrupo de larvas con una alta tasa de invasividad (más de 15 focos tumorales por larva) es especialmente relevante que las células WT mostraron una mayor capacidad de formación de focos tumorales que las células ORAI1-KO.

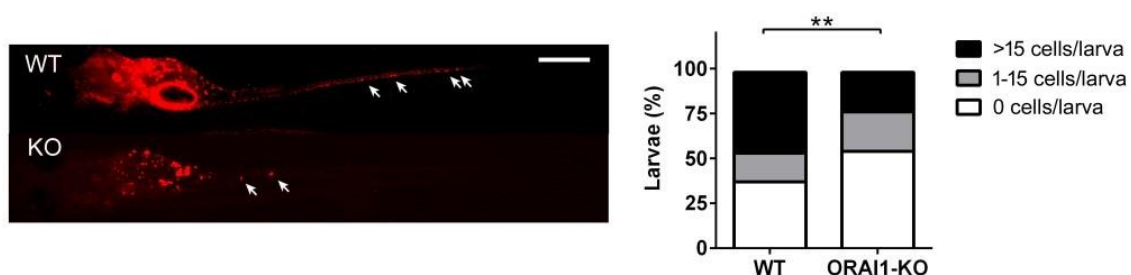


Figura 30. La ablación genética de ORAI1 redujo el potencial invasivo de las células U2OS en larvas de pez cebra (mutante casper). A la izquierda se muestran las imágenes del potencial invasivo de células U2OS WT y ORAI1-KO a través de su diseminación en larvas de pez cebra a los 5 días de su micro-inyección en el saco vitelino. Barra de escala = 500 μ m. En la gráfica de la derecha se representan el porcentaje de larvas no invadidas (0 focos por larva, en color blanco) y el porcentaje de larvas invadidas, cuya clasificación se subdivide a su vez en dos grupos en función del número de focos tumorales que presenten: 1-15 focos por larva (color gris); y más de 15 focos por larva (color negro). Los datos mostrados en la gráfica corresponden a 2 experimentos independientes (n = 119 larvas inyectadas con células WT, n = 87 larvas inyectadas con células ORAI1-KO). Las muestras se analizaron con el test estadístico χ^2 (Chi-squared test). (**) $p > 0.01$.

Resultados: Capítulo I

De estos resultados se concluye que la ausencia de expresión de ORAI1 reduce significativamente la diseminación de las células de osteosarcoma U2OS, un resultado que guarda relación directa con el efecto inhibitorio observado en la velocidad de migración, persistencia direccional y formación de protrusiones en el frente de avance de las células ORAI1-KO en migración.

2. ORAI1 y la reorganización del citoesqueleto en el frente de migración

Hasta la fecha se ha descrito el mecanismo por el cual STIM1, el regulador del canal ORAI1, se localiza en el frente de migración (Lopez-Guerrero, Tomas-Martin, et al., 2017), así como su papel en la migración celular en respuesta a EGF (Casas-Rua et al., 2015). Sin embargo, los mecanismos moleculares que regulan la relocalización de ORAI1 en regiones de avance de las células en migración aún se desconocen, por lo que decidimos abordar su estudio.

2.1. El factor de crecimiento epidémico (EGF) induce la translocación de ORAI1 al frente de migración

Es conocido que EGF modula la migración celular y que el frente de migración es rico en receptores de EGF (EGFR), los cuales participan en adhesión celular, motilidad e invasión (Philippar et al., 2008; Yasmeen et al., 2006). En base a estos resultados decidimos investigar el papel de este factor de crecimiento en la translocación y relocalización de ORAI1 al frente de migración. Para ello analizamos la interacción de ORAI1 con CTTN, un conocido marcador del frente de migración, así como su unión a otras proteínas que regulan la formación de lamelipodios en respuesta a EGF, como ARP2/3 y CYFIP1 (la cual forma parte del complejo regulador de WAVE).

2.1.1. Interacción de ORAI1 con marcadores del frente de migración

Para evaluar si EGF potencia la interacción de ORAI1 con marcadores del frente de migración se llevaron a cabo ensayos de coprecipitación con CTTN, empleando células U2OS ORAI1-KO transfectadas para la expresión transitoria de ORAI1-GFP y mCherry-CTTN. Como control negativo del experimento se utilizaron células transfectadas con el vector GFP-vacío (figura 31). Las células se privaron de suero durante 8-10 horas y se trataron con EGF 50 ng/ml a diferentes tiempos. A continuación, se precipitó ORAI1-GFP y se analizó mediante inmunoblot la cantidad de CTTN coprecipitada empleando un anticuerpo específico anti-CTTN. La cantidad de ORAI1-GFP precipitado en cada condición se analizó mediante inmunoblot con un anticuerpo anti-GFP. Por otra parte, se monitorizó la estimulación de las células con EGF (figura 31.B) evaluando los niveles de fosforilación de (1) fosfo-PAK1/2 (residuos Thr423/Thr402), que es una serina/treonina quinasa activada por RAC1 que actúa como uno de los efectores del

receptor de EGF (EGFR) y de (2) fosfo-ERK1/2, dado que EGF activa la ruta de las quinasas MAPK.

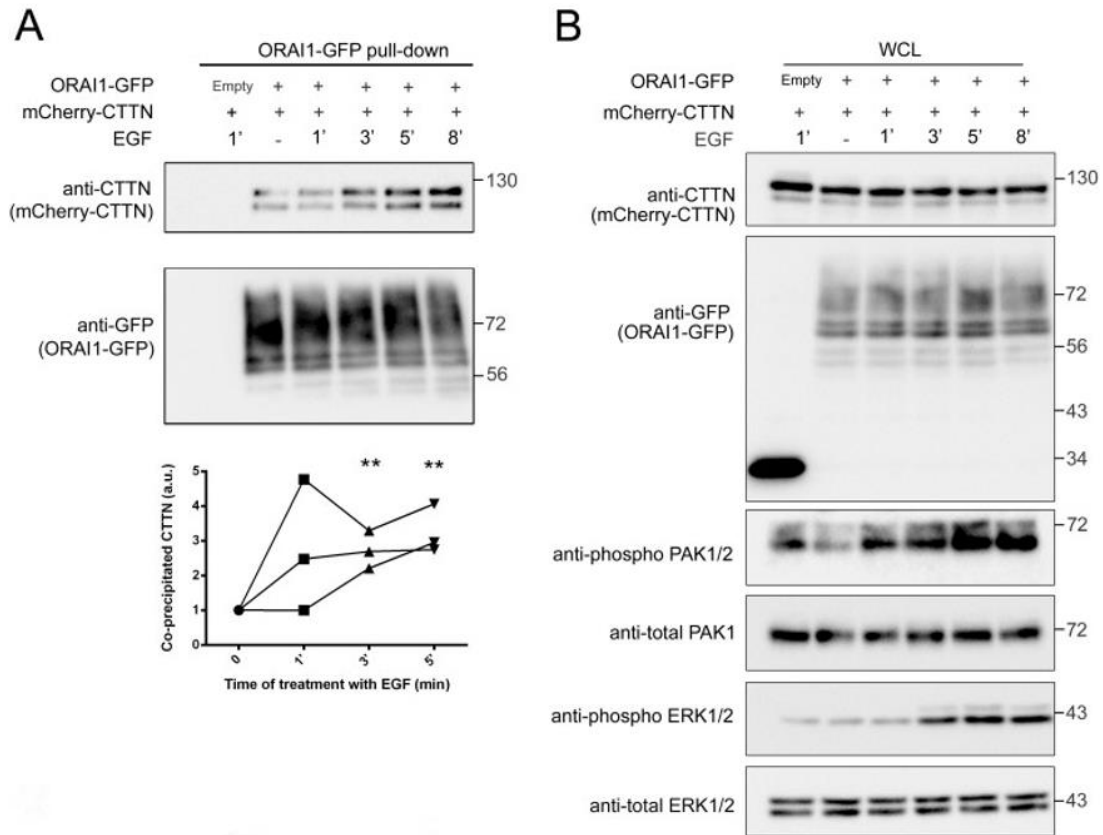


Figura 31. Estudio de la interacción entre ORAI1 y CTTN en respuesta a EGF. *Panel A:* Las células U2OS ORAI1-KO se transfirieron para la expresión transitoria de ORAI1-GFP (o el vector vacío, GFP-empty, como control negativo) y mCherry-CTTN. Las células fueron deprivadas en medio RPMI libre de suero durante 8-10 horas y estimuladas posteriormente con EGF 50 ng/ml durante 0-5 min. ORAI1-GFP se precipitó utilizando una resina de agarosa con afinidad por GFP (GFP-Trap beads). La cantidad de mCherry-CTTN que coprecipita con ORAI1-GFP se evaluó mediante inmunoblot utilizando un anticuerpo anti-CTTN y la cantidad de ORAI1-GFP precipitado se evaluó utilizando un anticuerpo anti-GFP. La gráfica inferior del *panel A* muestra la cuantificación de CTTN coprecipitada con ORAI1 en los diferentes tiempos de estimulación con EGF en 3 experimentos independientes. *Panel B:* Para analizar la eficiencia de la transfección transitoria (mCherry-CTTN y ORAI1-GFP) y la estimulación con EGF se evaluaron los niveles de mCherry-CTTN, ORAI1-GFP, fosfo-PAK1/2, PAK1 total, fosfo-ERK1/2 y ERK1/2 total en lisados celulares de extractos totales (WCL). Los inmunoblots son representativos de 3 experimentos diferentes a partir de 3 lisados independientes.

Los resultados muestran que el incremento en la fosforilación de PAK1/2 y ERK1/2 se inicia tras 1 y 3 minutos, respectivamente, tras la estimulación con EGF (figura 31.B). Dentro de este marco temporal, la interacción de CTTN con ORAI1 aumentó significativamente tras 3 minutos de tratamiento con EGF (panel inferior de la figura 31.A). Este resultado sugiere que EGF potencia el reclutamiento de ORAI1 al frente de migración. Dado que el frente de migración está enriquecido en el complejo regulador

Resultados: Capítulo I

de WAVE (WRC), que participa regulando la polimerización y ramificación de actina, se decidió monitorizar la coprecipitación de ORAI1 con CYFIP1, una de las subunidades de WRC también conocida como SRA-1 (*Specifically RAC1-associated protein 1*), así como con el complejo ARP2/3, un factor de nucleación que une fibras preexistentes de actina para facilitar la ramificación de ésta (actina-F) en respuesta a EGF. Para ello, las células ORAI1-KO se transfectaron para la expresión transitoria de ORAI1-GFP, se privaron en medio libre de suero 8-10 horas y transcurrido este tiempo se estimularon durante 3 minutos con EGF. A continuación, se precipitó ORAI1-GFP y se evaluaron mediante inmunoblot los niveles endógenos de CYFIP1, CTTN y ARP2/3 que coprecipitan con ORAI1. En la figura 32 se observa un importante incremento en la interacción de las proteínas evaluadas (CYFIP1, CTTN y ARP2/3) con ORAI1 en respuesta a la estimulación con EGF.

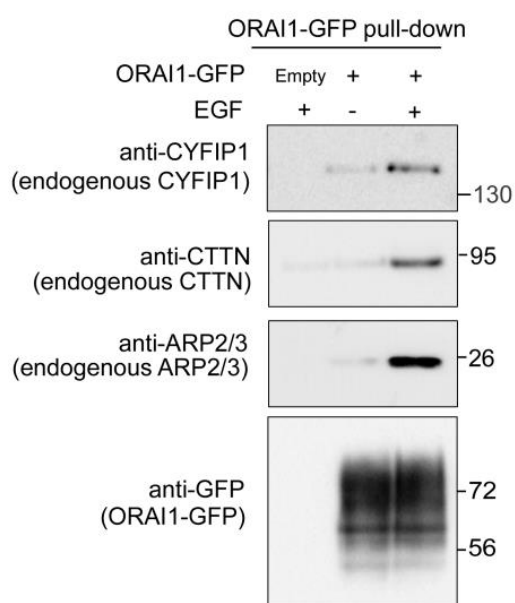


Figura 32. EGF potencia la interacción de ORAI1 con CYFIP1, CTTN y ARP2/3. Las células U2OS ORAI1-KO fueron transfectadas para la expresión de ORAI1-GFP o el vector vacío (GFP-empty), como control negativo, y fueron privadas en medio libre de suero durante 8-10 horas y tratadas con EGF 50 ng/ml durante 3 minutos. ORAI1-GFP se precipitó y las proteínas endógenas coprecipitadas CYFIP1, CTTN y ARP2/3 fueron analizadas por inmunoblot con sus respectivos anticuerpos. La cantidad total de ORAI1-GFP precipitado se evaluó con un anticuerpo anti-GFP. Los inmunoblots son representativos de 3 experimentos independientes.

Este análisis nos permitió confirmar la translocación de ORAI1 a áreas periféricas de la célula donde CTTN y ARP2/3 participan en la formación de lamelipodios. Este resultado permite sugerir la participación de ORAI1 en el complejo proteico que potencia la formación de estructuras necesarias para la migración celular.

2.1.2. La colocalización de ORAI1 y CTTN es modulada por EGF

Para apoyar el resultado anterior, se analizó mediante microscopía óptica la colocalización de ORAI1 y CTTN en respuesta al tratamiento con EGF. Las células U2OS ORAI1-KO se sembraron en cubreobjetos pretratados con colágeno como se indica en el apartado de Materiales y Métodos, se cultivaron en medio DMEM completo y fueron transfectadas para la expresión transitoria de ORAI1-GFP y mCherry-CTTN. Las células fueron privadas durante 8-10 horas en medio libre de suero, posteriormente

estimuladas con 50 ng/ml de EGF y fijadas con PFA. La colocalización de ambas proteínas se analizó mediante microscopía de epifluorescencia de campo ancho. En la figura 33 se muestran imágenes representativas de la colocalización de ORAI1-GFP y mCherry-CTTN en reposo (panel superior) y en respuesta a EGF (panel inferior). En la parte izquierda de los paneles se observa la superposición (*merge*) de las dos proteínas analizadas, mostrándose ORAI1 en verde y CTTN en rojo. Los resultados muestran mayores niveles de colocalización de ORAI1 y CTTN en la periferia celular tras la estimulación con EGF. Para cuantificar el grado de colocalización entre ambas proteínas se calculó el coeficiente de Pearson en la periferia celular que permanecía libre de contactos célula-célula. Los resultados de dicha cuantificación se muestran en el histograma de la figura 33 (gráfica inferior derecha) e indican que hay un enriquecimiento significativo en la colocalización de ORAI1 y CTTN en la periferia celular en respuesta al tratamiento con EGF.

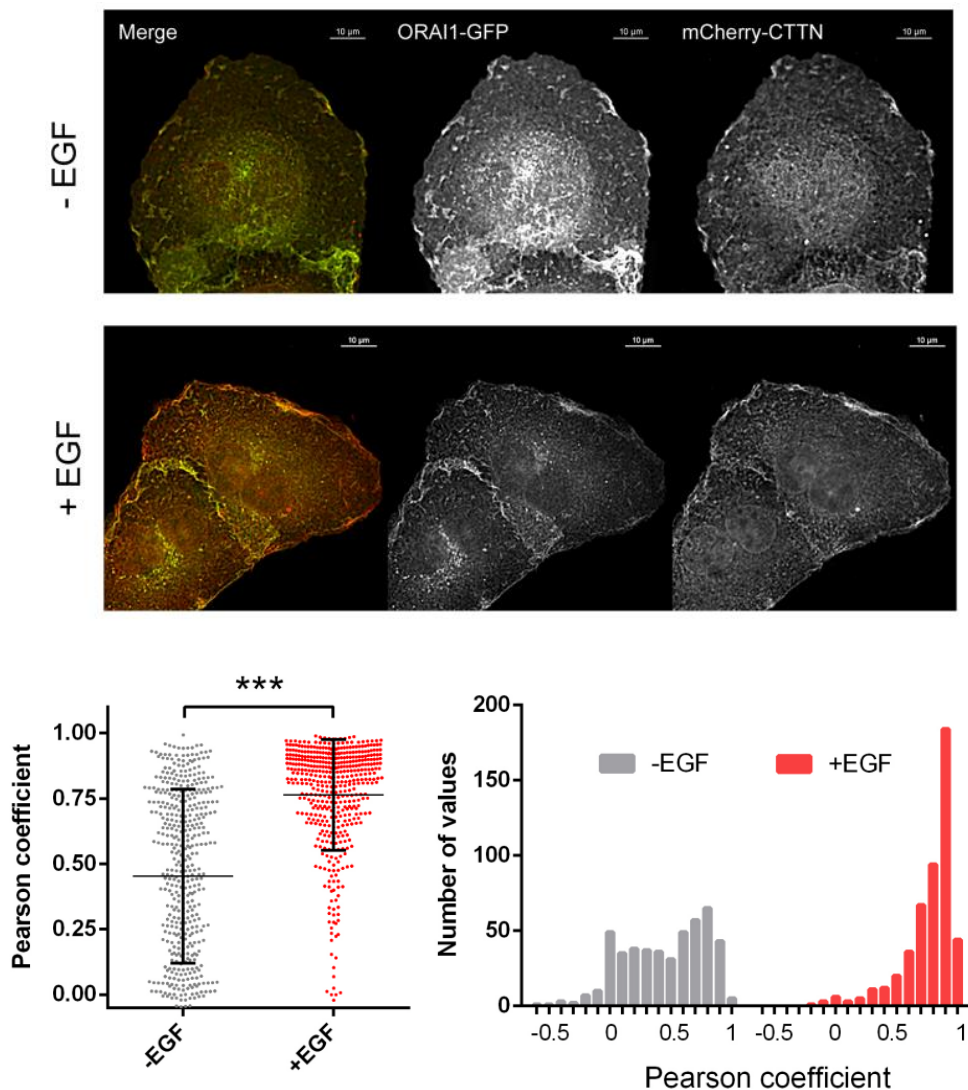


Figura 33. EGF potencia la colocalización de ORAI1 y CTTN en el frente de migración. *Panel superior:* Se sembraron células U2OS ORAI1-KO en cubreobjetos pretratados con colágeno y se realizó una transfección doble para la expresión transitoria de ORAI1-GFP y mCherry-CTTN. Las células fueron privadas en medio libre de suero durante unas 16 horas y estimuladas con EGF 50 ng/ml durante 3 min

Resultados: Capítulo I

(+EGF). Los controles sin la adición de EGF (-EGF) fueron procesados en paralelo. Las células fijadas fueron analizadas mediante microscopía de epifluorescencia para evaluar el coeficiente de correlación de Pearson de GFP y mCherry en la periferia celular. *Panel inferior:* Para el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson se establecieron unos 70-90 ROIs circulares de 1.1-1.18 μm^2 sobre la periferia celular que permanecían libres de contactos célula-célula. Los valores del coeficiente de correlación de Pearson dentro del intervalo 0-1 se representan en la gráfica inferior izquierda. La gráfica inferior derecha muestra el histograma de la distribución de frecuencias de los valores del coeficiente de Pearson.

De los resultados de este apartado podemos concluir que EGF potencia la coprecipitación de ORAI1 con marcadores del frente de migración que participan directamente en la reorganización del citoesqueleto y la formación de lamelipodios. Este resultado, combinado con la inhibición de la migración observada en las células ORAI1-KO, nos conduce a pensar que ORAI1 podría formar parte del entramado molecular que participa en la polarización celular para una migración eficiente. A su vez, la relocalización de ORAI1 en el frente de migración está modulada por EGF, por lo que se concluye que este factor de crecimiento potencia la translocación de ORAI1 a zonas de avance en la periferia cortical de células en migración.

3. RAC1 regula la translocación de ORAI1 al frente de migración

Como se ha visto en detalle en el apartado de Introducción, RAC1 es una GTPasa de la familia RHO que se encuentra enriquecida en el frente de migración, donde estimula el reclutamiento de CTTN, mediante su fosforilación y activación, para que ésta participe en la polimerización del citoesqueleto de actina en colaboración con el complejo ARP2/3 y proteínas del complejo regulador de WAVE (Head et al., 2003; Weed et al., 1998). Nuestros resultados muestran un aumento en la colocalización y coprecipitación de CTTN y ORAI1 tras la estimulación con EGF. Puesto que el frente de migración está enriquecido en receptores tirosina quinasa (RTKs), y RAC1 es una proteína efectora de los RTKs que dirigen a CTTN a la región cortical, nos planteamos si RAC1 pudiera ser una proteína candidata a regular la relocalización subcelular de ORAI1 en el frente de migración a través de la señalización mediada por EGF.

3.1. La actividad de RAC1 controla la localización de CTTN en el frente de migración

En primer lugar, se analizó el papel de RAC1 como agente modulador en la translocación y enriquecimiento de CTTN en la periferia celular. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de colocalización celular entre CTTN y RAC1. Las células U2OS se sembraron en cubreobjetos pretratados con colágeno como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. Posteriormente las células se transfectaron transitoriamente para la doble expresión de mCherry-CTTN y EGFP-RAC1-WT o EGFP-RAC1-Q61L, un mutante constitutivamente activo de RAC1 que interrumpe la actividad GTPasa, lo que

conduce al bloqueo de RAC1 en su conformación activa unida a GTP (Bourne et al., 1991). Una vez transcurridas 36 horas tras la transfección, las células fueron fijadas en PFA y analizadas mediante microscopía de epifluorescencia. En la figura 34 se representa en verde la localización de RAC1 (columna izquierda) y en rojo la localización de CTTN (columna central), mientras que la columna de la derecha corresponde a la superposición de ambos canales (*merge*), lo cual permite analizar en detalle el perfil de colocalización de ambas proteínas mediante el escaneo lineal de sus respectivos perfiles de distribución de fluorescencia.

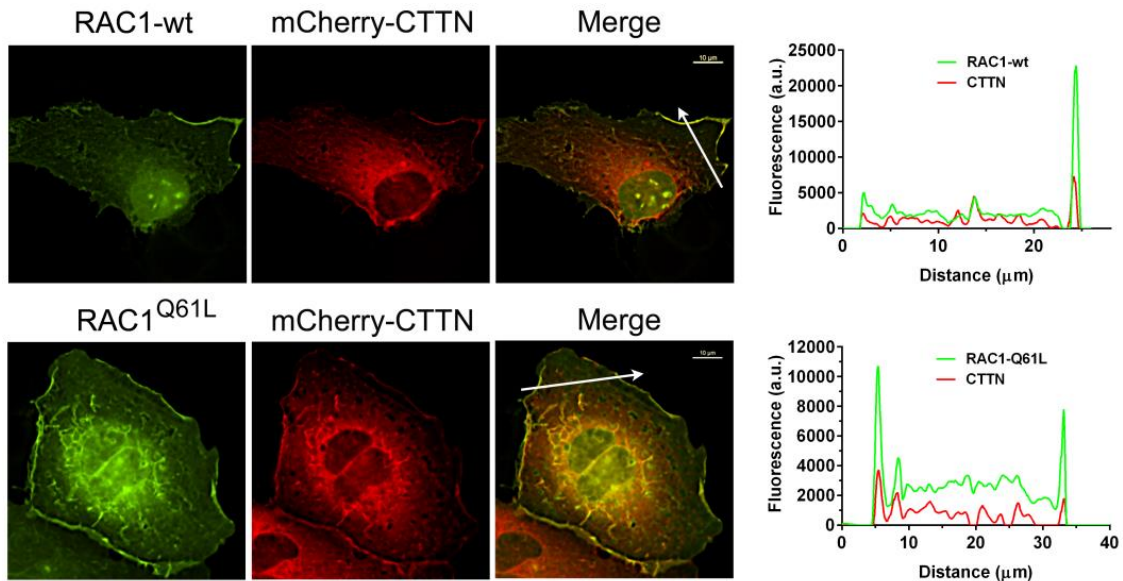


Figura 34. La activación de RAC1 potencia la translocación de CTTN a la periferia celular. Las células se sembraron en cubreobjetos pretratados con colágeno en medio DMEM suplementado y se transfectaron transitoriamente para la expresión de mCherry-CTTN y EGFP-RAC1-WT o EGFP-RAC1-Q61L (RAC1 constitutivamente activo). A las 36 h de la transfección, las células se fijaron y se visualizaron mediante microscopía de epifluorescencia de campo ancho. Los canales Cherry y GFP se registraron secuencialmente utilizando bloques de filtros independientes. Se fusionaron las dos imágenes y se midió la fluorescencia de ambos canales sobre la flecha representada en la imagen. Los valores de fluorescencia, representados en los paneles de la derecha, se cuantificaron con el software NIS-Elements AR. Las imágenes son representativas de un mínimo de 32 células por condición de 3 experimentos independientes. Barra de escala = 10 μm.

Tanto en el panel superior (RAC1-WT) como en el inferior (RAC1-Q61L) se observa un enriquecimiento significativo en la periferia celular de RAC1, así como de CTTN. Este resultado concuerda con el papel descrito de RAC1 como regulador de la translocación de CTTN al frente de migración, pues la forma constitutivamente activa de RAC1 (EGFP-RAC1-Q61L) promueve la localización de CTTN en toda la periferia celular (panel inferior de la figura 34). Sin embargo, ha de señalarse que, a diferencia de la polarización observada con RAC1-WT, no hay una polarización en la localización de CTTN cuando RAC1 está permanentemente activo (RAC1-Q61L). Esta observación puede explicarse por el hecho de que la actividad de RAC1-Q61L es independiente de los receptores de

tirosina quinasas polarizados, de modo que es capaz de desencadenar la formación de lamelipodios en toda la periferia celular, y no solo en la región enriquecida en RTKs.

3.2. Análisis de la relocalización de ORAI1 en el frente de migración en respuesta a la activación o inhibición de RAC1

Para determinar si la actividad de RAC1 está controlando la localización polarizada de CTTN y ORAI1 en zonas de avance de células en migración se decidió realizar un ensayo de colocalización para ambas proteínas en líneas celulares que expresan de forma estable un mutante constitutivamente activo de RAC1 (G12V) y un mutante constitutivamente negativo (T17N). La forma activa de RAC1, RAC1-G12V, interrumpe la actividad GTPasa, al igual que el mutante RAC1-Q61L, y provoca el bloqueo de RAC1 en la conformación unida a GTP (Diekmann et al., 1991), mientras que el mutante negativo de RAC1, RAC1-T17N, simula una conformación inactiva de la proteína al impedir su activación por GTP (Ridley et al., 1992). Al igual que ocurre con el mutante Q61L utilizado en el ensayo anterior, estas dos formas mutantes de RAC1 se han empleado ampliamente en diferentes tipos celulares para estudiar el papel de RAC1 en *ruffles* de membrana, formación de lamelipodios e invasión celular (Aspenström, 2019; Bourne et al., 1991; Michiels et al., 1995; van Leeuwen et al., 1995; Zhuge & Xu, 2001).

Para realizar el ensayo de colocalización se emplearon líneas celulares que expresan de forma estable Flag-RAC1-WT, Flag-RAC1-G12V y Flag-RAC1-T17N. Las células se sembraron en cubreobjetos pretratados con colágeno y se transfectaron con ORAI1-GFP y mCherry-CTTN. A las 36 horas de la transfección fueron fijadas con PFA y analizadas mediante microscopía de epifluorescencia. Los resultados del ensayo de colocalización se muestran en la figura 35, donde se muestra la localización de CTTN en rojo (columna izquierda), en verde la localización de ORAI1 (columna central) y en la columna derecha la colocalización de ORAI1-CTTN (*merge*) resultante de superponer las imágenes anteriores. La primera fila corresponde a las células que sobre-expresan Flag-RAC1-WT, observándose que ORAI1 está localizado de manera muy polarizada en áreas restringidas de CTTN. Sin embargo, el mutante activo RAC1-G12V (segunda fila) provocó una relocalización significativa de ORAI1 en toda la periferia celular, con un perfil de localización idéntico al que presenta CTTN en estas condiciones. Es decir, ambas proteínas se encuentran en la periferia celular, pero se pierde la localización polarizada en el córtex que se observaba en RAC1-WT. Por el contrario, en el mutante negativo de RAC1 (RAC1-T17N, tercera fila) se redujo la translocación de CTTN a la periferia de la misma manera que se inhibió la localización periférica de ORAI1, es decir, se observa una colocalización internalizada para ambas proteínas. Dado que la mutación negativa de RAC1 inhibe el *ruffling* de membrana inducido por factores de crecimiento en fibroblastos (Ridley et al., 1992), estos resultados sugieren que la actividad de RAC1 podría regular a través de EGF la localización polarizada de ORAI1 en el frente de

migración, observándose un efecto inhibitorio del *ruffling* de membrana cuando RAC1 está en su conformación inactiva.

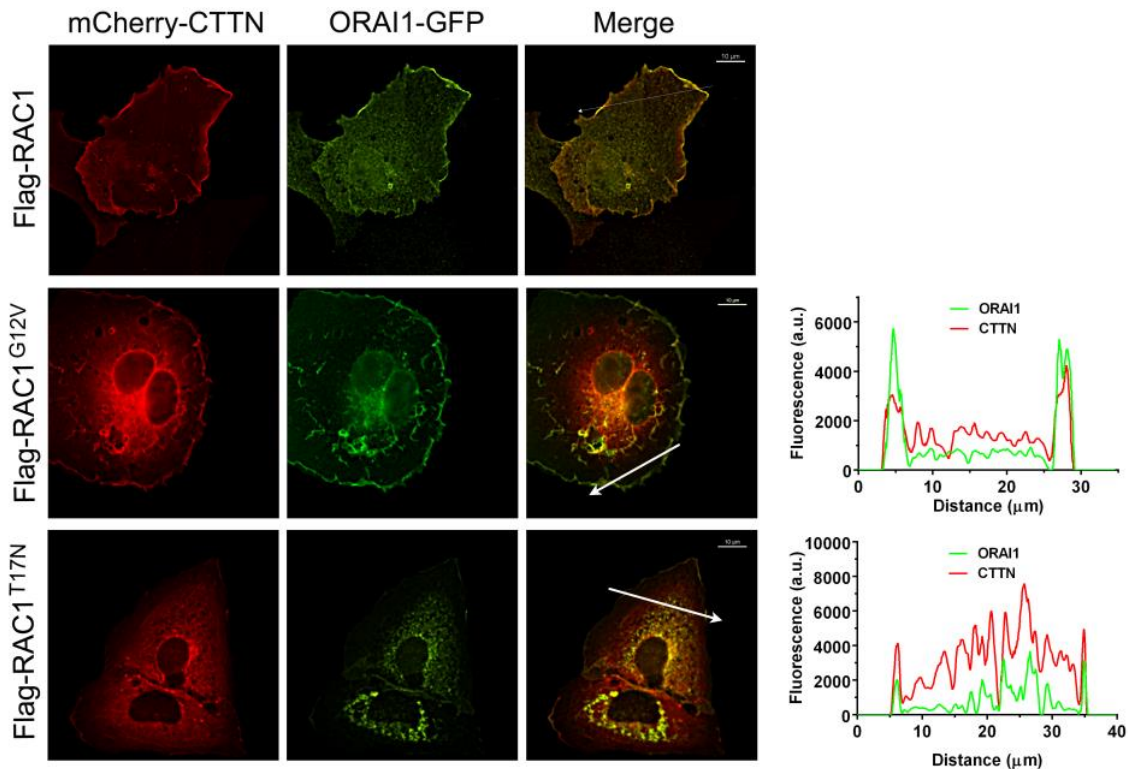


Figura 35. La activación de RAC1 potencia la translocación de ORAI1 a zonas de la periferia celular enriquecidas en CTTN. Las células sembradas en cubreobjetos pretratados con colágeno y que sobre-expresan de forma estable Flag-RAC1-WT, Flag-RAC1-G12V o Flag-RAC1-T17N se transfectaron para la doble expresión transitoria de mCherry-CTTN y ORAI1-GFP. A las 36 h de la transfección, las células se fijaron y se visualizaron mediante microscopía de epifluorescencia de campo ancho. Los canales Cherry y GFP se registraron secuencialmente utilizando bloques de filtros independientes. En las imágenes CTTN se muestra en rojo (columna izquierda) y ORAI1-GFP en verde (columna central). La superposición de ambas proteínas se obtuvo fusionando las dos imágenes y se midió la fluorescencia de ambos canales (*merge*, columna derecha) sobre la flecha representada en la imagen. Los valores de fluorescencia, representados en los paneles de la derecha, se cuantificaron con el software NIS-Elements AR. Las imágenes son representativas de un mínimo de 26 células por condición de 3 experimentos independientes. Barra de escala = 10 μm .

Para cuantificar la extensión del enriquecimiento de ORAI1 en las áreas de CTTN evaluamos el nivel de ORAI1-GFP cortical y total en células individuales, así como la relación de CTTN cortical y total según se detalla en el apartado de Materiales y Métodos. La cuantificación del análisis se representa en la figura 36, en la cual se observa que RAC1-G12V provocó un aumento significativo de los niveles corticales de ORAI1 y CTTN, mientras que RAC1-T17N redujo drásticamente el nivel de ambas proteínas en la periferia celular (figura 36, paneles A y B). El nivel relativo de ORAI1 cortical respecto al nivel de CTTN cortical no mostró cambios significativos en cada una de estas condiciones experimentales (figura 36, panel C). Estos resultados sugieren que ambas proteínas

Resultados: Capítulo I

tienen un comportamiento similar cuando la actividad de la proteína RAC1 es modulada, ya que se dirigen a la periferia cuando RAC1 está activo (RAC1-G12V) y quedan internalizadas cuando RAC1 está inactivo (RAC1-T17N).

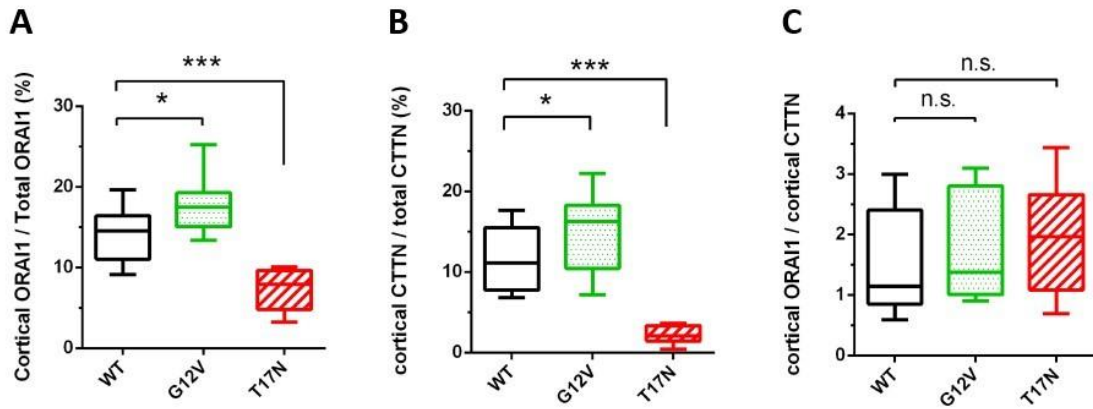


Figura 36. Cuantificación de ORAI1 y CTTN cortical con respecto a ORAI1 y CTTN total. La cuantificación se llevó a cabo con los datos del ensayo de colocalización mostrado en la figura 35. Las células individuales ($n > 25$ para cada condición experimental: Flag-RAC1-WT, Flag-RAC1-G12V y Flag-RAC1-T17N) fueron analizadas midiendo la intensidad total en los canales GFP y mCherry con el software NIS-Elements AR. La intensidad de la fluorescencia cortical fue analizada de una única región de interés (ROI) que cubría la periferia celular, excluyendo las áreas de contacto célula-célula. Las ROIs analizadas tenían un tamaño $0.66 \pm 0.22 \mu\text{m}$. La intensidad de la fluorescencia total se analizó con una única ROI que incluía la célula individual completa. Las muestras se analizaron con el test estadístico t-Student para muestras independientes. (n.s., no significativo) $p > 0.05$; (*) $p < 0.05$; (***) $p < 0.001$.

Como análisis complementario, y en relación con la localización periférica de CTTN y ORAI1 en células que sobre-expresan RAC1-G12V, decidimos realizar un ensayo adicional para analizar esta vez la colocalización de ORAI1 y RAC1-G12V. Se sembraron células U2OS WT y se transfectaron para la expresión de mCherry-RAC1-G12V y ORAI1-GFP. En la figura 37 se muestran la localización de RAC1-G12V en rojo y la de ORAI1 en verde, observándose un patrón de colocalización similar para ambas proteínas en la imagen resultante de superponer ambos canales (*merge*).

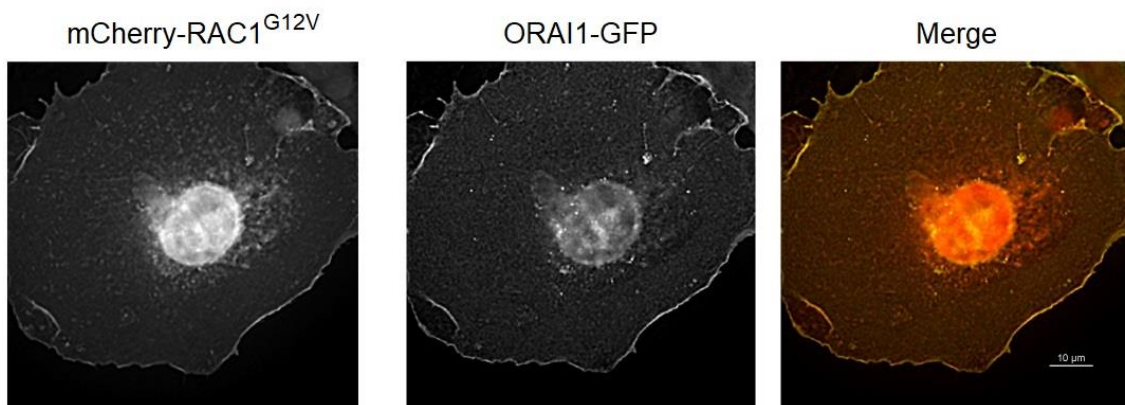


Figura 37. Análisis de la colocalización de ORAI1 y RAC1-G12V. Las células U2OS WT fueron sembradas en cubreobjetos pretratados con colágeno como se describe en Materiales y Métodos y transfectadas para la doble expresión transitoria de mCherry-RAC1-G12V y ORAI1-GFP. A las 24 horas de la transfección, las células fueron fijadas con PFA al 4% y visualizadas bajo microscopía de epifluorescencia de campo ancho. Los canales Cherry y GFP fueron fotografiados secuencialmente usando filtros independientes, mostrándose RAC1-G12V en rojo (imagen izquierda), ORAI1-GFP en verde (imagen central) y la superposición de ambos marcadores (*merge*) en la imagen derecha. Las imágenes son representativas de 22 células de 2 experimentos independientes.

3.3. Análisis del *ruffling* de membrana en el frente de migración en respuesta a la activación o inhibición de RAC1

Una vez analizado el patrón de localización de ORAI1 en respuesta a la actividad de RAC1, decidimos estudiar el *ruffling* de membrana en el frente de migración en respuesta a la activación o inhibición de RAC1. Para ello, células que expresaban de forma estable Flag-RAC1-WT, Flag-RAC1-G12V y Flag-RAC1-T17N se sembraron en placas ibidi pretratadas con colágeno y se transfectaron para la expresión transitoria de ORAI1-GFP y mCherry-CTTN. Transcurridas 24 horas se procedió a analizar en célula viva el *ruffling* de membrana mediante microscopía de epifluorescencia. Para evaluar la dinámica de ORAI1 y CTTN en el *ruffling* de membrana se analizó la variación en las intensidades de fluorescencia de GFP y Cherry según se describe en Materiales y Métodos y en trabajos previos del laboratorio (Lopez-Guerrero, Tomas-Martin, et al., 2017). En la figura 38 se muestran imágenes representativas de cada condición experimental. Las imágenes se tomaron cada 3 segundos durante un tiempo total de 4 minutos. En ellas aparecen indicadas mediante flechas las ROIs que se seleccionaron en la corteza celular para evaluar las dinámicas de ORAI1-CTTN a partir de la intensidad de fluorescencia emitida por sus marcadores. Tal y como se observa en las gráficas de la figura 38, la intensidad de fluorescencia de ORAI1-GFP y mCherry-CTTN en áreas corticales presentaba un alto grado de fluctuación durante el tiempo de ensayo debido al *ruffling* de membrana en las células que expresan Flag-RAC1-WT y Flag-RAC1-G12V. En cambio, las fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia disminuyeron significativamente en las células que expresan el mutante inactivo Flag-RAC1-T17N.

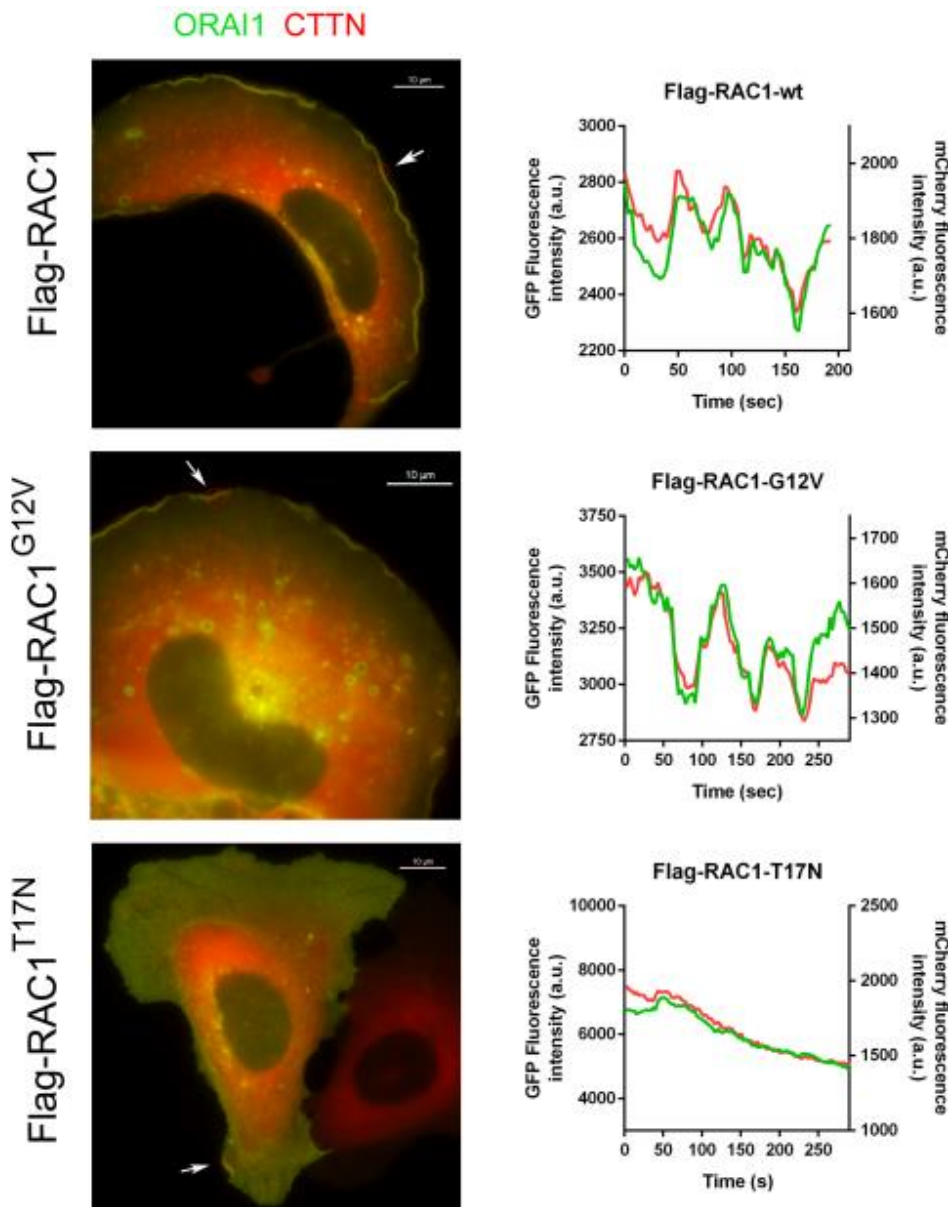


Figura 38. Regulación por RAC1 de la dinámica de ORAI1-CTTN periférico y del *ruffling* de membrana.

Las células U2OS que expresan de forma estable Flag-RAC1-WT, Flag-RAC1-G12V o Flag-RAC1-T17N se sembraron en placas ibidi pretratadas con colágeno y fueron transfectadas para la expresión transitoria de ORAI1-GFP y mCherry-CTTN. A las 24 horas siguientes se monitorizó la fluorescencia para ambos marcadores en células vivas en medio L-15 de Leibovitz suplementado con 10% de FBS. Se seleccionaron diferentes ROIs (marcadas por las flechas) con el fin de evaluar la variación de la intensidad de la fluorescencia en cada condición experimental. Las emisiones de fluorescencia de ORAI1-GFP (línea verde) y de mCherry-CTTN (línea roja) se registraron cada 3 segundos durante 4 minutos, y la variación en su intensidad de fluorescencia aparece representada en el panel de la derecha. Barra de escala = 10 μ m.

3.4. Análisis de la localización de ORAI1 en células que expresan RAC1 inactivo

Puesto que los resultados anteriores mostraron una acumulación de ORAI1 en vesículas intracelulares en células que expresan RAC1-T17N (figura 35), así como una disminución de ORAI1 en zonas corticales donde tiene lugar el *ruffling* de membrana (figura 38), nos propusimos estudiar si existe alguna región de acumulación intracelular de ORAI1 cuando RAC1 está inactivo. Para ello diseñamos un ensayo de colocalización de ORAI1 con diferentes marcadores del transporte vesicular: Sec13a (RE-Golgi), GM-130 (cis-Golgi), TGN46 (trans-Golgi), EEA1 (endosomas) y LAMP1 (lisosomas). Las células que sobre-expresaban Flag-RAC1-T17N se transfectaron con el vector ORAI1-GFP y a las 24 horas se fijaron con PFA, realizándose a continuación un ensayo de colocalización con anticuerpos anti-Sec13a, anti-GM130, anti-TGN46, anti-EEA1 y anti-LAMP1. En la figura 39 se muestra la localización de ORAI1-GFP en verde en la columna izquierda y la localización de los diferentes marcadores de transporte intracelular en rojo (columna central), lo cual permite superponer ambas imágenes (*merge*) y observar la colocalización de ORAI1 con estos marcadores en la columna de la derecha. En este experimento se aprecia claramente que ORAI1 se acumula en vesículas intracelulares cuando RAC1 está inactivo. Además, de los diferentes marcadores analizados, solamente GM130 mostró un perfil de localización similar a ORAI1 en células que sobre-expresaban RAC1-T17N. De estos resultados se concluye que la inactivación de RAC1 inhibe parcialmente la translocación de ORAI1 a la membrana plasmática y que el reservorio mayoritario de ORAI1 internalizado se localiza principalmente en el cis-Golgi.

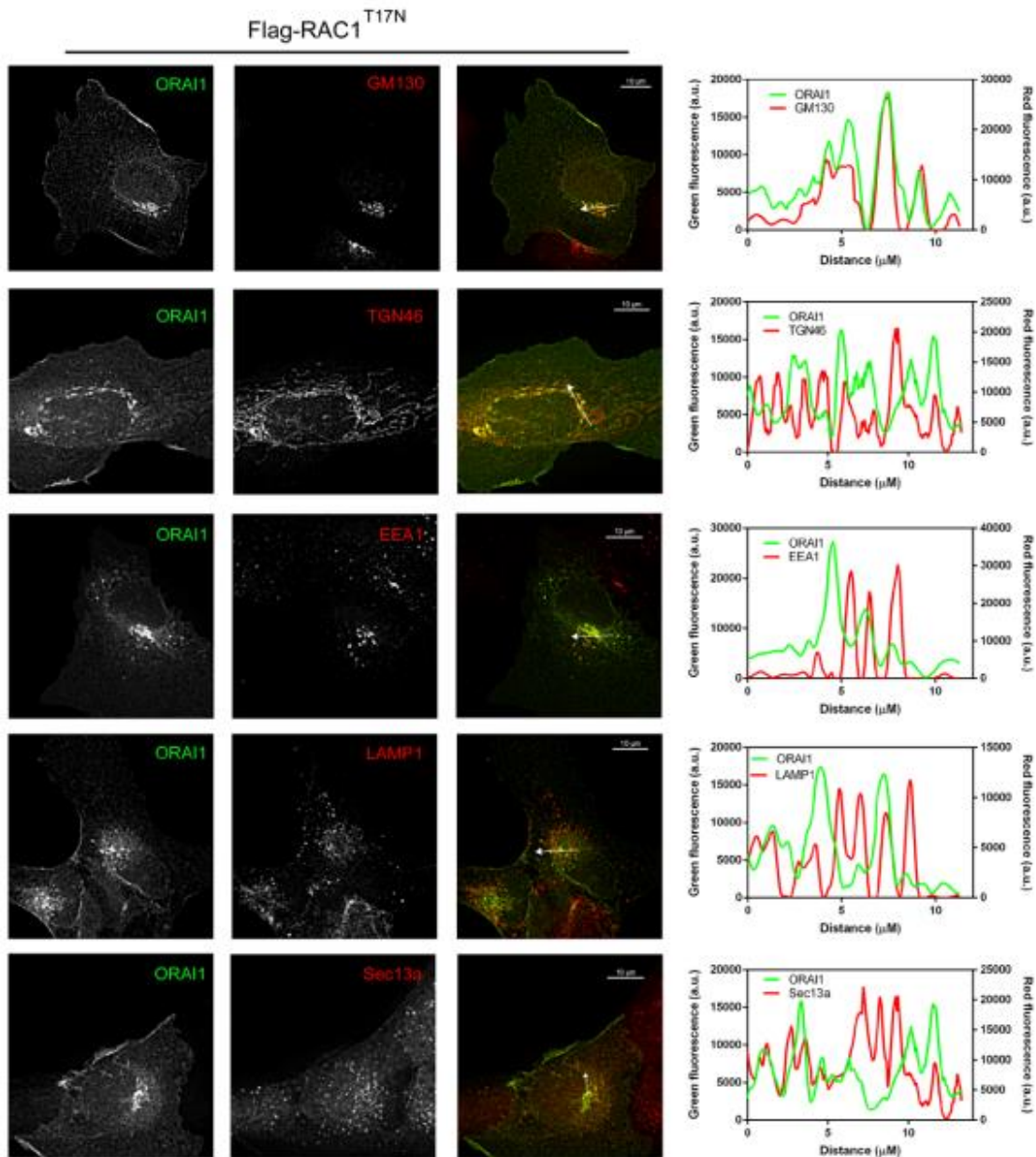


Figura 39. Colocalización de ORAI1 con marcadores de transporte intracelular en células que sobre-expresan RAC1-T17N. *Panel izquierdo:* Las células U2OS que expresan de manera estable Flag-RAC1-T17N fueron transfectadas para la expresión transitoria de ORAI1-GFP. Las células fueron fijadas a las 24 horas de la transfección y se realizó un ensayo de colocalización como se detalla en el apartado de Materiales y Métodos con GM130, TGN46, EEA1, LAMP1 y Sec13a. Los anticuerpos secundarios estaban marcados con Alexa Fluor 594. En la figura, ORAI1-GFP se muestra en verde (columna izquierda), los marcadores de transporte intracelular (GM130, TGN46, EEA1, LAMP1 y Sec13a) se muestran en rojo (columna central) y en el panel de la derecha se muestra la superposición de ambos marcadores (*merge*). La fluorescencia de ambos canales se midió sobre la flecha representada en las imágenes de la columna derecha (*merge*) y los resultados se muestran en las gráficas correspondientes. Estas imágenes son representativas de dos experimentos independientes (> 20 células por condición). Barra de escala = 10 μm . *Panel derecho:* Los valores de fluorescencia se cuantificaron con el software NIS-Elements AR.

Con el fin de profundizar en el papel de la actividad de RAC1 en la localización de ORAI1, decidimos analizar si el tratamiento de las células con NSC 23766, un inhibidor de RAC1, provocaba la acumulación de ORAI1 en vesículas cis-Golgi de manera similar a lo observado en RAC1-T17N. En este caso, las células U2OS fueron transfectadas para la expresión transitoria de ORAI1-GFP, tratadas con NSC 23766 50 μM durante 8 horas y fijadas con PFA. Posteriormente se realizó un ensayo de colocalización con el anticuerpo anti-GM130 en las mismas condiciones experimentales que el anterior ensayo (figura 39), descrito con detalle en Materiales y Métodos. En la figura 40 se representa el resultado de este experimento, mostrándose en verde ORAI1-GFP (imagen izquierda) y en rojo el marcador del cis-Golgi GM130 (imagen central). Si se analizan en detalle los perfiles de localización de ORAI1 y GM130, se observa que en presencia de NSC 23766, ORAI1 se encuentra distribuido de manera más difusa por todo el citoplasma, sin mostrar una acumulación evidente y exclusiva en el cis-Golgi, una observación que se confirmó al analizar la fluorescencia de ambos canales (ORAI1 en verde y GM130 en rojo, figura 40, panel derecho). De este resultado se deriva, por una parte, que al inhibir RAC1 con NSC 23766 la localización de ORAI1 en vesículas intracelulares no es tan intensa como en el caso del mutante RAC1-T17N y, por otro lado, los datos sugieren que la inhibición farmacológica de RAC1 no altera el tráfico vesicular entre el RE y Golgi, aunque esta observación necesitaría ser confirmada con experimentos complementarios.

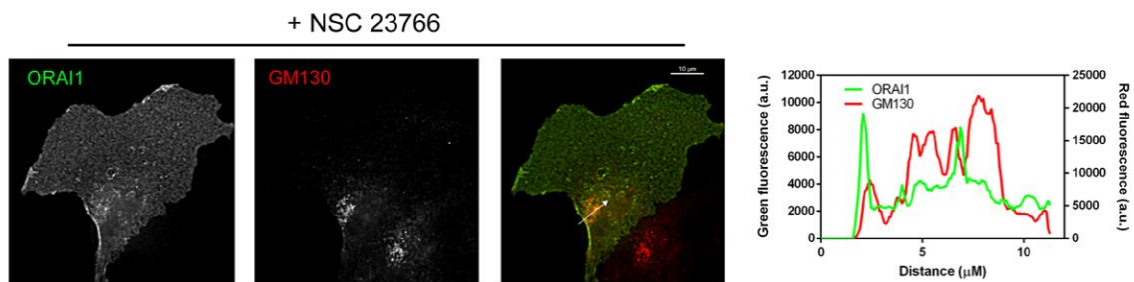


Figura 40. Colocalización de ORAI1 con el marcador del cis-Golgi (GM130) tras la inhibición farmacológica de RAC1 por NSC 23766. Las células U2OS fueron tratadas con NSC 23766 50 μM durante 8 horas, posteriormente fueron fijadas y se llevó a cabo un ensayo de colocalización de ORAI1-GFP con GM130, marcándose su anticuerpo secundario con Alexa Fluor 594. *Panel izquierdo:* ORAI1-GFP se muestra en verde (imagen izquierda), GM130 en rojo (columna central) y en la imagen de la derecha se representó la superposición de ambos marcadores. La fluorescencia de ambos canales se midió sobre la flecha representada en la imagen del panel derecho. Las imágenes son representativas de 26 células de 2 experimentos independientes. Barra de escala = 10 μm . *Panel derecho:* Los valores de fluorescencia a lo largo de la flecha se cuantificaron con el software NIS-Elements AR.

Tras obtener estos resultados nos planteamos si el tráfico vesicular entre el RE y Golgi se inhibe al expresar RAC1-T17N en estas células, y si es éste el motivo por el que ORAI1 se acumula casi de forma exclusiva en vesículas en estas condiciones. De este modo el siguiente paso fue analizar la vía secretora RE-Golgi en células que sobre-expresan RAC1-T17N.

Resultados: Capítulo I

3.4.1. Análisis de la vía secretora mediante la luciferasa *Gaussia* en células que expresan RAC1 inactivo

En este punto del trabajo nuestro objetivo fue determinar si ORAI1 se acumulaba en vesículas intracelulares debido a la regulación directa y específica de la actividad de RAC1, o si por el contrario esta localización de ORAI1 era consecuencia de que RAC1 inactivo interrumpe de forma indiscriminada la vía secretora de proteínas en estas células. Para determinar si la inhibición de RAC1, tanto en RAC1-T17N como por NSC 23766, interrumpe la vía secretora, se generaron líneas celulares que expresan de manera estable la luciferasa *Gaussia* en células U2OS WT y Flag-RAC1-T17N siguiendo lo descrito en trabajos previos (Badr et al., 2007). Las células que expresan la luciferasa *Gaussia* unida a YFP (Gluc-YFP) se sembraron en placas de 96 multipocillos y se incubaron con NSC 23766 50 μ M durante 8 horas cuando fue requerido para analizar esta condición. Tras 28-30 horas se midió la actividad secretada de Gluc como indicador del estado de la vía secretora.

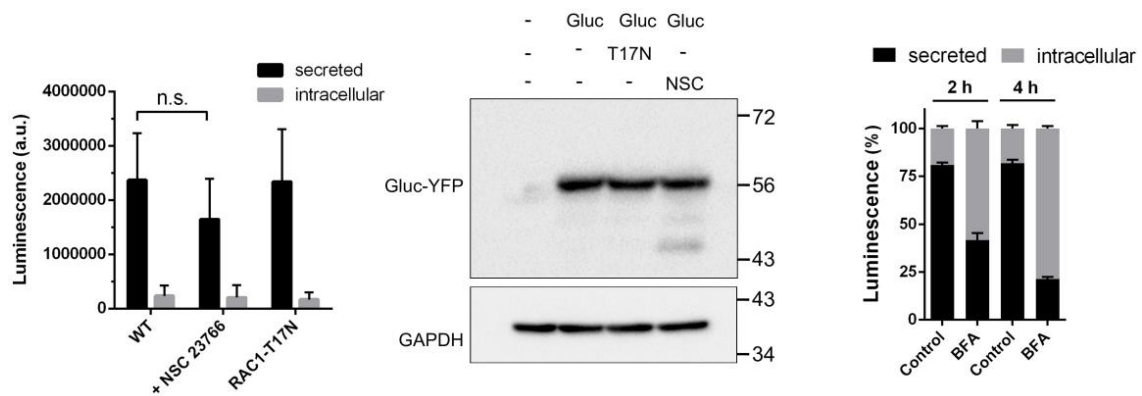


Figura 41. Estudio del efecto de RAC1-T17N y NSC 23766 sobre la actividad luciferasa de *Gaussia* secretada. *Panel izquierdo:* Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos en medio DMEM suplementado con 10% de FBS. La actividad secretada y la actividad intracelular de la luciferasa de *Gaussia* se midieron tras 28 horas de cultivo (la sobre-expresión de Flag-RAC1-T17N se indujo con doxiciclina durante las últimas 22 horas) y el tratamiento con NSC 23766 50 μ M se realizó durante las últimas 8 horas de cultivo. Los valores mostrados son la media \pm S.D. a partir de un n = 15 pocillos y de 3 experimentos independientes. Las muestras se analizaron con el test estadístico t-Student para muestras independientes. (n.s., no significativo) $p > 0.05$. *Panel central:* Los niveles de expresión de la proteína intracelular Gluc-YFP se evaluaron a partir de lisados celulares mediante inmunoblot utilizando un anticuerpo anti-GFP. *Panel derecho:* Las células se trataron con 5 μ g/ml de brefeldina A (BFA) durante 2 y 4 horas para evaluar la inhibición de la vía secretora en las células como control negativo del experimento.

En la imagen izquierda de la figura 41 se representa la actividad secretada y la actividad intracelular de la luciferasa en ausencia y presencia de NSC 23766 y en células que sobre-expresan Flag-RAC1-T17N. En ella se observa que la actividad Gluc secretada no experimenta cambios significativos cuando RAC1 está inhibido por la mutación T17N o por el tratamiento con NSC 23766. A su vez, los niveles de expresión de la proteína de

fusión Gluc-YFP se analizaron mediante inmunoblot empleando un anticuerpo anti-GFP. En la figura 41 se observa una expresión similar de Gluc-YFP, tanto en células RAC1-T17N como en células WT tratadas o sin tratar con NSC 23766. Como control negativo del experimento se utilizó brefeldina A, un conocido inhibidor del transporte anterógrado RE-Golgi que inhibió la secreción de Gluc tras 2 y 4 horas de tratamiento (figura 41, panel derecho). De los resultados obtenidos se concluyó que la inhibición de RAC1, tanto por la mutación T17N como por el tratamiento farmacológico con NSC 23766, no afecta a la actividad secretora de las células, lo cual permite sugerir que la actividad RAC1 controla de forma específica la localización subcelular de ORAI1, ya que estos resultados validan el uso de este inhibidor farmacológico y del mutante negativo T17N para investigar el papel de RAC1 en la translocación de ORAI1 a zonas de *ruffling* de la membrana plasmática.

3.5. Estudio del papel de RAC1 en la localización subcelular de ORAI1, reorganización del citoesqueleto y migración celular

La alteración en la relación de la localización intracelular-periférica de ORAI1 modulada por la actividad de RAC1 mediante el empleo de los mutantes G12V y T17N, sumado a que RAC1 controla el enriquecimiento de marcadores del frente de migración, como CTTN, con los que interacciona ORAI1 tras la estimulación con EGF, nos llevó a estudiar una hipotética modulación en la localización de ORAI1 en el frente de migración dependiente de la actividad de RAC1.

3.5.1. Análisis de la interacción de la proteína RAC1 en su conformación activa con ORAI1

Para evaluar la actividad de RAC1 en presencia de EGF, se llevó a cabo un ensayo de precipitación de RAC1 activo. Para ello, las células U2OS WT se sembraron en medio completo (DMEM con 10% de FBS) y se dejaron crecer durante 36 horas. Tras una privación de suero de 8-10 horas, las células fueron estimuladas con 50 ng/ml de EGF durante diferentes tiempos (0-5 min). Con los lisados celulares obtenidos se llevó a cabo un ensayo de precipitación de RAC1 activo (RAC1-GTP) con GST-PAK1-PBD, tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. El análisis del nivel de RAC1-GTP y RAC1-total se llevó a cabo mediante inmunoblot utilizando un anticuerpo anti-RAC1 (figura 42).

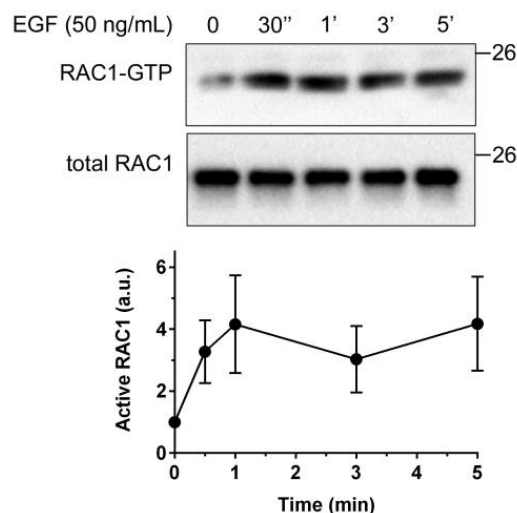
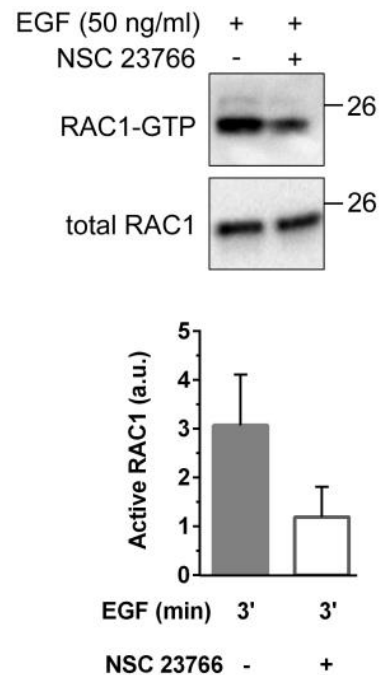


Figura 42. Evaluación de la actividad de RAC1 en respuesta a la estimulación con EGF. *Panel superior:* Las células U2OS WT se sembraron en medio DMEM completo y, tras la deprivación de suero durante 8-10 horas, se trataron con 50 ng/ml de EGF durante un tiempo variable de 0-5 min. A partir de los lisados obtenidos se analizó la activación endógena de RAC1 (RAC1-GTP) a través de un ensayo de coprecipitación con GST-PAK1-PBD (véase el apartado de Materiales y Métodos). Posteriormente, se analizaron mediante inmunoblot los niveles de RAC1-GTP y total RAC1 empleando un anticuerpo anti-RAC1 para su inmunodetección. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. *Panel inferior:* Cuantificación de RAC1 activo en los diferentes tiempos de estimulación. La cuantificación se realizó a partir de los resultados de 3 experimentos independientes.

Al analizar los resultados que se muestran en la figura 42 observamos que RAC1 se activó en respuesta a EGF en un marco temporal que va de los 30 segundos a 1 minuto tras la estimulación, manteniéndose dicha activación en niveles similares en los tiempos sucesivos del tratamiento. Para tratar de establecer una relación entre la activación de RAC1 y la translocación de ORAI1 al frente de migración, comparamos el tiempo de tratamiento con EGF donde se observa el incremento inicial en la activación de RAC1, con el tiempo en el que tiene lugar la máxima interacción de ORAI1-CTTN (figura 31). De este modo, observamos que la activación de RAC1 se produce en una ventana temporal de 30-60 segundos de estimulación con EGF, mientras que el máximo nivel de coprecipitación de ORAI1 con CTTN tuvo lugar en el minuto 3 tras el tratamiento con EGF. Este resultado, por tanto, apoya la hipótesis de que RAC1 es un activador de la translocación y relocalización de ORAI1 a zonas del frente de migración celular a través de una ruta de señalización mediada por EGF-RAC1-CTTN-ORAI1.

Para estudiar esta ruta de señalización se utilizó de nuevo el inhibidor farmacológico de RAC1, NSC 23766. La eficiencia de NSC 23766 como inhibidor de RAC1 tras la estimulación con EGF se analizó mediante la precipitación de RAC1 activo (RAC1-GTP) en células U2OS WT. En la figura 43 se observa que la cantidad de RAC1 activo (RAC1-GTP) tras el tratamiento con EGF disminuyó en respuesta al tratamiento con NSC 23766, mientras que el nivel endógeno de proteína total no se vio afectado.

Figura 43. Análisis del efecto inhibitorio de NSC 23766 sobre la estimulación de RAC1 con EGF. *Panel superior:* Las células U2OS WT se sembraron en medio DMEM completo y, tras una privación de suero e incubación con NSC 23766 durante 8-10 horas, se estimularon con 50 ng/ml de EGF durante 3 minutos. Posteriormente se realizó un ensayo de coprecipitación de RAC1-GTP con el complejo GST-PAK-PBD para evaluar la cantidad de RAC1 que se activa en respuesta a EGF en células en reposo y/o tras el tratamiento con NSC 23766. Los niveles de RAC1 activo (RAC1-GTP) y RAC1 total se analizaron mediante inmunoblot usando un anticuerpo anti-RAC1. Los blots son representativos de 3 experimentos independientes. *Panel inferior:* La cuantificación de la inhibición de RAC1 por NSC 23766 en presencia de EGF se realizó mediante el análisis de 3 experimentos independientes. Los datos representan la media \pm S.D.



Una vez analizada la inhibición de RAC1 tras el tratamiento con NSC 23766, el siguiente paso fue estudiar la posible interacción entre RAC1 y ORAI1. Una primera aproximación fue determinar si ambas proteínas coprecipitaban en un mismo complejo y si esta interacción estaba regulada por la actividad de RAC1. Para ello, se sembraron células U2OS WT y se transfectaron para la expresión transitoria de ORAI1-GFP. Las células fueron privadas de suero e incubadas con NSC 23766 50 μ M durante 8-10 horas y tratadas posteriormente con 50 ng/ml de EGF durante 3 minutos. A continuación, se analizó la cantidad de RAC1 endógeno que coprecipitaba con ORAI1 en condición de reposo y en respuesta a EGF en presencia y ausencia de NSC 23766.

En la figura 44 se observa que RAC1 coprecipitó con ORAI1 tras la estimulación de las células con EGF, mientras que dicha coprecipitación disminuyó drásticamente tras el tratamiento de las células con NSC 23766. Estos resultados sugieren, por tanto, que ORAI1-GFP se une al mismo complejo molecular del que forma parte RAC1 activo en células estimuladas con EGF.

Resultados: Capítulo I

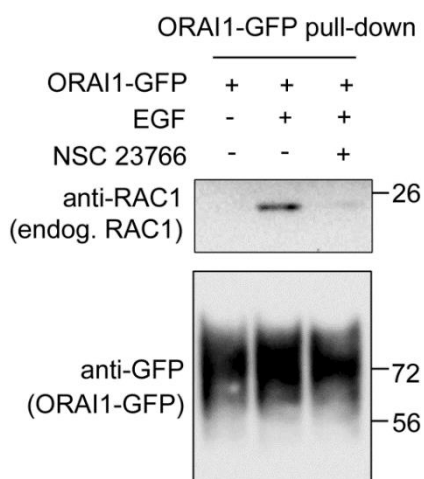


Figura 44. Análisis de la coprecipitación de RAC1 con ORAI1 tras la estimulación con EGF. Se sembraron células U2OS WT y se transfectaron para la expresión transitoria de ORAI1-GFP. Las células se privaron de suero y se preincubaron con NSC 23766 50 μ M durante 8 h antes del tratamiento con EGF (50 ng/ml durante 3 min) en presencia y ausencia del inhibidor de RAC1. A continuación, se llevó a cabo un ensayo de precipitación de ORAI1-GFP con una resina de agarosa con afinidad por GFP (GFP-Trap). El nivel endógeno de RAC1 coprecipitado se evaluó mediante inmunoblot utilizando un anticuerpo anti-RAC1 (panel superior) y la cantidad de ORAI1-GFP se cuantificó mediante un anticuerpo anti-GFP (panel inferior). Los resultados corresponden a 3 experimentos independientes procedentes de 3 cultivos celulares diferentes.

En resumen, de estos resultados se deriva como conclusión que RAC1 se activa en respuesta al tratamiento con EGF y que ORAI1 a su vez coprecipita con RAC1, perdiéndose dicha interacción cuando RAC1 es inactivado por NSC 23766. En lo que respecta al tiempo mínimo necesario de estimulación con EGF, los datos obtenidos fijan la activación de la proteína RAC1 en una ventana temporal más rápida que el tiempo requerido para una coprecipitación óptima de ORAI1 con diferentes marcadores del frente de migración (CTTN, ARP2/3 y CYFIP1). Estos resultados nos permiten hipotetizar que RAC1 es un activador de la translocación de ORAI1 al frente de migración celular a través de una ruta de señalización mediada por EGF-RAC1-CTTN-ORAI1.

3.5.2. Estudio del efecto de la inhibición de RAC1 sobre la migración celular

Si recapitulamos los resultados obtenidos hasta el momento, ORAI1 podría estar uniéndose a un complejo molecular en zonas de *ruffles* de membrana cuando RAC1 es activado por EGF, por lo que planteamos como hipótesis que la migración celular podría ser controlada por la actividad RAC1 y la subsecuente translocación de ORAI1 al frente de migración. Esta hipótesis, unida al impacto que provoca la ausencia de ORAI1 en el tamaño y direccionalidad de los lamelipodios, nos llevó a analizar cómo afecta la inhibición de RAC1 a la migración celular con el fin de establecer una correlación entre la actividad de RAC1, ORAI1 y migración celular.

Para llevar a cabo dicho análisis, se sembraron células U2OS WT en placas pretratadas con colágeno como se detalla en el apartado de Materiales y Métodos. Las células se trataron con NSC 23766 50 μ M durante un mínimo de 8 horas y transcurrido ese tiempo se procedió a monitorizar un ensayo de motilidad aleatoria 2D, capturando imágenes con el objetivo de campo claro durante 4 horas con una frecuencia de 2

minutos entre cada captura. En la figura 45 se muestran las trazas de la migración de las células en presencia y ausencia de NSC 23766.

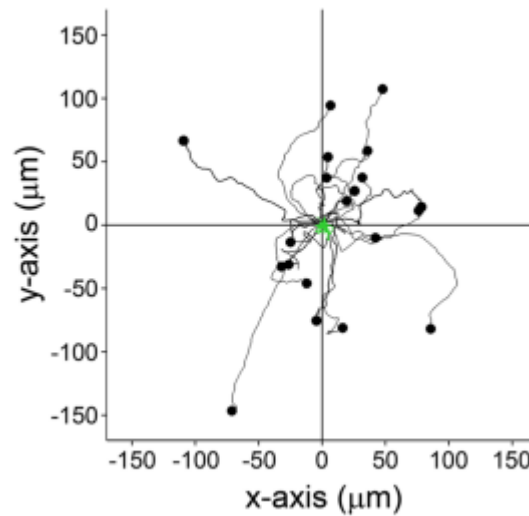


Figura 45. Ensayo de motilidad en células U2OS WT tratadas con NSC. Se sembraron células U2OS WT en placas de 35 mm pretratadas con colágeno. La siembra se llevó a cabo en medio libre de bicarbonato Leibovitz's L-15 suplementado con 10% de suero, en ausencia y presencia de NSC 23766 50 μM durante un tiempo mínimo de 8 horas antes de proceder al análisis del ensayo. El ensayo de motilidad celular se monitorizó durante 3-4 horas tomando imágenes cada 2 minutos con un objetivo de campo claro. En la imagen se muestran las trazas de 20-21 células por condición, correspondiendo el color verde a las células tratadas con NSC 23766 y el color negro a las células sin tratamiento.

En los subapartados que aparecen a continuación se procede a explicar en detalle el resultado de cada uno de los parámetros evaluados.

3.5.2.1. Análisis de la inhibición de RAC1 sobre la velocidad de migración celular

A través de las imágenes obtenidas durante el ensayo de motilidad de la figura 45 se analizó la velocidad de migración que presentaban las células en ausencia y presencia de NSC 23766, calculándose dicha velocidad a través de la distancia que migra la célula en un tiempo determinado. En la gráfica de barras de la figura 46 se representan los datos de la velocidad de migración ($\mu\text{m}/\text{min}$), y se observa que la velocidad de migración disminuye de forma significativa cuando las células son tratadas con NSC 23766 respecto a la situación control.

Resultados: Capítulo I

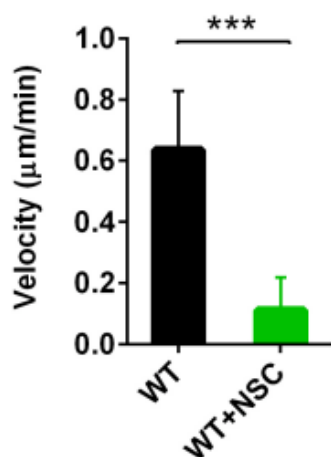
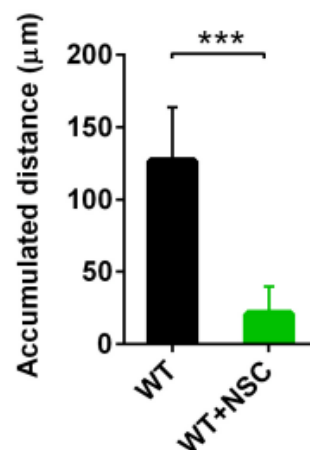


Figura 46. Análisis de la velocidad de migración celular tras la inhibición de RAC1. En la imagen se representan los datos correspondientes a la velocidad de migración de las células U2OS WT tratadas con NSC 23766 (símbolos verdes) o sin tratamiento (símbolos negros) a partir de las imágenes obtenidas de los ensayos de motilidad. Los datos corresponden a 2 ensayos independientes con un mínimo de 36 células por condición. Las muestras se analizaron con el test estadístico t-Student para muestras independientes. (***) $p < 0.001$.

3.5.2.2. Análisis de la inhibición de RAC1 sobre la distancia acumulada

A partir del ensayo de motilidad aleatoria descrito se evaluó también la distancia acumulada de las células U2OS WT en presencia y en ausencia del inhibidor farmacológico de RAC1. En la figura 47 se representan los resultados a partir de un mínimo de 20 células analizadas por condición experimental y se observa una reducción significativa en la distancia acumulada de las células que fueron tratadas con NSC 23766 respecto a la situación control.

Figura 47. Análisis de la distancia acumulada de migración tras la inhibición de RAC1. Se representan en gráfica de barras los datos correspondientes a la cuantificación de la distancia acumulada (μm) de células U2OS WT tratadas con NSC 23766 (color verde) o sin tratar (color negro). Los datos se obtuvieron a partir del análisis de imágenes obtenidas en ensayos de motilidad y corresponden a 2 ensayos independientes con un mínimo de 26 células por condición (en ausencia y en presencia de NSC 23766). Las muestras se analizaron con el test estadístico t-Student para muestras independientes. (***) $p < 0.001$.



3.5.2.3. Análisis del efecto de la inhibición de RAC1 sobre la direccionalidad

En la figura 48 se representan los datos correspondientes al estudio del impacto de NSC 23766 sobre la direccionalidad celular, y se observa que los valores para la direccionalidad son significativamente menores cuando las células fueron tratadas con NSC 23766 (0.2) respecto a la condición basal sin tratar (0.6), por lo que se concluye que la inhibición de RAC1 afecta a la direccionalidad de la migración.

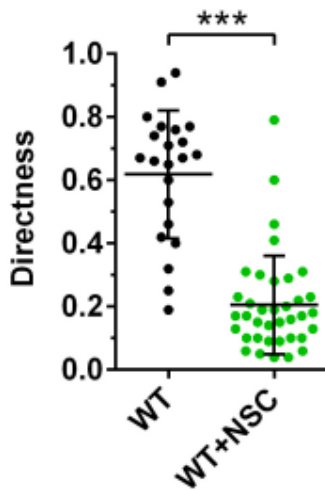
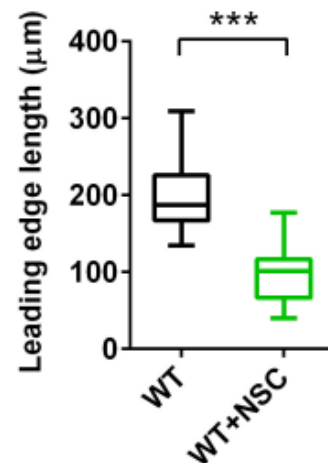


Figura 48. Estudio de la direccionalidad de las células U2OS tras la inhibición de RAC1. En la gráfica se representan los datos correspondientes a la direccionalidad en células U2OS WT en ausencia y en presencia de NSC 23766 (símbolos negros y símbolos verdes, respectivamente). Los datos se obtuvieron a partir del análisis de imágenes obtenidas en ensayos de motilidad aleatoria y corresponden a 2 ensayos independientes con un mínimo de 26 células por condición experimental. Las muestras se analizaron con el test estadístico t-Student para muestras independientes. (***) $p < 0.001$.

3.5.2.4. Análisis de la inhibición de RAC1 sobre la longitud del frente de migración

A partir de las imágenes obtenidas en el ensayo de motilidad, se evaluó también el efecto de la inhibición de RAC1 con NSC 23766 sobre el tamaño del frente de migración y, consecuentemente, en el tamaño de los lamelipodios. En la figura 49 se representa la cuantificación de la longitud del frente de migración en ambas condiciones, en donde puede observarse que la longitud del frente de migración disminuye en respuesta al tratamiento con NSC 23766. Es decir, la inhibición de RAC1 afecta a la longitud del frente de avance de las células en migración.

Figura 49. Análisis del efecto de NSC 23766 sobre la longitud del frente de migración. En la gráfica se representa la cuantificación de la longitud del frente de migración de células U2OS WT sin tratar (color negro) y tratadas con NSC 23766 (color verde). Los datos se obtuvieron a partir del análisis de imágenes de ensayos de motilidad y corresponden a 3 experimentos independientes en los cuales se analizaron un mínimo de 37 células por condición. Las muestras se analizaron con el test estadístico t-Student para muestras independientes. (***) $p < 0.001$.



De los resultados obtenidos en este subapartado se concluye, por tanto, que el tratamiento de las células U2OS WT con NSC 23766 redujo la velocidad de migración, la distancia total acumulada, la direccionalidad y la longitud del frente de migración. Es decir, el efecto observado en estos parámetros de migración celular cuando RAC1 es inhibido por NSC 23766 se asemeja al observado por la ausencia de ORAI1 en la célula, lo cual confirma que RAC1 activo y ORAI1 son esenciales en el frente de migración,

donde participan activamente en la formación de lamelipodios necesarios para que se establezca un frente polarizado y tenga lugar una migración eficiente.

3.5.3. Inhibición de RAC1: Estudio del efecto en la interacción de ORAI1 con marcadores del frente de migración (CTTN y CYFIP1)

En el punto 2 de este apartado de Resultados se mostró que la estimulación con EGF potencia la translocación de ORAI1 al frente de migración, donde interacciona con CTTN, CYFIP1 y ARP2/3. Asimismo, también analizamos la interacción de RAC1 con ORAI1, la cual se vio potenciada tras la activación de RAC1 con EGF. Estas dos observaciones, unido al papel de RAC1 como regulador del citoesqueleto, nos llevaron a analizar el efecto de la inhibición de RAC1 en la interacción de ORAI1 con los marcadores de frente de migración. Con ello se persigue establecer una relación directa entre la actividad de RAC1 y la translocación de ORAI1 al frente de migración. Para ello, se cultivaron células U2OS en medio DMEM completo y posteriormente se transfectaron para la expresión transitoria de ORAI1-GFP (o el vector vacío) y mCherry-CTTN. Las células fueron deprivadas en medio RPMI durante 12 horas y tratadas con NSC 23766 50 μ M y/o 50 ng/ml de EGF, tal y como se ha descrito en experimentos anteriores. Una vez obtenidos los lisados celulares, se precipitó ORAI1-GFP y se analizó la cantidad de mCherry-CTTN coprecipitada. Posteriormente, se reutilizó la membrana para analizar la cantidad de ORAI1-GFP precipitado usando para ello un anticuerpo anti-GFP. En la figura 50 se observa que la interacción de CTTN con ORAI1 potenciada por la estimulación con EGF se pierde cuando las células han sido tratadas con NSC 23766, siendo el nivel de coprecipitación de CTTN a ORAI1 en esta condición experimental similar a la situación basal. En la imagen derecha de la figura 50 se representan los niveles de proteína total para mCherry-CTTN y ORAI1-GFP, analizados mediante inmunoblot gracias al uso de anticuerpos anti-CTTN y anti-GFP.

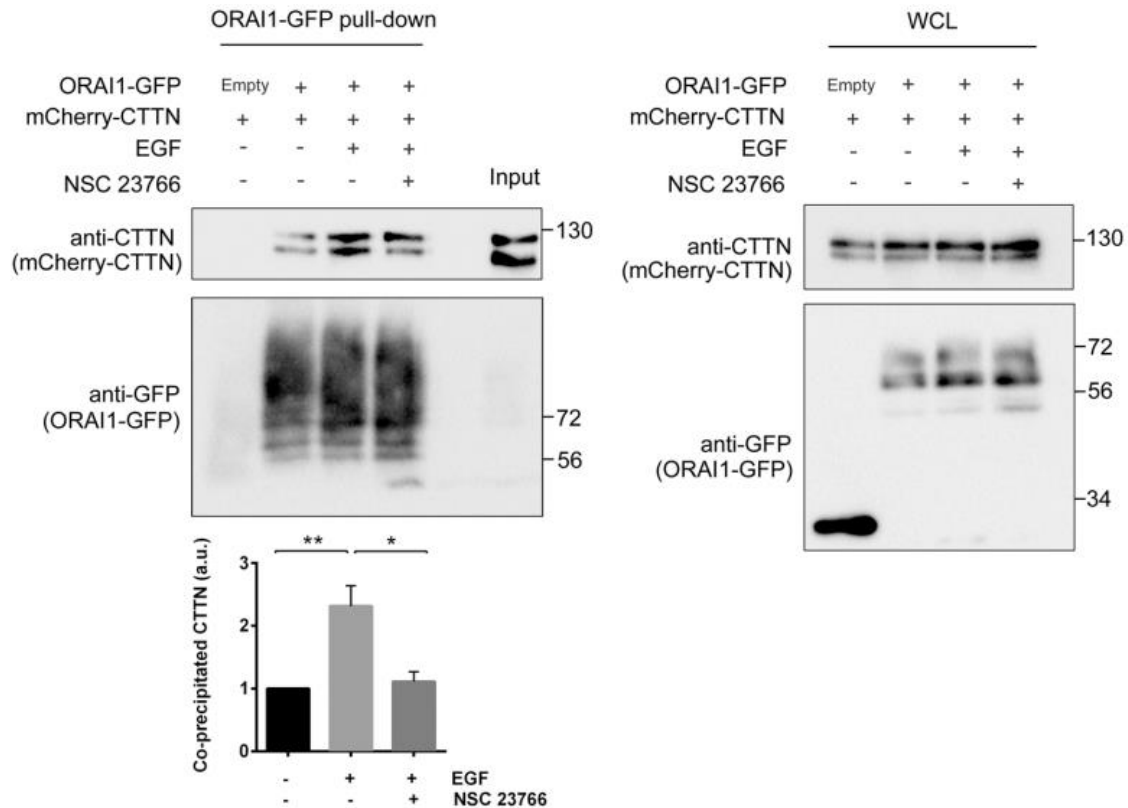


Figura 50. Estudio del efecto de la inhibición de RAC1 sobre la interacción de ORAI1 y CTTN en respuesta a EGF. *Panel izquierdo:* Las células U2OS se transfectoron para la expresión transitoria de ORAI1-GFP o el vector vacío (GFP-empty) y mCherry-CTTN. Las células se privaron en medio RPMI libre de suero durante 8-10 horas y fueron estimuladas con EGF 50 ng/ml durante 3 minutos. Cuando correspondió, las células se trataron con NSC 23766 50 μ M durante 8 horas antes del tratamiento con EGF. ORAI1-GFP se precipitó utilizando una resina de agarosa GFP-Trap. La cantidad de mCherry-CTTN unida a ORAI1-GFP se evaluó mediante inmunoblot utilizando un anticuerpo anti-CTTN y la cantidad de ORAI1-GFP precipitado se evaluó utilizando un anticuerpo anti-GFP. En la imagen inferior del panel se representa en un diagrama de barras la cuantificación de CTTN coprecipitada con ORAI1 en las diferentes condiciones experimentales. *Panel derecho:* Los niveles de proteína total de mCherry-CTTN y de ORAI1-GFP se evaluaron a partir de lisados celulares totales (WCL). Los inmunoblots son representativos de 3 experimentos diferentes a partir de 3 lisados independientes.

Tras haber observado que la inhibición de RAC1 por NSC 23766 reduce el nivel de interacción de mCherry-CTTN sobre-expresada con ORAI1, decidimos evaluar también el efecto de dicha inhibición en la coprecipitación de ORAI1 con CTTN endógena y CYFIP1 endógeno. Para ello se sembraron células U2OS ORAI1-KO, se transfectoron para la expresión transitoria de ORAI1-GFP y se trataron con EGF y NSC 23766 en las mismas condiciones que en el ensayo anterior (figura 50). En la figura 51 se observa que el tratamiento con NSC 23766 reduce la coprecipitación de ORAI1 tanto con CYFIP1 como con CTTN endógena, lo cual confirmó que RAC1 activo regula la translocación y el enriquecimiento de ORAI1 en el frente de avance de células en migración, donde CTTN y CYFIP1 participan en la formación de lamelipodios.

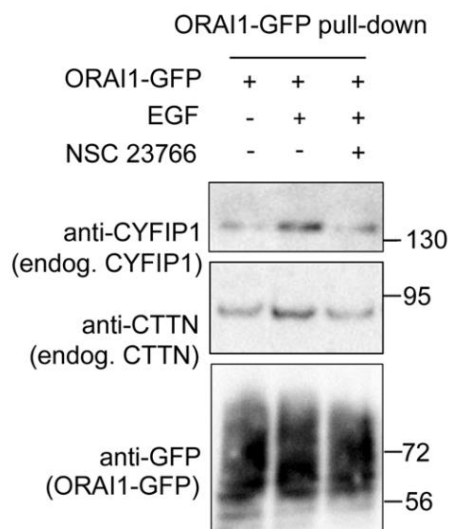


Figura 51. Análisis del efecto de la inhibición de RAC1 sobre la interacción de ORAI1 con CYFIP1 y CTTN. Las células U2OS fueron transfectadas transitoriamente para la expresión de ORAI1-GFP. Tras la privación de suero en ausencia y presencia de NSC 23766 50 μ M durante 10-12 horas, las células fueron estimuladas con 50 ng/ml de EGF durante 3 minutos. ORAI1-GFP se precipitó con una resina de agarosa GFP-Trap y las proteínas endógenas CYFIP1 y CTTN coprecipitadas fueron analizadas por inmunoblot con sus respectivos anticuerpos. La cantidad total de ORAI1-GFP precipitado se evaluó con un anticuerpo anti-GFP. Los inmunoblots son representativos de 3 experimentos diferentes a partir de 3 lisados independientes.

3.5.4. Evaluación de ORAI1 en la superficie celular en respuesta a la inhibición de RAC1

Con el fin de poder esclarecer que efectivamente RAC1 activo controla y dirige la localización de ORAI1 al frente de migración, decidimos estudiar el efecto de la inactivación de RAC1 sobre la translocación de ORAI1 a la superficie celular. Para ello, procedimos a realizar un ensayo de biotilación de proteínas de la superficie celular. Se sembraron células U2OS WT y Flag-RAC1-T17N y se transfectaron para la expresión transitoria de ORAI1-GFP. Cuando fue necesario, las células WT se incubaron un mínimo de 8 horas con NSC 23766 50 μ M. Una vez alcanzaron una confluencia óptima para el ensayo de biotilación, las células fueron lavadas y marcadas con un reactivo de biotina durante 30 minutos a 4°C como se indica en el apartado de Materiales y Métodos. A continuación, se detuvo la reacción de biotilación mediante una solución *quenching* y se recogieron las células para su posterior lisis. En este punto se tomaron alícuotas de los lisados para monitorizar posteriormente los niveles de proteína total. Seguidamente, se purificó la fracción de proteínas de superficie celular biotiladas incubando los lisados celulares con una resina de NeutrAvidin con afinidad por biotina. Por último, se analizaron los niveles de ORAI1-GFP biotilado y de ORAI1-GFP total mediante inmunoblot empleando para ello un anticuerpo anti-GFP. En la figura 52 se muestra la cuantificación del nivel de ORAI1 biotilado en ausencia y en presencia del inhibidor de RAC1, observándose que la cantidad de ORAI1 biotilado disminuye aproximadamente un 50% cuando las células fueron tratadas con NSC 23766. Es decir, la inhibición de RAC1 tiene un efecto directo en los niveles de ORAI1 que se translocan y se relocalizan a zonas de la periferia celular.

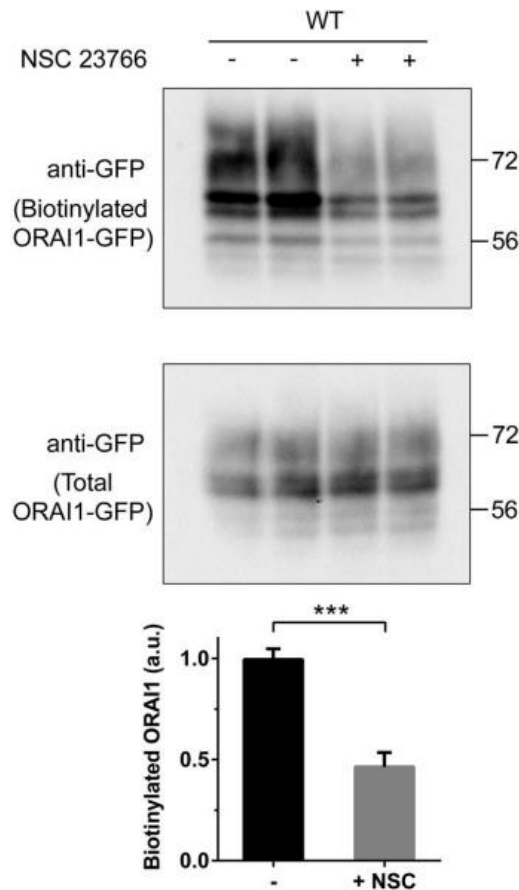
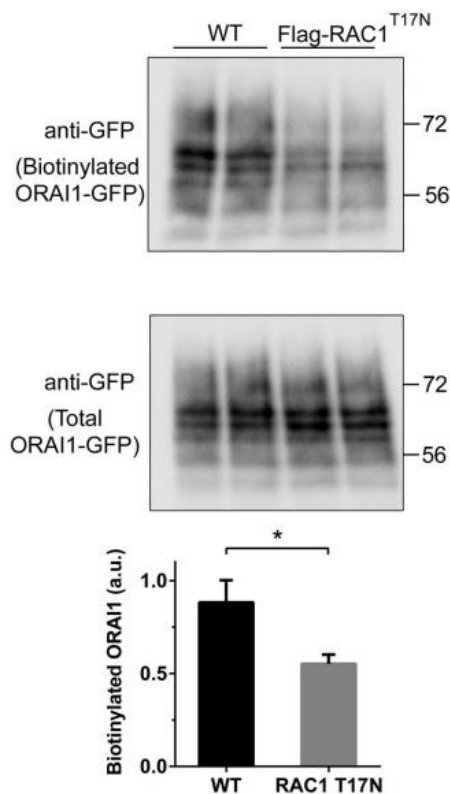


Figura 52. Efecto de la inhibición de RAC1 sobre la translocación de ORAI1 a la membrana plasmática: ensayo de biotinilación. Las células U2OS WT se sembraron y se transfectaron para la expresión transitoria de ORAI1-GFP, añadiendo al medio de cultivo NSC 23766 50 μ M 8 horas antes de llevar a cabo el ensayo de biotinilación. Para ello, las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 30 minutos a 4°C con un reactivo de biotinilación (*Sulfo-NHS-SS-Biotin*). La reacción se detuvo mediante la adición de una solución *quenching*, tras lo cual se recogieron las células, se lavaron y se lisaron como se detalla en Materiales y Métodos. La purificación de las proteínas de superficie celular biotiniladas se llevó a cabo con la resina de agarosa NeutrAvidin. Los niveles de ORAI1-GFP biotinilado se analizaron mediante inmunoblot empleando un anticuerpo anti-GFP (panel superior). Asimismo, también se analizó el nivel de ORAI1-GFP total a partir del lisado celular previo a purificar la fracción de proteínas biotiniladas (panel central). La cuantificación de los resultados de 2 experimentos independientes para ambas condiciones se representa en la gráfica de barras. Las muestras se analizaron con el test estadístico t-Student para muestras independientes. (***) $p < 0.001$.

Del mismo modo se procedió también a evaluar el impacto del mutante negativo de RAC1-T17N en la cantidad de ORAI1 biotinilado, es decir, localizado en la superficie celular. Los resultados se muestran en la figura 53. En el blot de los niveles de la proteína biotinilada y en la cuantificación observamos que los niveles de ORAI1 biotinilado en el mutante negativo de RAC1 son similares a los que observamos cuando se inhibió RAC1 con NSC 23766, es decir, la reducción es aproximadamente del 50%. Ambos resultados confirman de esta forma la necesidad de RAC1 activo para que ORAI1 se transloque y se enriquezca en la superficie celular.

Resultados: Capítulo I

Figura 53. Efecto del mutante inactivo de RAC1 (T17N) sobre la translocación de ORAI1 a la membrana plasmática: ensayo de biotilación. Las células U2OS WT y Flag-RAC1-T17N se sembraron y se transfectaron para la expresión transitoria de ORAI1-GFP. Tras llevar a cabo el ensayo de biotilación, las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 30 minutos a 4°C con un reactivo de biotilación (*Sulfo-NHS-SS-Biotin*). La reacción se detuvo mediante la adición de una solución *quenching*, tras lo cual se recogieron las células, se lavaron y se lisaron como se detalla en Materiales y Métodos. La purificación de las proteínas de superficie celular biotiladas se llevó a cabo con la resina de agarosa NeutrAvidin. Los niveles de ORAI1-GFP biotilado se analizaron mediante inmunoblot con un anticuerpo anti-GFP (panel superior). Asimismo, el nivel de ORAI1-GFP total se analizó a partir del lisado celular previo a purificar la fracción de proteínas biotiladas (panel central). La cuantificación de los resultados de 2 experimentos independientes para ambas condiciones se representa en la gráfica de barras. Las muestras se analizaron con el test estadístico t-Student para muestras independientes. (***) $p < 0.001$.



De modo complementario a los experimentos realizados, se validó la especificidad del ensayo de biotilación evaluando la presencia de marcadores del citosol y de membrana plasmática para confirmar que no hubiera contaminación de componentes citosólicos en la fracción biotilada de proteínas de membrana plasmática. Para ello, se analizó mediante inmunoblot la presencia de la proteína p38 MAPK –un marcador citosólico– y de la Na^+/K^+ -ATPasa –un marcador de membrana plasmática– a partir de las muestras biotiladas. Como control de especificidad de los anticuerpos utilizados se evaluó también el nivel de expresión de estos marcadores en lisados totales. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 54, observándose en la fracción biotilada la ausencia de p38 MAPK (panel izquierdo) y el enriquecimiento en los niveles de Na^+/K^+ -ATPasa a medida que aumentamos el volumen de la muestra analizada (panel derecho). Estos resultados confirmaron la pureza de las fracciones utilizadas en el ensayo de biotilación y la validación de su uso para analizar la cantidad de ORAI1 presente en la superficie celular en respuesta a la inhibición de RAC1.

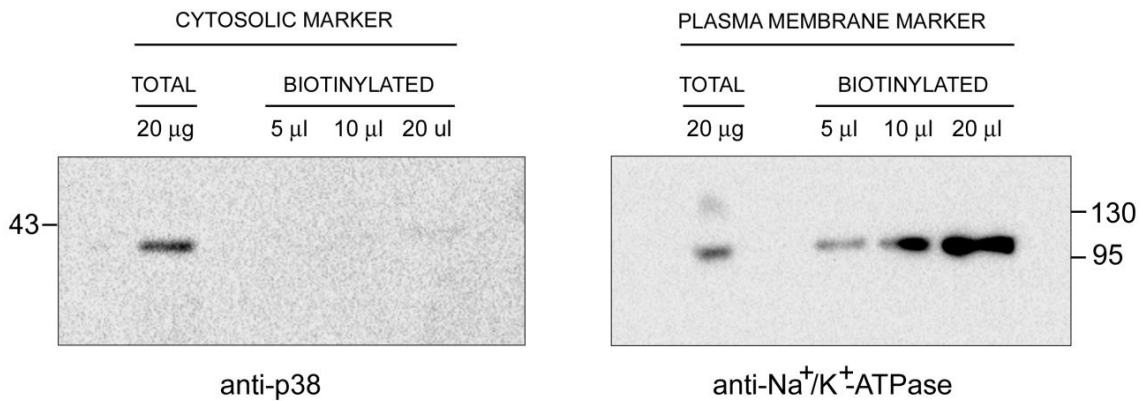


Figura 54. Evaluación de marcadores citosólicos y de membrana plasmática en la fracción biotinilada.

Las células U2OS fueron sembradas y transfectadas para la expresión transitoria de ORAI1-GFP. Cuando alcanzaron una confluencia óptima se llevó a cabo un ensayo de biotinilación como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. Como control para determinar la eficiencia de dicho ensayo, se procedió a analizar los niveles de marcadores del citosol y de la membrana plasmática mediante inmunoblot a partir de las muestras biotiniladas (en volúmenes crecientes). En la imagen izquierda se muestra el blot correspondiente al análisis de p38 MAPK (marcador citosólico). En el blot de la derecha aparecen representados los resultados relativos a la Na⁺/K⁺-ATPasa (marcador de membrana plasmática). Como control de especificidad de los anticuerpos empleados se evaluó la expresión de ambas proteínas en lisados totales (primera calle de cada blot).

3.5.5. Evaluación de la inhibición de RAC1 en la actividad del canal de calcio ORAI1

Dado que ORAI1 es un mediador de SOCE y que RAC1 regularía su enriquecimiento en el frente de migración, región donde el influjo de Ca²⁺ extracelular es crítico para el avance de las células y el *ruffling* de membrana, decidimos evaluar el efecto de la inhibición de RAC1 sobre SOCE mediante la medida del influjo de Ca²⁺ extracelular. La medida de SOCE se llevó a cabo siguiendo el protocolo estándar que se detalla en el apartado de Materiales y Métodos. En la figura 55 se representa la cuantificación del incremento del ratio F340/F380 tras la adición del Ca²⁺ extracelular. En el panel izquierdo aparece la cuantificación relativa al análisis de las células U2OS WT en ausencia y en presencia de NSC 23766, mientras que el panel de la gráfica derecha se representan los resultados del análisis de las células U2OS Flag-RAC1-WT y Flag-RAC1-T17N.

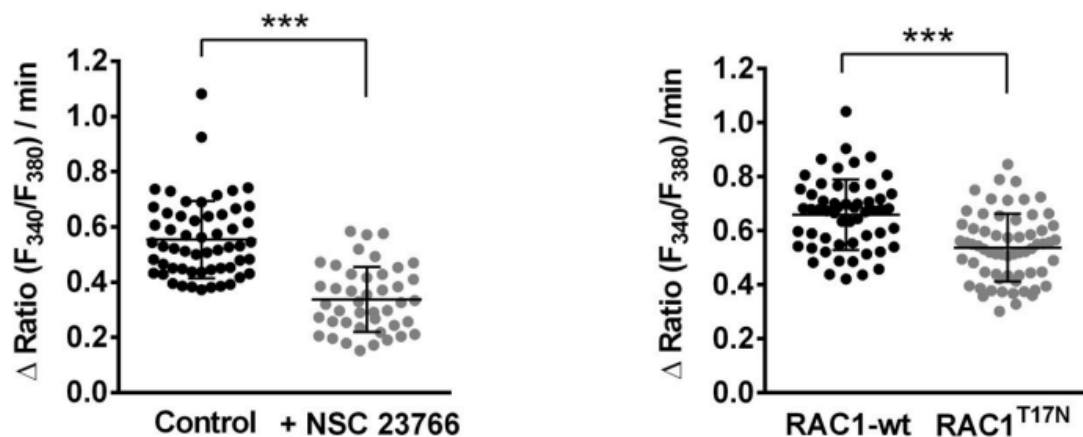


Figura 55. Medida de SOCE en células U2OS WT, U2OS Flag-RAC1 WT y U2OS Flag-RAC1-T17N. Las células se sembraron en medio DMEM completo y, cuando fue necesario, se trataron con NSC 23766 en el mismo medio durante 10-12 horas antes de la medida. Para evaluar SOCE, las células WT (con y sin tratamiento con NSC 23766, gráfica izquierda) y las células que sobre-expresan Flag-RAC1-WT o Flag-RAC1-T17N (gráfica derecha) se cargaron con fura-2 AM y se les añadió Tg 1 μM en medio HBSS libre de Ca^{2+} seguido de la adición de Ca^{2+} extracelular. El incremento del ratio F340/F380 se monitorizó por epifluorescencia como se describe en Materiales y Métodos. En la gráfica se representa la cuantificación del incremento del ratio F340/F380 en los 90 segundos posteriores a la adición de Ca^{2+} extracelular en las diferentes condiciones analizadas. Los datos corresponden a dos ensayos independientes y se analizaron con el test estadístico t-Student para muestras independientes. (***) $p < 0.001$.

Los resultados indican que, ya sea a través del tratamiento con un inhibidor farmacológico o empleando un mutante negativo de RAC1 (RAC1-T17N), la inhibición de RAC1 provoca una reducción en el influjo de Ca^{2+} extracelular. Este resultado se puede explicar por la disminución del nivel de ORAI1 que se localiza en la superficie celular como consecuencia de la inhibición de RAC1, ya que ORAI1 es funcionalmente activo cuando se encuentra en la membrana plasmática. De este modo, una disminución del nivel de ORAI1 activo explicaría que haya una ralentización en la velocidad de entrada de Ca^{2+} extracelular y en la velocidad de migración, siendo ambos resultados un efecto directo de la inhibición de RAC1.

En resumen, los resultados observados nos permiten concluir que ORAI1 tiene un papel crítico en la migración celular e invasividad, ya que la menor polarización y persistencia en la migración, así como la menor diseminación de las células ORAI1-KO en las larvas de pez cebra, son consecuencia directa de la ausencia de ORAI1. A su vez, ORAI1 interacciona en el frente de migración con CTTN, CYFIP1 y ARP2/3, marcadores del frente de avance celular que participan en la reorganización del citoesqueleto y la formación de lamelipodios necesarios para una migración eficiente. Por último, la translocación de ORAI1 al frente de migración está regulada por la actividad de RAC1 y es potenciada por el factor de crecimiento epidérmico (EGF), lo cual sugiere que cuando

Orai1 se encuentra activo en la membrana plasmática forma parte del complejo molecular que controla y modula la migración celular.

Capítulo II

En el Capítulo I se ha analizado el papel de ORAI1 en el frente de migración celular y se ha determinado que la translocación de ORAI1 al frente de migración está regulada por la actividad de RAC1. El siguiente paso en este trabajo fue determinar modificaciones postraduccionales de ORAI1 que pudieran modular la actividad del canal.

Modificación postraducciona l de ORAI1: La fosforilación

La fosforilación es una modificación postraducciona l que consiste en añadir un grupo fosfato al grupo hidroxilo de serinas, treoninas o tirosinas (entre otros residuos). La fosforilación es un mecanismo predominante de transducción intracelular y señalización en respuesta a estímulos extracelulares (Manning, Whyte, et al., 2002). La gran mayoría de residuos fosforilados que se han identificado mediante estudios de fosfoproteómica corresponden a serina y treonina, constituyendo aproximadamente el 90% del total (Ubersax & Ferrell, 2007). En lo que respecta a la funcionalidad y conservación en los sitios de fosforilación, se ha descrito que la conservación evolutiva en el caso de los residuos de serina y treonina es mayor que la de los sitios de tirosina. Los residuos no fosforilados de serina y treonina muestran, por otra parte, una evolución más dinámica que la de estos mismos residuos fosforilados, lo cual sugiere que una mayor conservación evolutiva podría estar sujeta a una restricción funcional (S. C. Chen et al., 2010).

De manera general, las fosfoproteínas suelen estar presentes en pequeñas cantidades, fosforilándose además solamente una pequeña porción de su secuencia. A ello hay que sumar que la fosforilación es un proceso transitorio y dinámico, de manera que se pueden encontrar proteínas cuya fosforilación fluctúa a lo largo del ciclo celular y otras proteínas que solamente son fosforiladas en respuesta a estímulos específicos en unas condiciones determinadas (Lin et al., 2010). Estas particularidades en cuanto al dinamismo y la relevancia fisiológica temporal de la fosforilación hacen necesaria la existencia de métodos y herramientas con una alta sensibilidad para su detección (Cohen, 2000). Tradicionalmente, la fosforilación de proteínas se ha estudiado mediante diversos métodos bioquímicos, como el marcaje *in vivo*, el mapeo de fosfopéptidos, ensayos de la actividad de quinasas asociada a la purificación de proteínas o mediante el análisis de fosfoaminoácidos (Johnson & Hunter, 2005). El empleo de estas técnicas, por lo general, es laborioso y sólo permite focalizar el estudio de la fosforilación en proteínas individuales. Gracias al avance metodológico en las últimas dos décadas y el desarrollo de métodos de alto rendimiento, como la espectrometría de masas, en la actualidad es posible abordar el estudio de la fosforilación de proteínas a una escala más global (Lin et al., 2010).

Con respecto a la fosforilación de ORAI1, sólo se ha descrito hasta la fecha que la proteína es fosforilada en los residuos Ser27 y Ser30 por la enzima PKC β (Kawasaki et al., 2010) y en la Ser34 por PKA (Zhang et al., 2019). Kawasaki y cols. observaron que la

Resultados: Capítulo II

sustitución de la proteína endógena por la proteína mutada a alanina en ambos residuos (ORAI1-S27A/S30A), simulando así una desfosforilación constitutiva de estos residuos, producía un incremento en SOCE y CRAC, por lo que sugirieron que la fosforilación de la Ser27 y Ser30 podría regular la interacción de ORAI1 con STIM1 y la apertura del canal. En lo referente a la Ser34 de ORAI1, se ha observado que su fosforilación por PKA induce la inactivación del canal dependiente de Ca^{2+} (CDI, *Ca²⁺-dependent inactivation*) (Zhang et al., 2019).

Como punto de partida en nuestro estudio de la fosforilación de ORAI1 se llevó a cabo un análisis de espectrometría de masas en colaboración con el *Medical Research Council-Protein Phosphorylation and Ubiquitylation Unit (MRC-PPU)* de la Universidad de Dundee (Reino Unido), con el fin de identificar el mapa de residuos fosforilados de ORAI1. Para ello, se generó una línea celular HEK293 FLp-In T-REx para la expresión inducible de Flag-ORAI1 bajo un promotor sensible a tetraciclinas. Las células HEK293 Flag-ORAI1 se sembraron en medio DMEM completo con suero y tras alcanzar la confluencia deseada (60-70%) se procedió a la lisis celular. Posteriormente se purificó Flag-ORAI1 mediante un ensayo de pull-down y la muestra se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida. El gel fue teñido con azul de Coomassie y siguiendo el protocolo que se detalla en el apartado de Materiales y Métodos se llevó a cabo la digestión de la proteína (Flag-ORAI1) con las proteasas tripsina, Asp-N y Lys-N (figura 56).

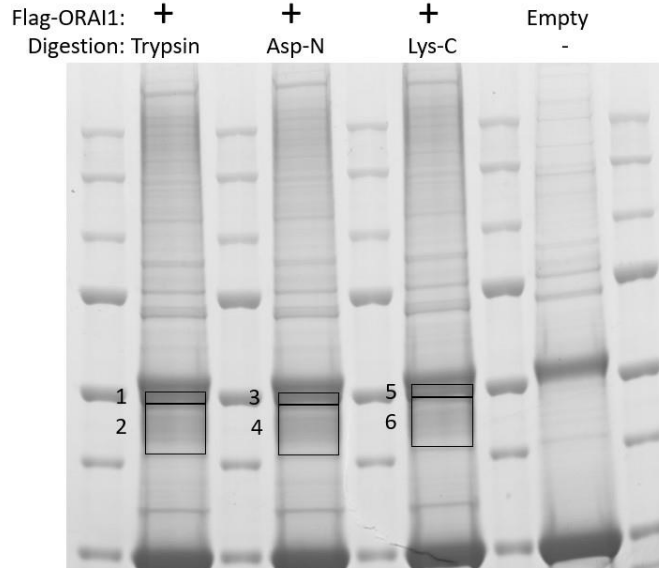


Figura 56. Digestión de Flag-ORAI1 con diferentes proteasas para el posterior análisis mediante espectrometría de masas. Las células HEK293 que sobre-expresan Flag-ORAI1 se cultivaron en medio completo con suero y con doxiciclina para inducir la expresión de Flag-ORAI1. Las células se lisaron y posteriormente se realizó la purificación de Flag-ORAI1 mediante un ensayo de pull-down (Flag). A partir del gel de poliacrilamida, el cual fue teñido con azul de Coomassie, se llevó a cabo el recorte de las bandas mostradas con recuadros, y la digestión proteica de los fragmentos de gel con tripsina (fragmentos 1 y 2), la proteasa Asp-N (fragmentos 3 y 4) y la proteasa Lys-N (fragmentos 5 y 6), los cuales fueron analizados posteriormente mediante espectrometría de masas.

Los péptidos resultantes se sometieron a cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS, *Liquid chromatography–mass spectrometry*) con barrido de iones en un espectrómetro de masas Q-Trap, lo que permitió identificar una serie de residuos fosforilados en la secuencia de ORAI1 (figura 57).

El perfil de fosforilación de ORAI1 obtenido mediante el análisis Q-Trap indicó la presencia de fosfo-residuos en las serinas 12, 13 y 34 en el fragmento resultante de la digestión por tripsina y de la treonina 51 cuando la proteína fue digerida por Asp-N. Por otro lado, la treonina 295, la serina 298 y la tirosina 300 fueron identificados como fosfo-residuos en los péptidos obtenidos en los tres tipos de digestión realizados (tripsina, Asp-N y Lys-C).

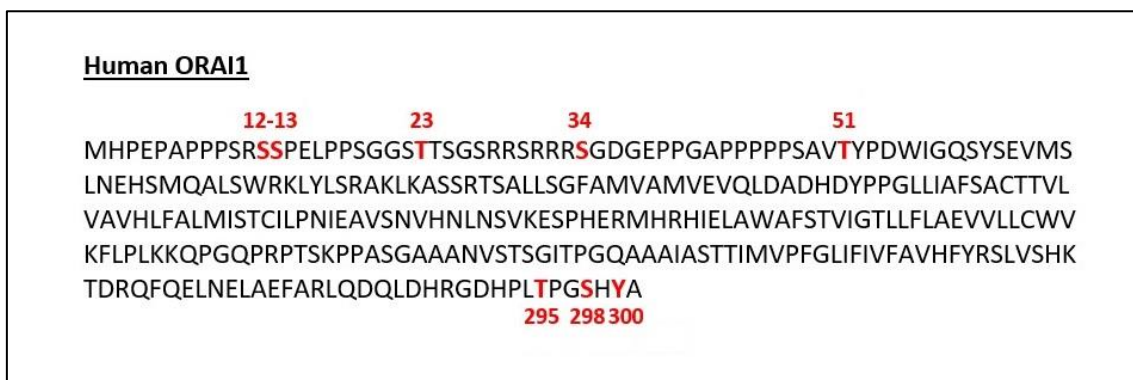


Figura 57. Mapa de residuos fosforilados en la proteína ORAI1 obtenidos mediante análisis de espectrometría de masas (MS). Se representa la secuencia de la proteína ORAI1 humana y en rojo se marcan los fosfo-residuos encontrados mediante análisis de espectrometría de masas: serina 12, serina 13, treonina 23, serina 34, treonina 51, treonina 295, serina 298 y tirosina 300.

Este resultado es similar al obtenido por otros trabajos de espectrometría de masas realizados a gran escala (no dirigidos frente a una única proteína), como revela la base de datos sobre modificaciones postraduccionales *PhosphoSitePlus* (figura 58). En los diferentes análisis publicados de forma previa, y siempre según esta base datos, el mayor número de referencias publicadas indica que los residuos de ORAI1 potenciales de ser fosforilados son la treonina 295 (Thr295), la serina 298 (Ser298) y tirosina 300 (Tyr300). De nuevo hay que indicar que estos resultados derivan de estudios diseñados a partir de tejidos o células en cultivo sin aislamiento expreso de ORAI1, sino que se ha analizado el proteoma conocido en su conjunto, no existiendo datos previos de trabajos dirigidos a ORAI1 de forma específica. Por otra parte, es preciso indicar que no se ha descrito en la literatura científica función alguna para la secuencia de ORAI1 que comprende los residuos 295-301 del C-terminal (TPGSHYA) (Lunz et al., 2019). Todo ello nos llevó, por tanto, a abordar el estudio de la fosforilación de ORAI1 en los residuos de treonina 295, serina 298 y tirosina 300.

Resultados: Capítulo II

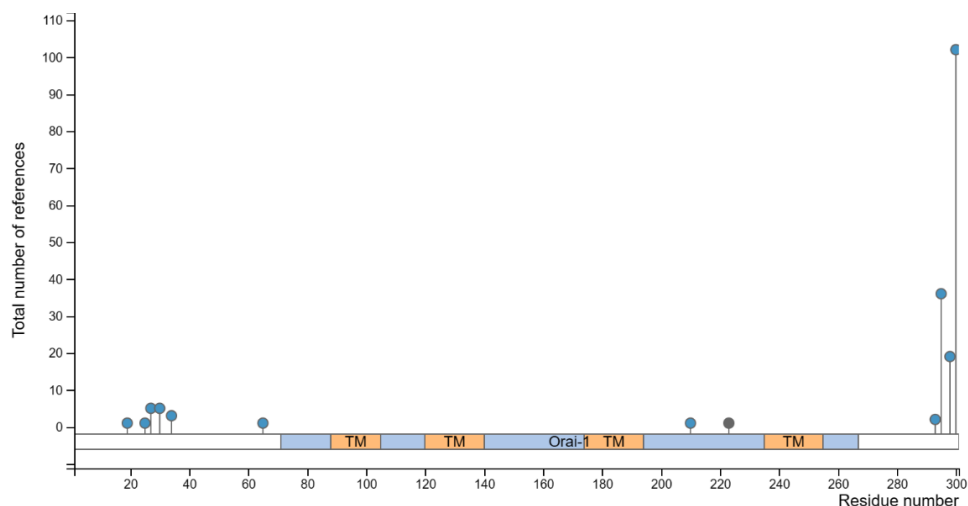


Figura 58. Mapa de residuos de ORAI1 fosforilados y número de referencias que han descrito dicha fosforilación. Los sitios de fosforilación para ORAI1 descritos en la bibliografía se sitúan en el extremo N-terminal, donde ya se ha descrito *in vitro* la fosforilación para las serinas 27, 30 y 34; y en el extremo C-terminal, donde se han descrito los residuos de treonina 295, serina 298 y tirosina 300 en análisis de espectrometría de masas a gran escala o de alto rendimiento (HTP, *High-throughput*), pero poca sensibilidad. Fuente de la imagen (*PhosphoSitePlus.org*).

Para llevar a cabo este trabajo se emplearon células de osteosarcoma U2OS que sobre-expresan ORAI1 WT u ORAI1 mutado en estos residuos para simular una desfosforilación o fosforilación constitutiva: T295A/S298A, Y300F (desfosforilación constitutiva) y T295E/S298E y Y300E (fosforilación constitutiva). A lo largo de este capítulo se abordará, consecutivamente, (1) el estudio del posible papel de la fosforilación de estos residuos en la actividad del canal de Ca^{2+} ORAI1, (2) la detección *in vivo* de la fosforilación de la proteína mediante inmunoblot y (3) el estudio de la distribución subcelular de ORAI1 fosforilado mediante ensayos de inmunolocalización.

1. Función de los residuos Thr295, Ser298 y Tyr300 en la actividad del canal ORAI1

Para abordar el estudio de la función de los residuos Thr295, Ser298 y Tyr300 analizamos cómo afecta la mutación de estos residuos a la actividad del canal ORAI1. Para ello se generaron mediante transducción retroviral las líneas celulares U2OS que sobre-expresan de manera estable Flag-ORAI1-WT, así como las mutaciones en los residuos que simulan una desfosforilación constitutiva, Flag-ORAI1-(T295A/S298A) y Flag-ORAI1-Y300F, o bien una fosforilación constitutiva: Flag-ORAI1-(T295E/S298E) y Flag-ORAI1-Y300E. Todo ello se realizó sobre células ORAI1-KO para evitar interferencias de la proteína endógena en nuestros análisis.

A continuación, se analizó la expresión de estas proteínas recombinantes mediante inmunoblot. Para ello, las células se sembraron en medio DMEM completo durante 36 horas, procediéndose a su lisis una vez alcanzada una confluencia óptima. Posteriormente se analizó el nivel de expresión de ORAI1 en las diferentes líneas celulares empleando para ello un anticuerpo anti-Flag. Por un lado, se compararon conjuntamente los niveles de expresión de Flag-ORAI1-WT, Flag-ORAI1-(T295A/S298A) y Flag-ORAI1-(T295E/S298E), tal y como puede observarse en el panel izquierdo de la figura 59. Por otra parte, en el panel de la derecha de esa misma figura se muestra la expresión de Flag-ORAI1-WT, Flag-ORAI1-Y300F y Flag-ORAI1-Y300E. En ambos casos se observó un nivel de expresión uniforme de ORAI1 entre la línea WT y las líneas mutantes, resultado que validó el empleo de estas líneas celulares como modelo experimental en los ensayos de medida de entrada de Ca^{2+} extracelular que se muestran a continuación. En la detección de ORAI1 mediante inmunoblot observamos una multibanda como consecuencia de la glicosilación ramificada en el residuo Asn223 (Gwack et al., 2007). Este resultado también ha sido observado por otros autores, como Dörr y cols., cuando analizaron que el patrón de ORAI1 mediante inmunoblot presentaba un perfil de bandas múltiples de peso molecular variable en función del tipo de célula (Dörr et al., 2016).

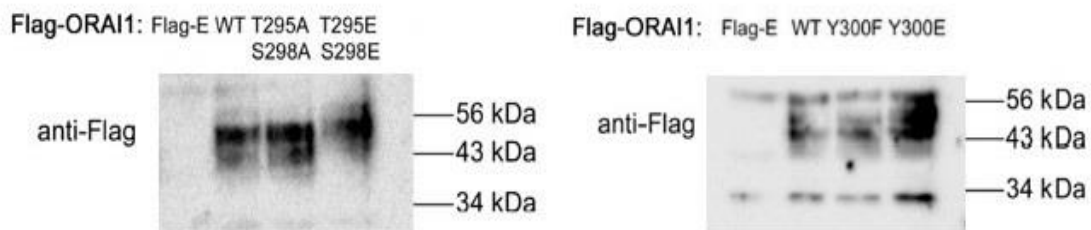


Figura 59. Análisis de la expresión de Flag-ORAI1 en las diferentes líneas celulares generadas. Se evaluó el nivel de expresión de ORAI1 WT y ORAI1 mutado en los residuos Thr295, Ser298 y Tyr300 en las líneas ORAI1-KO. Las células se sembraron en medio DMEM completo y se mantuvieron en cultivo un mínimo de 36 horas antes de proceder a su lisis. *Panel izquierdo:* Nivel de expresión en las líneas que sobre-expresan Flag-ORAI1-WT, Flag-ORAI1-(T295A/S298A) y Flag-ORAI1-(T295E/S298E). *Panel derecho:* Niveles de expresión en las líneas que sobre-expresan Flag-ORAI1-WT, Flag-ORAI1-Y300F y Flag-ORAI1-Y300E. La expresión de ORAI1 se determinó empleando un anticuerpo anti-Flag. Como control negativo se utilizó la línea celular U2OS que sobre-expresa únicamente el péptido Flag.

1.1. Análisis del papel de la fosforilación de Thr295 y Ser298 en la actividad del canal ORAI1

Con el fin de dilucidar si existe una regulación de la actividad de ORAI1 mediada por la fosforilación de los residuos Thr295 y Ser298, se llevaron a cabo medidas de entrada de Ca^{2+} extracelular inducida por la depleción de depósitos a través de la estimulación con ATP y carbacol (CCh). Para ello, se trabajó con las líneas indicadas

Resultados: Capítulo II

anteriormente, que sobre-expresan ectópicamente Flag-ORAI1-WT, Flag-ORAI1-(T295A/S298A) y Flag-ORAI1-(T295E/S298E) de manera estable sobre la línea ORAI1-KO.

ATP y carbacol estimulan, respectivamente, a los receptores purinérgicos P2Y y a los receptores muscarínicos, ligados ambos a proteínas G, lo cual activa la entrada de Ca^{2+} en la célula operada por el vaciado de depósitos (SOCE) a través de la activación de IP_3R (Gordienko & Zholos, 2004; Kobayashi et al., 1989; North & Barnard, 1997). La medida del influjo de Ca^{2+} se llevó a cabo siguiendo el protocolo estándar que aparece detallado en Materiales y Métodos. Las células se sembraron en cubres pretratados con colágeno, manteniéndose en cultivo un mínimo de 36-48 horas. Se privaron de suero durante 12 horas en medio RPMI libre de FBS y 1 hora antes de iniciar la medida las células se cargaron con fura-2 AM durante 60 min, procediéndose inmediatamente después a lavar las células en medio HBSS libre de Ca^{2+} y a monitorizar la actividad del canal mediante microscopía de epifluorescencia (Figura 60). A los dos minutos del inicio de la medida, las células se trataron con ATP (100 μM) y carbacol (100 μM) para inducir el vaciado de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} y una vez se restauraron los niveles de Ca^{2+} libre citosólico, las células se lavaron con medio HBSS libre de Ca^{2+} (minuto 4). Dos minutos más tarde, se añadió al medio extracelular CaCl_2 2 mM (minuto 6). La cuantificación de la entrada de Ca^{2+} extracelular tras la depleción de depósitos intracelulares se representa en la figura 60.

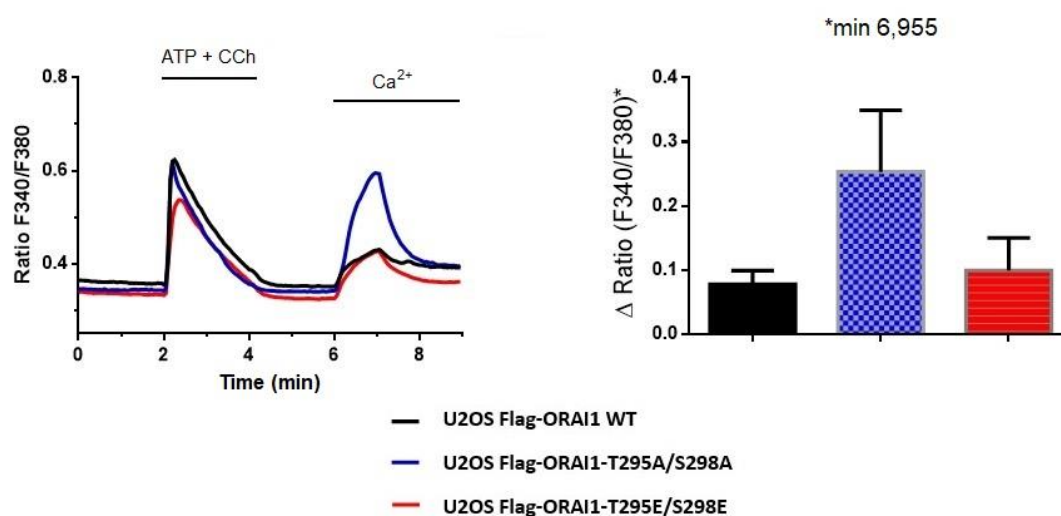


Figura 60. Análisis de la entrada de Ca^{2+} extracelular tras la depleción de depósitos inducida por la estimulación con ATP y carbacol. Para evaluar la entrada de Ca^{2+} , las células U2OS ORAI1-WT (negro), ORAI1-(T295A/S298A) (azul) y ORAI1-(T295E/S298E) (rojo) se cultivaron en cubres pretratados con colágeno y se privaron en medio RPMI libre de suero durante 12 horas. Una hora antes de iniciar la medida se cargaron con fura-2 AM. Seguidamente, las células se lavaron en medio HBSS libre de Ca^{2+} , a los 2 min se añadió ATP (100 μM) + CCh (100 μM) en el mismo medio (minuto 2) y 2 min después las células se lavaron con medio HBSS libre de Ca^{2+} (minuto 4). Dos minutos más tarde se añadió CaCl_2 2 mM al medio extracelular (minuto 6). En la gráfica de la derecha se representa la cuantificación media del incremento del ratio F340/F380 en los 60 segundos posteriores a la adición de Ca^{2+} extracelular en las

diferentes condiciones analizadas. Los datos representan la media de 3 ensayos independientes por condición experimental (n = 33, células WT; n = 35, células T295A/S298A; n = 26, células T295E/S298E).

En los resultados se observó un mayor incremento de SOCE cuando la línea celular expresa la proteína con la doble mutación a alanina [ORAI1-(T295A/S298A)]. Por el contrario, en células que expresaban la doble mutación que mimetizaría un estado constitutivamente fosforilado [ORAI1-(T295E/S298E)] los valores del ratio F340/F380 en la entrada de Ca^{2+} se encontraban en un rango similar al de las células que expresaban la proteína nativa (Flag-ORAI1-wild type) (figura 60).

1.2. Análisis del papel de la fosforilación de la Tyr300 en la actividad del canal ORAI1

A continuación, evaluamos la actividad del canal en los estados fosforilado y desfosforilado de la proteína ORAI1 en el residuo Tyr300. Siguiendo la misma metodología que se detalla en el apartado anterior, se llevaron a cabo medidas de influjo de Ca^{2+} inducido por el vaciado de depósitos con ATP (100 μM) y CCh (100 μM) en las líneas que expresan de manera estable Flag-ORAI1-WT, Flag-ORAI1-Y300F y Flag-ORAI1-Y300E. En la figura 61 se representa la cuantificación de SOCE en cada una de las líneas analizadas. En este caso, no se aprecian diferencias significativas en la entrada de Ca^{2+} extracelular en la línea que simula una desfosforilación (Flag-ORAI1-Y300F), ni al expresar la mutación que emula un estado constitutivamente fosforilado (Flag-ORAI1-Y300E), un resultado que podría indicar que la fosforilación de este residuo no participa en la regulación funcional del canal.

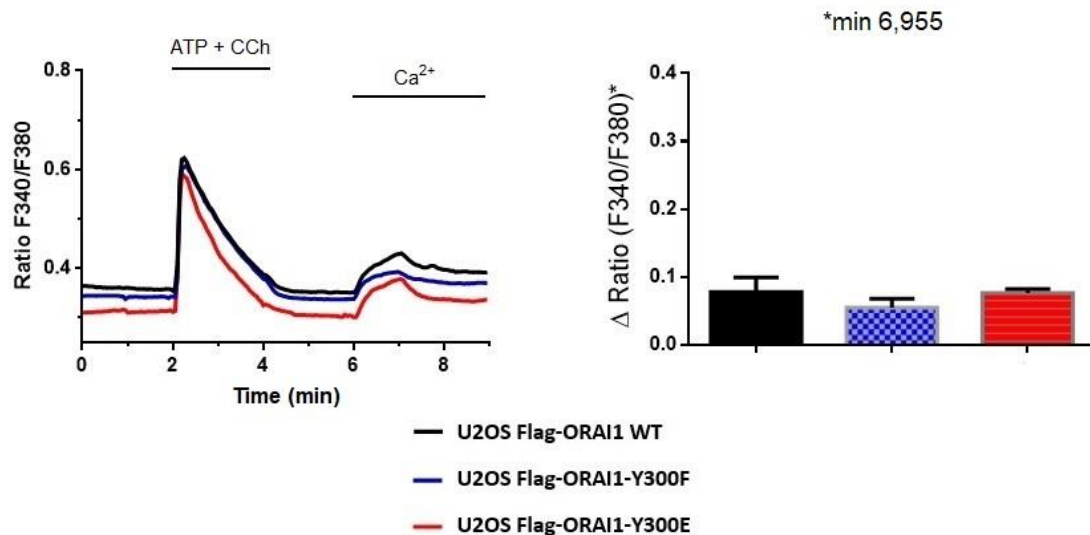


Figura 61. Análisis de SOCE inducida por la estimulación con ATP y carbacol. Para evaluar la entrada de Ca^{2+} , las células U2OS ORAI1-WT (negro), ORAI1-Y300F (azul) y ORAI1-Y300E (rojo) se cultivaron en cubreobjetos pretratados con colágeno y se privaron en medio RPMI libre de FBS durante 12 horas. Una hora antes de iniciar la medida, las células se cargaron con fura-2 AM y posteriormente se llevó a cabo la medida de SOCE tal y como se indica en la figura 60. En la gráfica de la derecha se representa la media del incremento del ratio F340/F380 en los 60 segundos posteriores a la adición de Ca^{2+} extracelular

Resultados: Capítulo II

en las diferentes condiciones analizadas. Los datos representan la media de 3 ensayos independientes por condición experimental (n = 33, células WT; n = 28, células Y300F; n = 24 células Y300E).

En base a los resultados obtenidos en este apartado, concluimos que la inhibición de la fosforilación de los residuos Thr295 y Ser298 (T295A/S298A) induce un aumento en la entrada de Ca²⁺ en las células. Sin embargo, cuando se mimetiza la fosforilación constitutiva de estos residuos (T295E/S298E), el canal se comporta de forma similar al WT. En el caso del residuo Tyr300, no se observó una variación significativa ni al inhibir la fosforilación (Y300F) ni cuando la célula expresa la mutación que emula su fosforilación constitutiva (Y300E). Estos datos nos llevaron a centrarnos, de aquí en adelante, en el estudio del papel de la fosforilación de los residuos Thr295 y Ser298.

2. Determinación de la fosforilación de ORAI1 en los residuos Thr295 y Ser298 mediante anticuerpos

El siguiente paso fue analizar la regulación de la fosforilación de ORAI1 en estos residuos generando anticuerpos específicos frente a fosfo-Thr295 y fosfo-Ser298 y llevando a cabo ensayos de inmunoblot.

2.1. Generación de anticuerpos específicos para el reconocimiento de los residuos Thr295 y Ser298 fosforilados

Para la generación de estos anticuerpos se contó con la colaboración del *MRC-PPU* y la *Division of Signal Transduction and Therapy (DSTT)* de la Universidad de Dundee (Reino Unido), que generó los anticuerpos policlonales aquí descritos. Una vez obtenidos los anticuerpos se validó su especificidad mediante la detección de los residuos de ORAI1 fosfo-Thr295 y fosfo-Ser298 *in vivo*. Para ello, se trabajó con las células U2OS transfectadas de modo estable para la expresión inducible con doxiciplina de ORAI1-WT-GFP y la doble mutación a alanina de estos residuos, ORAI1-(T295A/S298A)-GFP, como control negativo. Las células se sembraron en medio DMEM completo y se mantuvieron un mínimo de 36-48 horas en cultivo. A partir de los lisados obtenidos se analizó la fosforilación de Thr295 y Ser298 mediante inmunoblot. Como control del experimento, se analizaron los niveles de la proteína ORAI1-GFP con un anticuerpo anti-GFP, tal y como se indica en la figura 62.

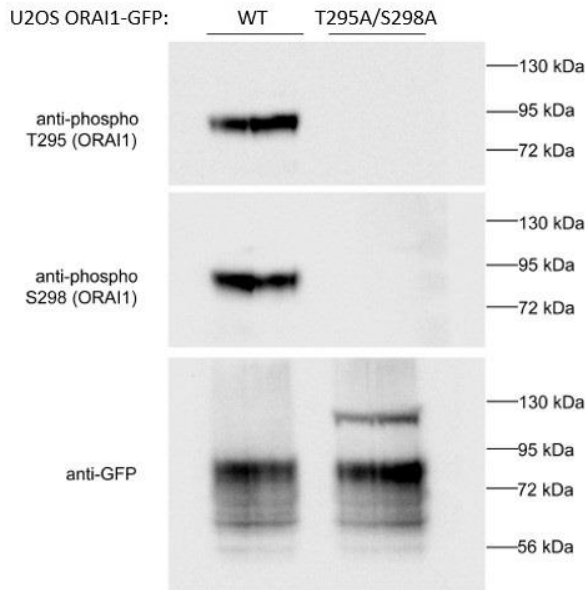


Figura 62. Detección de ORAI1 fosforilado en los residuos Thr295 y Ser298. Las células U2OS se sembraron en medio DMEM completo y se mantuvieron en cultivo un mínimo de 36-48 horas. Como control negativo se utilizó la línea que simula una defosforilación constitutiva, ORAI1-(T295A/S298A)-GFP. Para detectar ORAI1 fosforilado en la Thr295 (fosfo-Thr295, panel superior) y Ser298 (fosfo-Ser298, panel central), se utilizaron 45 µg de proteína de lisado total y los anticuerpos específicos contra estos residuos fosforilados. El nivel de proteína total (ORAI1-GFP) se analizó utilizando un anticuerpo específico anti-GFP (panel inferior).

En la figura 62 se observa que los anticuerpos generados son específicos para reconocer los residuos Thr295 y Ser298 fosforilados, ya que no presentan reactividad frente a la proteína ORAI1-T295A/S298A. Es preciso indicar, además, que la detección de la banda inmunorreactiva de ORAI1 fosforilado en estos residuos corresponde a la banda superior (peso molecular situado entre los marcadores 72-95 kDa) de la multibanda observada en la proteína total (56-95 kDa), es decir, la forma fosforilada es probablemente la que contiene un mayor árbol glicosídico.

2.2. Modulación del nivel de fosforilación de ORAI1

La fosforilación de ORAI1 en los residuos Thr295 y Ser298 observada en la figura 62 se detectó en células que habían sido cultivadas en medio completo con FBS. El siguiente paso en nuestro estudio consistió en buscar algún estímulo que modulara el nivel de fosforilación de estos residuos.

2.2.1. Modulación de la fosforilación de ORAI1 por EGF

Una de las estrategias que nos propusimos fue analizar si la fosforilación de los residuos Thr295 y Ser298 se encuentra modulada por EGF, con el fin de determinar si existe una correlación entre la translocación de ORAI1 a la membrana plasmática controlada por la actividad de RAC1 y el aumento de la fosforilación del canal en estos residuos. Para ello, se sembraron células U2OS FLP-In T-REx que expresaban ORAI1-WT-GFP de manera inducible por doxiciclina, empleando como control negativo de la fosforilación la línea que expresa el doble mutante a alanina, ORAI1-(T295A/S298A)-GFP. Las células se privaron de suero durante 8-10 horas y se trataron con EGF 50

Resultados: Capítulo II

ng/ml durante 5 minutos. Posteriormente, se analizó mediante inmunoblot la fosforilación de ORAI1 en los residuos Thr295 y Ser298 utilizando los anticuerpos específicos anti-fosfo-Thr295 y anti-fosfo-Ser298 (figura 63). El nivel de expresión de ORAI1 total se analizó mediante un anticuerpo anti-GFP y el nivel de carga de proteína total con un anticuerpo anti-GAPDH. Por otra parte, se monitorizó la estimulación de las células con EGF evaluando los niveles de fosforilación de ERK1/2, ya que EGF activa, entre otras, la ruta de las quinasas MAPK (figura 63).

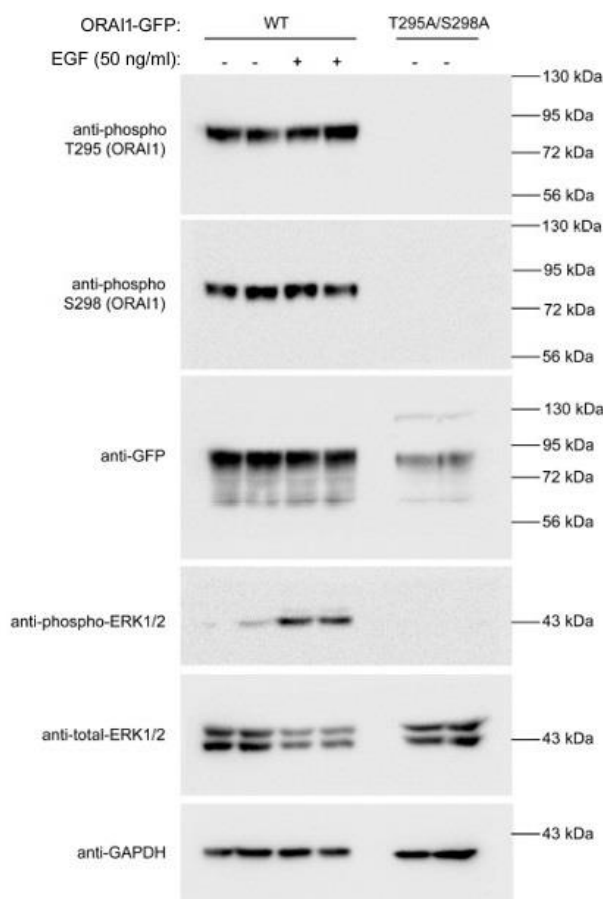


Figura 63. Análisis de la fosforilación de la Thr295 y Ser298 (ORAI1) en respuesta a la estimulación con EGF. Las células U2OS que sobre-expresaban ORAI1-WT-GFP y la doble mutación a alanina, ORAI1-(T295A/S298)-GFP, se sembraron en medio completo durante 36-48 horas, se privaron en medio RPMI libre de suero durante 8-10 horas y fueron posteriormente estimuladas con EGF 50 ng/ml durante 5 minutos. Para evaluar el nivel de fosforilación de ORAI1 en la Thr295 y Ser298 se emplearon 45 µg de proteína de lisado total, utilizando los anticuerpos anti-fosfo-Thr295 y anti-fosfo-Ser298. Con un anticuerpo anti-GFP se evaluó el nivel de expresión total de ORAI1-GFP. El nivel de fosfo-ERK1/2 se evaluó para monitorizar la estimulación con EGF, así como los niveles de ERK1/2 total y de GAPDH (20 µg de proteína por calle). Los inmunoblots son representativos de 3 experimentos diferentes a partir de 3 lisados independientes.

Al analizar los resultados que se muestran en la figura 63, observamos que la fosforilación de ORAI1 en estos residuos no se modula en respuesta a la estimulación con EGF, pues no se aprecia ninguna variación en el nivel de fosforilación, ni en reposo (células privadas de suero), ni tras la estimulación de las células. Esto nos sugirió, por un lado, que ORAI1 podría presentar un nivel basal de fosforilación en ambos residuos constitutivamente alto. Por otra parte, no parece existir una fosforilación regulada por RAC1 a través de EGF, resultado que nos condujo a explorar otros posibles mecanismos en la modulación de la fosforilación de ORAI1.

2.2.2. Análisis de la fosforilación de ORAI1 en la Thr295 y Ser298 en relación con la actividad del canal

Una vez observado que no existe un efecto modulador de la fosforilación de ORAI1 a través de la ruta de EGF, nos planteamos otras posibles vías para abordar su estudio. Hemos mostrado en la figura 60 que cuando las células expresan la doble mutación a alanina [ORAI1-(T295A/S298A)], hay un incremento en SOCE inducida por ATP y carbacol. Ello nos llevó a plantearnos si existe una relación directa entre la fosforilación de ORAI1 en estos residuos y la actividad del canal. Por un lado, se conoce que el residuo Glu106 de ORAI1 confiere selectividad del ion Ca^{2+} en el poro del canal, y que la mutación de este residuo a alanina (E106A) inhibe el transporte de Ca^{2+} a través del canal ORAI1 (Vig, Beck, et al., 2006; Yeromin et al., 2006). Por otra parte, la mutación V102C conduce a una apertura constitutiva del canal (McNally et al., 2012). Por lo tanto, seleccionamos estos mutantes de ORAI1 para estudiar si existe una relación directa entre la actividad del canal y el estado de fosforilación de ORAI1 en los residuos Thr295 y Ser298.

Para realizar el ensayo, las células U2OS ORAI1-KO se sembraron en medio DMEM completo y se transfectaron para la expresión transitoria de Flag-ORAI1-WT, Flag-ORAI1-E106A, o Flag-ORAI1-V102C. Las células se mantuvieron en cultivo 36-48 horas y a continuación se procedió a su lisis para monitorizar la eficiencia de la transfección y la expresión de Flag-ORAI1 en las diferentes líneas celulares. En la figura 64 se observa que el nivel de expresión de Flag-ORAI1 fue similar en la línea WT y en las células que expresan el mutante constitutivamente inactivo del canal (E106A). En cambio, no se detectó apenas expresión del mutante activo de ORAI1 (V102C). Con respecto a la baja expresión del mutante V102C, es preciso indicar que a medida que aumentó el número de horas en cultivo tras la transfección transitoria, las células presentaron un mayor porcentaje de muerte en comparación con las líneas celulares ORAI1-WT y ORAI1-E106A. Esta observación nos lleva a pensar que las células presentan un umbral bajo de tolerancia a la expresión del canal ORAI1 constitutivamente activo (V102C), y que debe ser tóxico para la célula un nivel alto y prolongado de actividad de este canal de Ca^{2+} . Debido a que no es posible igualar el nivel de expresión de Flag-ORAI1-V102C y Flag-ORAI1-WT, descartamos la posibilidad de estudiar el nivel de fosforilación de este mutante en los residuos Thr295 y Ser298.

Resultados: Capítulo II

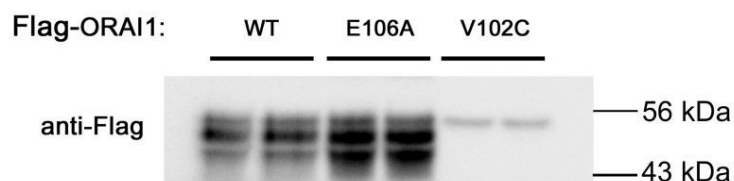


Figura 64. Análisis de la expresión de ORAI1-WT, ORAI1-E106A (canal inactivo) y ORAI1-V102C (canal activo). Las células U2OS ORAI1-KO se sembraron en medio DMEM completo y se transfectaron para la expresión transitoria de Flag-ORAI1-WT, Flag-ORAI1-E106A, Flag-ORAI1-V102C, manteniéndose 36 horas en cultivo antes de su lisis. Posteriormente, se analizó el nivel de expresión de Flag-ORAI1 en las diferentes condiciones a partir de 40 μ g de proteína de lisado total utilizando para su detección un anticuerpo anti-Flag.

Tras analizar el nivel de expresión de los diferentes mutantes de ORAI1, procedimos a evaluar el nivel de fosforilación de ORAI1 en los residuos Thr295 y Ser298 solamente en células que expresaban ORAI1-WT y ORAI1-E106A, mutante inactivo. Como control negativo de la fosforilación se utilizaron células que expresaban Flag-ORAI1-(T295A/S298A). El nivel de fosforilación de la Thr295 y la Ser298 se evaluó por inmunoblot a partir de 45 μ g de proteína de lisado total con los anticuerpos específicos anti-fosfo-Thr295 y anti-fosfo-Ser298. Para la detección del nivel de proteína total (Flag-ORAI1) se utilizó un anticuerpo específico anti-Flag. Los resultados se muestran en la figura 65, en la que observamos un incremento de fosforilación de ORAI1 tanto en el residuo Thr295 como en Ser298 cuando el canal está constitutivamente inactivo (ORAI1-E106).

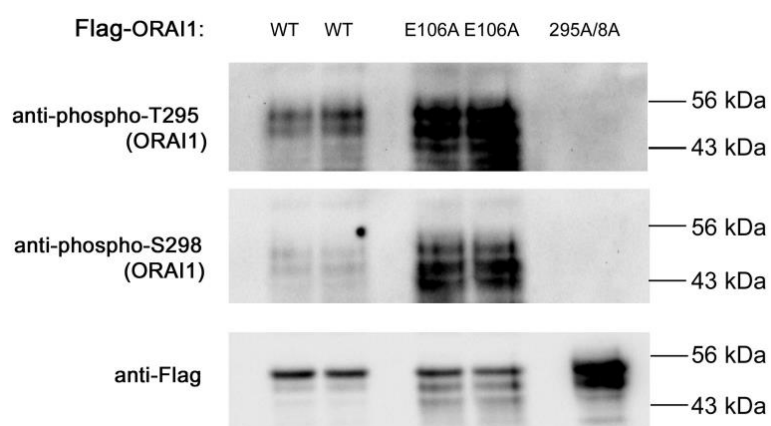


Figura 65. Análisis de la fosforilación de ORAI1 (Thr295 y Ser298) cuando se inhibe el flujo de Ca^{2+} a través del canal (ORAI1-E106A). Las células U2OS ORAI1-KO se sembraron en medio DMEM completo y se transfectaron para la expresión transitoria de Flag-ORAI1-WT, Flag-ORAI1-E106A, así como Flag-ORAI1-(T295A/S298A), que se utilizó como control negativo de la fosforilación. Las células se mantuvieron 36 horas en cultivo, posteriormente se lisaron y mediante inmunoblot se analizó el nivel de fosforilación de la Thr295 y Ser298 en las diferentes condiciones ensayadas. Para ello se emplearon 45 μ g de proteína de lisado total y se utilizaron los anticuerpos específicos anti-fosfo-Thr295 y anti-fosfo-Ser298. El nivel de expresión de la proteína total (Flag-ORAI1) se analizó con un anticuerpo anti-Flag.

Nuestros resultados indican que en condiciones basales existe un pool de la proteína ORAI1 que está fosforilada en los residuos Thr295 y Ser298 y que este pool sufre un incremento significativo cuando la corriente de Ca^{2+} a través del canal está inhibida. Esta observación sugiere que podría existir una relación directa entre la actividad del canal y el nivel de fosforilación de ORAI1. Sin embargo, este resultado necesitaría ser investigado en profundidad con otros experimentos que permitan confirmar esta hipótesis.

3. Estudio de la localización de ORAI1 fosforilado en la Thr295 y Ser298

Una vez obtenidos resultados que apuntan a que la fosforilación de ORAI1 podría estar relacionada con el estado inactivo del canal, nos planteamos analizar la localización subcelular de ORAI1 fosforilado para comprobar si existe alguna relación entre el estado de fosforilación de ORAI1 y su localización.

Para los ensayos de inmunolocalización se utilizaron células U2OS FLp-In T-REx que sobre-expresaban ORAI1-GFP de manera inducible por doxiciclina. Las células se sembraron en cubreobjetos pretratados con colágeno y se cultivaron durante 36-48 horas en medio DMEM suplementado con 10% de suero. Cuando alcanzaron una confluencia en torno al 60-70%, las células se fijaron con PFA y se realizó la inmunolocalización de ORAI1 fosforilado en los residuos de Thr295 y Ser298. De igual modo que validamos la especificidad de los anticuerpos anti-fosfo-Thr295 y anti-fosfo-Ser298 para inmunoblot, analizamos también la especificidad de estos anticuerpos para ensayos de inmunolocalización. Como controles negativos del ensayo se trataron las células fijadas con la fosfatasa lambda y se utilizaron células que expresan ORAI1 mutada a alanina (T295A/S298A). Posteriormente, las células fueron analizadas mediante microscopía de epifluorescencia.

En la figura 66 (panel A) se observa que ORAI1 fosforilado en la Thr295 (primera columna) se localiza principalmente en áreas corticales y *ruffles* de membrana, mientras que la proteína total (ORAI1-GFP, segunda columna de la figura 66) se encuentra ampliamente distribuida tanto en el interior de la célula como en la periferia celular. Por otro lado, la ausencia de señal de ORAI1 fosforilado en la Thr295 en células tratadas con la fosfatasa lambda y en células que expresan ORAI1-(T295A/S298A)-GFP confirmaron que los anticuerpos son fosfoespecíficos también en ensayos de inmunolocalización.

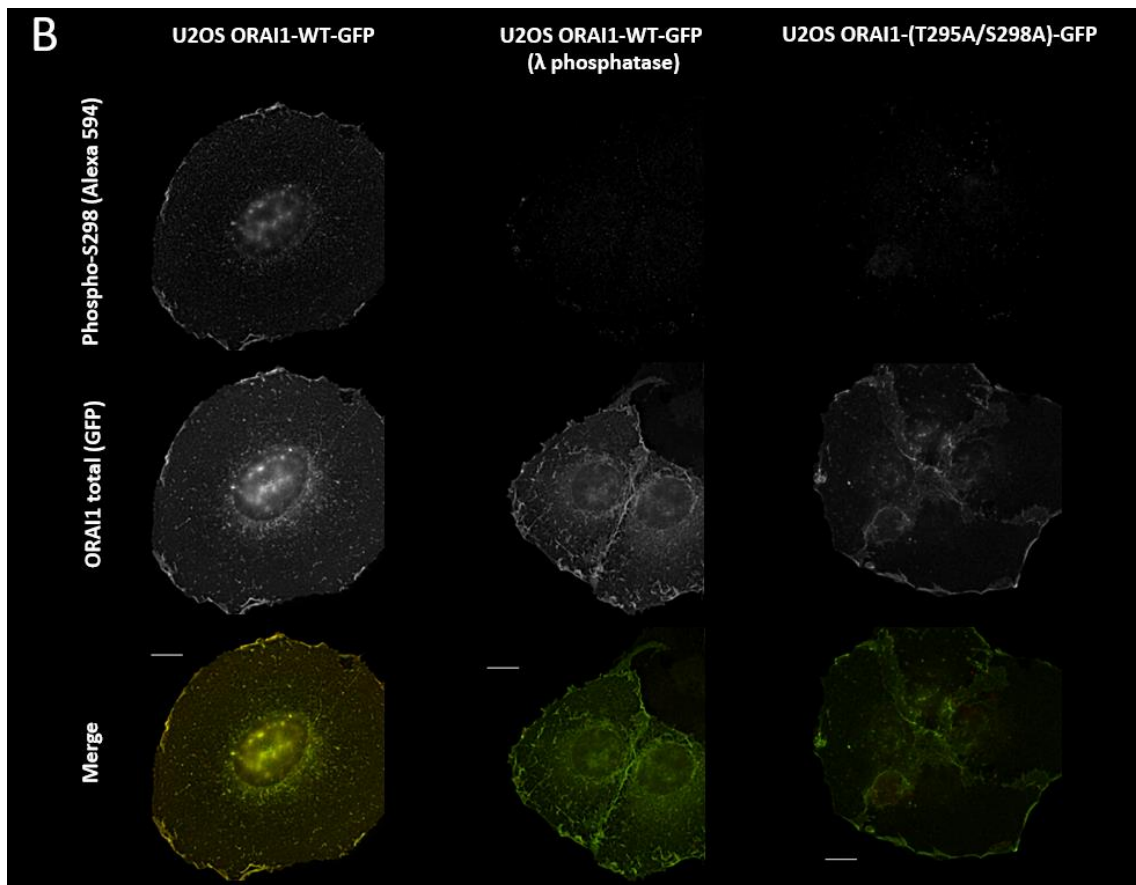
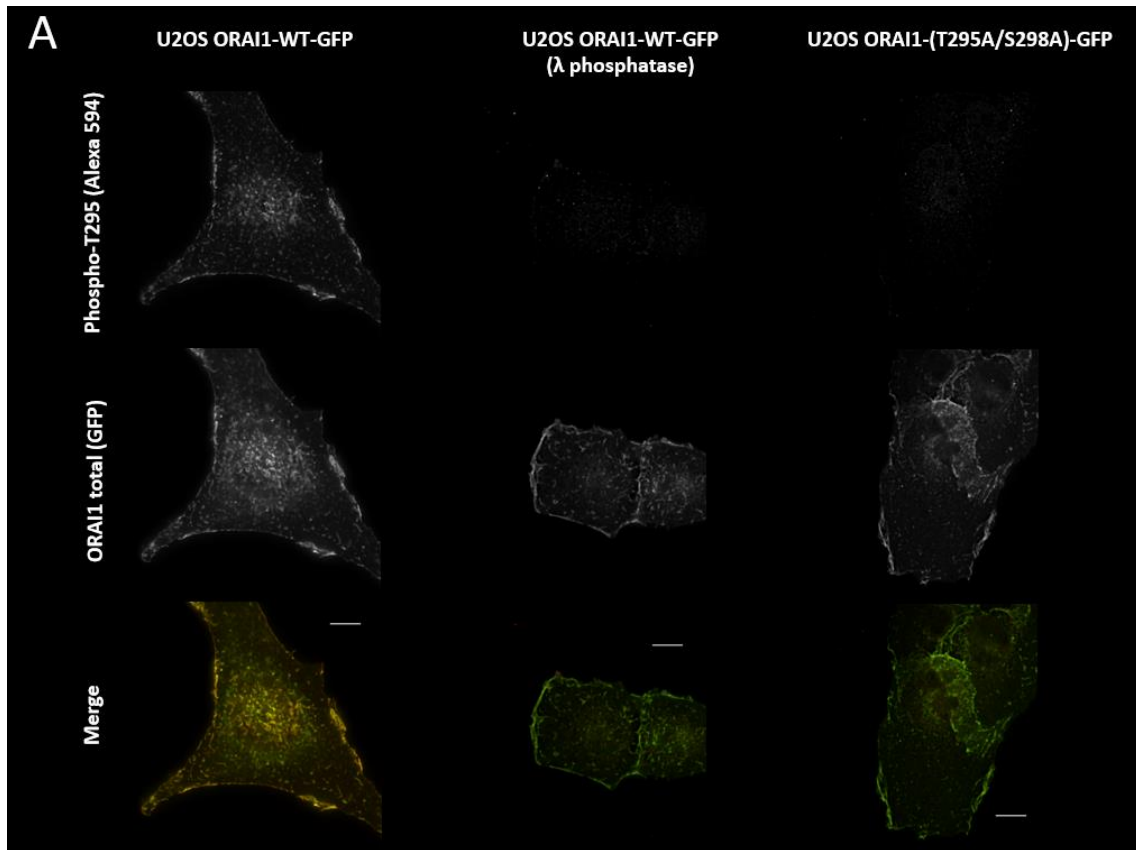


Figura 66. Inmunolocalización de ORAI1 fosforilado (Thr295 y Ser298) en células U2OS. Las células U2OS que sobre-expresaban ORAI1-WT-GFP y ORAI1-T295A/S298-GFP se sembraron en cubreobjetos pretratados con colágeno en medio DMEM suplementado con suero. Se mantuvieron 36-48 horas en cultivo hasta alcanzar una confluencia del 60-70%. A continuación, las células se fijaron en PFA y se realizó una inmunolocalización fosfoespecífica para los residuos Thr295 (panel A) y la Ser298 (panel B) utilizando un anticuerpo secundario Alexa Fluor 594. Como control negativo se trataron las células fijadas con fosfatasa lambda (10 U/ μ l) durante 8 horas a 30°C (segunda columna) y se utilizaron células que sobre-expresaban ORAI1-T295A/S298A-GFP (tercera columna). Posteriormente, las células se visualizaron mediante microscopía de epifluorescencia. En la figura, ORAI1 fosforilado se muestra en ambos paneles (A y B) en rojo (primera fila), ORAI1 total en verde (segunda fila) y la superposición de ambos marcadores aparece en la tercera fila. Las imágenes son representativas de 3 experimentos diferentes y 12 células totales. Barra de escala = 10 μ m.

En el panel B de la figura 66 se muestran los resultados del ensayo de inmunolocalización en la Ser298 fosforilada de ORAI1, observándose el pool de proteína fosforilada en este residuo especialmente en áreas corticales y *ruffles* de membrana, mientras que la proteína total (ORAI1-GFP) se encuentra ampliamente distribuida en el interior de la célula y la periferia celular. De manera similar a lo que ocurre con la señal de ORAI1 fosforilado en T295, aquí se observa la ausencia de señal en células tratadas con la fosfatasa lambda y en células que expresan ORAI1-(T295A/S298A)-GFP, (segunda y tercera columna), confirmándose de esta manera la especificidad del anticuerpo anti-fosfo-Ser298.

Estos resultados nos permiten concluir que los anticuerpos generados reconocen específicamente los residuos fosforilados de ORAI1 Thr295 y Ser298 en experimentos de inmunolocalización. Por otro lado, los resultados muestran que la localización de ORAI1 fosforilado en esos residuos es principalmente cortical y en zonas de *ruffles* de membrana, aunque también se detecta un pequeño pool de proteína fosforilada en regiones del interior celular.

3.1. Localización de ORAI1 mutado a alanina en los residuos de Thr295 y Ser298

Dado que la proteína ORAI1 fosforilada en los residuos de Thr295 y Ser298 parece concentrarse en zonas de *ruffles* de membrana y en la periferia celular, el siguiente paso de nuestro estudio fue determinar la localización de ORAI1 cuando está mutado en estos residuos emulando una desfosforilación constitutiva (T295A/S298A). Para ello se llevaron a cabo ensayos de colocalización con cortactina, marcador de zonas del *ruffling* de membrana. Las células U2OS FLP-In T-REx que sobre-expresaban ORAI1-WT-GFP y ORAI1-(T295A/S298A)-GFP de manera inducible por doxiciclina se sembraron en cubreobjetos pretratados con colágeno, se transfectaron para la expresión transitoria de mCherry-CTTN y se mantuvieron en cultivo durante 36-48 horas en medio DMEM suplementado con 10% de suero. Al alcanzar la confluencia óptima fueron fijadas en PFA. Posteriormente, las células fijadas se analizaron mediante microscopía de

Resultados: Capítulo II

epifluorescencia. Los resultados de la colocalización de ORAI1-WT-GFP y mCherry-CTTN se muestran en el panel de la figura 67 (fila superior), donde se muestra la localización de ORAI1 en verde (columna izquierda), CTTN en rojo (columna central) y la imagen resultante de superponer las imágenes anteriores en la columna derecha (*merge*). Al analizar las imágenes, observamos que hay un patrón de distribución en la periferia celular donde coinciden las señales de ORAI1-WT y CTTN con cierto grado de colocalización.

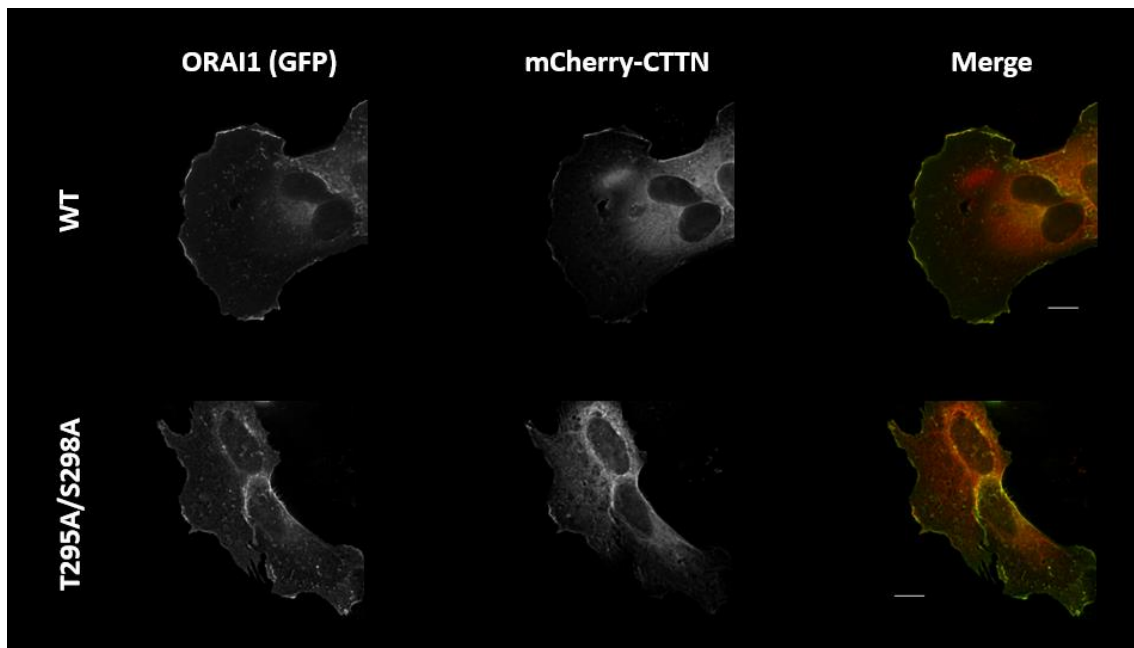


Figura 67. Colocalización de ORAI1-GFP (WT y T295A/S298A) y mCherry-CTTN en células U2OS. Las células U2OS FLP-In T-REx que sobre-expresaban de forma inducible por doxiciclina ORAI1-WT-GFP y ORAI1-(T295A/S298A)-GFP se sembraron en cubreobjetos pretratados con colágeno y se transfectaron para la expresión transitoria de mCherry-CTTN. A las 30 horas de la transfección, las células se fijaron y se visualizaron mediante microscopía de epifluorescencia. Los canales Cherry y GFP se registraron secuencialmente utilizando bloques de filtros independientes. En las imágenes ORAI1-GFP se muestra en verde (columna izquierda) y CTTN en rojo (columna central). La superposición de ambas proteínas se obtuvo fusionando las dos imágenes (*merge*, columna derecha). Las imágenes son representativas de 2 experimentos independientes. Barra de escala = 10 μ m.

En la figura 67 se observa que la proteína ORAI1-WT-GFP se localiza tanto en el interior celular como en regiones corticales, pero es más abundante en regiones corticales de la célula. Por otro lado, los resultados muestran un cambio significativo en la localización de ORAI1-GFP cuando se encuentra mutado a alanina en los residuos Thr295 y Ser298, ya que en este caso se encuentra principalmente en el interior celular y se localiza de forma más limitada en regiones corticales de la célula (figura 67, panel inferior). Resulta interesante destacar que cuando se sobre-expresa ORAI1-(T295A/S298A)-GFP, la distribución de CTTN también pierde prácticamente su localización cortical y exhibe una localización más internalizada que cuando se coexpresa

con ORAI1-WT (véase figura 67, panel superior). Un resultado similar se mostró en la figura 35, donde se observa que las células que sobre-expresan el mutante negativo de RAC1 (RAC1-T17N) muestran una disminución en la translocación de CTTN a la periferia, de la misma manera que se inhibió la localización periférica de ORAI1, es decir, se observó una colocalización internalizada para ambas proteínas.

Puesto que hemos observado un enriquecimiento de ORAI1-(T295A/S298A)-GFP en el interior celular, nos planteamos determinar el estado de fosforilación de la proteína ORAI1 cuando se encuentra internalizada. Para ello, se analizó el nivel de fosforilación de ORAI1 en células tratadas con el inhibidor de RAC1, NSC 23766, ya que en estas condiciones se ha observado que ORAI1 se encuentra mayoritariamente en vesículas de cis-Golgi (Figura 40). Para ello se llevó a cabo un ensayo en el que se sembraron en medio completo células U2OS que sobre-expresaban ORAI1-WT-GFP de manera inducible por doxiciclina. Las células se mantuvieron en cultivo 36 horas y, cuando fue necesario, se incubaron con NSC 23766 50 μ M. Posteriormente se analizó mediante inmunoblot el nivel de fosforilación de la Thr295 y la Ser298 de ORAI1 en cada una de las condiciones experimentales empleando los anticuerpos específicos anti-fosfo-Thr295 y anti-fosfo-Ser298. Para evaluar el nivel de expresión de la proteína total (ORAI1-WT-GFP) se empleó un anticuerpo anti-GFP. En la figura 68 se muestran los resultados, y observamos una drástica disminución en el nivel de fosforilación de los residuos Thr295 y Ser298 en las células que fueron tratadas con NSC 23766.

Los resultados muestran que el inhibidor de RAC1 NSC 23766 bloquea la fosforilación de ORAI1 tanto en el residuo Thr295 como en el residuo Ser298. Estos datos nos permiten sugerir que en el interior celular ORAI1 se encuentra principalmente desfosforilado en estos dos residuos, mientras que en zonas corticales de la célula ORAI1 se encuentra principalmente fosforilado en Thr295 y Ser298.

En resumen, si recapitulamos los resultados que se han presentado en esta segunda parte del trabajo, podemos indicar que hemos logrado validar *in vivo* parte del mapa de residuos fosforilados en el extremo C-terminal de ORAI1 mediante el empleo de los anticuerpos generados para tal fin. En experimentos posteriores hemos descrito el incremento de fosforilación de ORAI1 en los residuos Thr295 y Ser298 cuando se inhibe constitutivamente el transporte de Ca^{2+} a través del canal, mediante la mutación E106A de ORAI1. Este dato nos ha permitido sugerir que podría haber una relación directa entre la actividad del canal y la fosforilación de ORAI1 en estos residuos. Sin embargo, haría falta investigar en profundidad este resultado para confirmar esta hipótesis. En relación con la localización de ORAI1, podemos afirmar que el pool de ORAI1 fosforilado en ambos residuos se distribuye preferentemente en regiones corticales de la célula, aunque no de forma exclusiva. En relación con el perfil de localización de ORAI1, hemos observado que la mutación T295A/S298A provocó que

Resultados: Capítulo II

ORAI1 se encuentra localizada principalmente en regiones internalizadas. Además, la mutación T295A/S298A afectó no solo a la distribución cortical de ORAI1, sino también a la de CTTN, lo que sugiere que la fosforilación de los residuos Thr295 y Ser298 de ORAI1 es necesaria para la localización en zonas del *ruffling* de membrana de ambas proteínas, aunque queda aún por determinar el mecanismo que regula la actividad y la localización de ORAI1 en respuesta al estado fosforilado/desfosforilado de estos residuos.

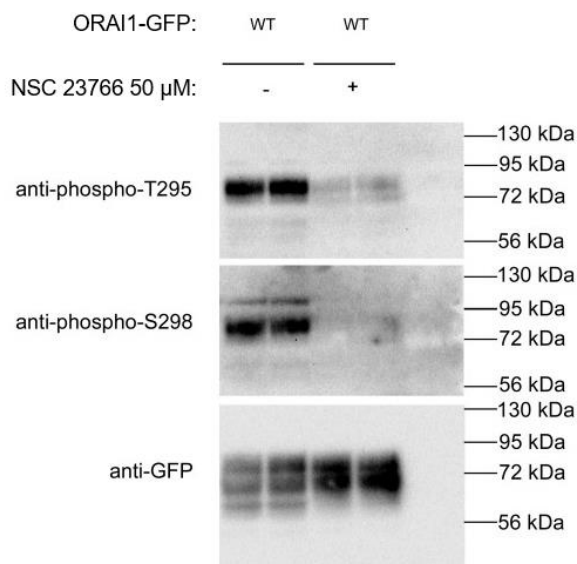


Figura 68. Análisis de la fosforilación en la Thr295 y Ser298 tras inhibición de RAC1.

Las células U2OS FLP-In T-REx que sobreexpresan ORAI1-WT-GFP de manera inducible con doxiciclina se sembraron en medio de cultivo completo durante 36 horas y antes de la lisis, se trataron durante 8 horas con NSC 23766 50 μM. A continuación, se analizó por inmunoblot el nivel de fosforilación de los residuos Thr295 y Ser298 en ambas condiciones ensayadas a partir de 45 μg de proteína de lisado total con los respectivos anticuerpos específicos anti-fosfo-Thr295 y anti-fosfo-Ser298. El nivel de expresión de la proteína total (ORAI1-GFP) se analizó con un anticuerpo específico anti-GFP.

Discusión

En esta Tesis Doctoral se han investigado los mecanismos moleculares que controlan la localización del canal de Ca^{2+} ORAI1 en células en migración, utilizando para ello la línea de osteosarcoma humano U2OS, un modelo celular con un alto potencial invasivo (Lauvrak et al., 2013). Para que tenga lugar una migración celular eficiente se requiere la reorganización del citoesqueleto cortical de actina, la polarización transitoria de la célula y la generación de protrusiones de membrana para el avance celular. En los últimos años, numerosos grupos de investigación han centrado sus esfuerzos en estudiar cómo la señalización de Ca^{2+} regula los procesos de migración e invasión de células tumorales, y qué proteínas regulan esta señalización. En este sentido se ha descrito que el desarrollo de estructuras celulares que permiten la migración celular es regulado por el ion Ca^{2+} a través de la reorganización del citoesqueleto de actina, la generación de fuerzas de tracción y el ensamblaje-desensamblaje de adhesiones célula-sustrato (Brundage et al., 1991; Condeelis, 1993; Cox & Huttenlocher, 1998; Lee et al., 1999; Pettit & Fay, 1998; Van Haastert & Devreotes, 2004).

Debido a que el ion Ca^{2+} está implicado en numerosas vías de señalización, se requieren un control espaciotemporal del aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para que actúe adecuadamente como segundo mensajero en las diferentes rutas de señalización. De este modo, se requiere un control estricto de la localización de los picos/ondas de Ca^{2+} citosólicos, así como de la intensidad y el tiempo que se mantienen elevados los niveles de Ca^{2+} en una región concreta de la célula hasta retornar de nuevo al nivel basal (Berridge, 2012). Algunos de los estudios pioneros iniciados en la década de los años 90 ya describieron un control espaciotemporal de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante la migración celular, como los trabajos realizados por Brundage y cols., que describieron una mayor $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el polo posterior de células en migración (Brundage et al., 1991). Desde entonces, numerosos estudios han tratado de elucidar detalles sobre el control espaciotemporal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a lo largo del eje antero-posterior de la célula, así como su relación con proteínas del citoesqueleto implicadas en el control de la migración celular. Esta diferencia antero-posterior en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se debe a una localización subcelular diferencial de los canales y bombas de Ca^{2+} . Por ejemplo, en el frente de avance hay una mayor concentración de PMCA (Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática) y una mayor densidad de SERCA (Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarco(endo)plasmático), lo que facilita una disminución localizada de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en esta región (Tsai et al., 2014). En la parte posterior de la célula en migración, zona de retracción, existe una amplia gama de canales de Ca^{2+} que aumentan la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y facilitan la activación de la quinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) y de los procesos dependientes de la quinasa Rho, que son necesarios para estimular la contracción de la actomiosina y facilitar la retracción celular (Mladinich & Huttenlocher, 2013). Por esta razón, la localización subcelular de los diferentes canales de Ca^{2+} de membrana plasmática es crítica a la hora de realizar su función como reguladores de la migración celular, ya sea en el frente de migración o modulando el recambio de las adhesiones focales.

Discusión

Numerosos autores han pretendido dilucidar cuáles son los canales de Ca^{2+} que tienen un papel relevante durante la migración celular. En este sentido se ha establecido que el Ca^{2+} extracelular tiene un papel crítico en la migración celular y que el influjo de Ca^{2+} procede principalmente de los canales mecanosensibles, como los TRPCs, y los canales SOCs. En el primer caso, los trabajos de Wei y cols. describieron la existencia de microdominios oscilantes de Ca^{2+} (*flickers*) en las lamelas del frente de avance de macrófagos en migración, inducidos por la actividad conjunta del canal TRPM7 y la transducción de señales a partir de IP_3R en respuesta al tratamiento con PDGF (Wei et al., 2009). Estos autores observaron una polarización en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ cuatro veces superior en el eje anterior de la célula frente al eje posterior, un dato claramente en oposición al gradiente global de Ca^{2+} descrito en (Brundage et al., 1991). Por otro lado, la entrada de Ca^{2+} operada por depósito (SOCE) ha sido señalada como un mecanismo de influjo de Ca^{2+} que regula la migración de las células cancerosas y no cancerosas (Bisaillon et al., 2010; Yang et al., 2009) y se ha mostrado que tiene un papel clave en la metástasis celular (Berridge et al., 2003). Un avance significativo en este campo ha sido la investigación desarrollada por Yang y cols. mostrando que la supresión de STIM1 u ORA1 mediante RNA de interferencia ralentiza la migración celular *in vitro* e inhibe la metástasis de las células MDA-MB-231 en ratones inmunodeprimidos (Yang et al., 2009). Estos resultados, junto con la inhibición del ensamblaje y desensamblaje de las adhesiones focales y la inhibición de la progresión tumoral en ratones mediante SKF96365, un inhibidor de SOC, sugirieron que SOCE subyace a una parte significativa de la entrada de Ca^{2+} necesaria para la migración celular.

SOCE es un mecanismo de influjo de Ca^{2+} extracelular que se activa en respuesta a la liberación de Ca^{2+} desde el RE, que habitualmente está inducida por la activación de la fosfolipasa C (PLC) en la membrana plasmática. La activación de PLC tiene lugar a través de la unión de ligandos a receptores acoplados a proteínas G (GPCR) o por estimulación de receptores tirosina quinasa (RTKs), lo que promueve la generación de IP_3 y la consiguiente liberación de Ca^{2+} del RE. En este sentido, el estudio llevado a cabo por Tobias Meyer y su grupo de investigación permitió establecer parte de la organización espacial de algunas proteínas que regulan la entrada de Ca^{2+} y su señalización durante la migración celular (Tsai et al., 2014). En este trabajo se mostró que se genera un gradiente de diacilglicerol (DAG) como resultado de la actividad asimétrica de la PLC en el frente de migración, que conduce al reclutamiento y la activación de PKC β , una quinasa implicada en la migración mediante la fosforilación de miosina (Pasapera et al., 2015), u otros sustratos del citoesqueleto. Además, en este mismo trabajo mostraron que STIM1 se encuentra en mayor concentración en el frente de avance y que esta polarización de STIM1 depende de los microtúbulos, ya que STIM1-I644N/P645N, una versión mutada de STIM1 que no se une a EB1, no llega a polarizar en estas células. Este trabajo permitió sugerir una organización espacial en la señalización del Ca^{2+} intracelular durante la migración, y en consonancia con los trabajos

de Wei y cols. (Wei et al., 2009) apuntó a la existencia de microdominios de Ca^{2+} en el frente de avance de células en migración.

A partir de toda esta información surge la pregunta sobre la localización de los canales SOCs y su regulador STIM1 en las células en migración. Entre los canales SOC, se ha prestado mucha atención a ORAI1, ya que se ha observado una regulación al alza de su expresión en una gran variedad de líneas celulares de cáncer y tumores primarios (Fiorio Pla et al., 2016; Vashisht et al., 2015), lo que apunta a que ORAI1 es un potencial objetivo para la terapia del cáncer. ORAI1 participa en la transición epitelio-mesénquima de las células de cáncer de mama (Davis et al., 2012) y regula positivamente la migración, pero no la proliferación celular (Yang et al., 2009). Sin embargo, el homólogo ORAI3 está implicado en la regulación de la proliferación y la supresión de la muerte celular de las células cancerosas (Faouzi et al., 2011; Motiani et al., 2013; Vashisht et al., 2015), pero desempeña un papel menor en la migración celular. En este sentido, conocer la localización subcelular de ORAI1 permite explicar los procesos de migración celular en fenotipos patológicos como es el caso de la metástasis de células tumorales.

Con respecto al regulador de ORAI1, STIM1, y tal y como se ha comentado, para alcanzar el frente de migración STIM1 requiere de la unión a microtúbulos a través de EB1 (Tsai et al., 2014). Sin embargo, el frente de migración carece de microtúbulos, ya que la formación de filopodios y lamelipodios está impulsada por la actina (Ballestrem et al., 2000), por lo que se requería una explicación adicional para esta relocalización. La explicación que nuestro grupo propuso en trabajos anteriores fue la activación de STIM1 específicamente en el frente de migración mediante un mecanismo regulado por fosforilación (Pozo-Guisado et al., 2013). El frente de migración está enriquecido de receptores tirosina quinasas (RTKs) (Assaker et al., 2010), y muchos de estos RTKs activan la vía de la quinasa ERK1/2. ERK1/2 fosforila a STIM1 en los residuos Ser575, Ser608 y Ser621 (Casas-Rua et al., 2015) que están cerca de la secuencia que se une directamente a EB1, lo que lleva a la disociación del complejo STIM1-EB1 (Pozo-Guisado et al., 2013), permitiendo la disociación de STIM1 de los microtúbulos en los lamelipodios (libres de microtúbulos). También se observó que la fosforilación de STIM1 en estos residuos es necesaria para la activación de SOCE a través de la yuxtaposición de ORAI1 y STIM1 en zonas de la membrana plasmática. Por lo tanto, la estimulación de las células con activadores de la vía MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos), como EGF o IGF-1 (Ballestrem et al., 2000), induce la fosforilación de STIM1 y la disociación de STIM1 de los microtúbulos (Pozo-Guisado et al., 2013), lo que podría permitir la generación de pulsos locales y transitorios de Ca^{2+} en el frente de migración. El papel de estos residuos terminó por confirmarse con la descripción de que STIM1 fosforilado (activo) se localiza en el frente de migración, donde colocaliza con cortactina (CTTN), regulador del citoesqueleto en las zonas de *ruffling* de membrana (Lopez-Guerrero, Tomas-Martin, et al., 2017).

Discusión

Una vez demostrado que STIM1 fosforilado (activo) se encuentra enriquecido en el frente de migración celular, el mecanismo propuesto requiere la participación de un canal de Ca^{2+} activado por STIM1, y los resultados obtenidos por nuestro grupo son los primeros en mostrar el enriquecimiento de ORAI1-GFP en el frente de migración de las células. En este sentido hemos observado que ORAI1 colocaliza y coprecipita con CTTN, apoyando estos resultados el mecanismo propuesto en el que ORAI1 regula la organización del citoesqueleto y la migración celular. Nuestra propuesta encaja bien con la mayor actividad de la PMCA (Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática) descrita en el frente de migración (Tsai et al., 2014), ya que se debe esperar una alta frecuencia de picos de Ca^{2+} citosólico en el frente de migración, y por lo tanto una alta tasa de extrusión de Ca^{2+} para contrarrestar esos aumentos transitorios de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mediados por canales de Ca^{2+} , como ORAI1. Sin embargo, todavía no está claro cómo STIM1 y ORAI1 son reclutados en estas regiones de las células.

Nuestro grupo ha generado líneas celulares U2OS deficientes en la expresión de STIM1 o de ORAI1 (STIM1-KO y ORAI1-KO) mediante edición genómica con CRISPR/Cas9. En ambos casos, la supresión de la expresión de STIM1 u ORAI1 condujo a una notable reducción de la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos (SOCE) y una importante inhibición de la migración celular, poniendo de manifiesto que ambas proteínas son totalmente necesarias para el *ruffling* de membrana y la migración celular (Lopez-Guerrero, Tomas-Martin, et al., 2017). Este fenotipo defectivo en migración fue revertido mediante la expresión de STIM1-mCherry y ORAI1-mCherry en células STIM1-KO y ORAI1-KO respectivamente. Estos resultados demostraron que SOCE, modulado por el par STIM1-ORAI1, regula el *ruffling* de membrana en la región cortical de la célula (Lopez-Guerrero, Tomas-Martin, et al., 2017). Además, ORAI1 endógeno y ORAI1-GFP sobre-expresado, co-inmunoprecipitó con CTTN endógena. En este sentido es interesante destacar que la estimulación de las células con EGF, que estimula la migración celular, potencia la coprecipitación de ORAI1 con CTTN junto con ARP2/3 y CYFIP1, importantes reguladores de la nucleación de actina y la reorganización del citoesqueleto cortical en el frente de migración. De este modo, todos estos resultados apoyan la relación funcional que existe entre SOCE, la reorganización cortical del citoesqueleto, la polarización y la migración celular (Lopez-Guerrero, Tomas-Martin, et al., 2017).

Es importante señalar que, a partir de ensayos de motilidad, en este trabajo se muestra que las células ORAI1-KO presentan un bajo nivel de persistencia del lamelipodio, un bajo nivel de persistencia direccional y, por tanto, una disminución en la velocidad de migración, resultados que concuerdan con el deficiente *ruffling* de membrana observado en células ORAI1-KO. Así, analizados en conjunto estos datos, nuestros resultados apoyan un papel significativo de ORAI1 en el control de la formación de lamelipodios y sugiere que ORAI1 es una proteína necesaria para la migración celular.

En lo que se refiere al papel de ORAI1 en el frente de migración, trabajos previos describieron que tanto el *knock-down* de ORAI1 como la inhibición farmacológica de este canal no provocaba ningún efecto en la polaridad celular (Huang et al., 2015). Además, describieron la localización de STIM1 en la parte posterior de la célula, pero no observaron ninguna colocalización de ORAI1 con STIM1 en la parte posterior de la célula (Chen et al., 2017). Sin embargo, en apoyo a lo descrito por nuestro grupo sobre el papel de ORAI1 en el frente de migración celular, otro trabajo mostró un enriquecimiento de STIM1 en la parte frontal de las células endoteliales umbilicales humanas en migración (Tsai et al., 2014), lo que supone que existe aún cierta controversia en cuanto a un aspecto tan básico como es la determinación de la localización de STIM1 y ORAI1 en células en migración. Por ello, en este trabajo nos hemos preguntado por el mecanismo básico que recluta a ORAI1 en el frente de avance. En este sentido, la proteína RAC1 activa recluta a CTTN en el frente de migración para ayudar, junto con ARP2/3 (Z. Chen et al., 2010; Krause & Gautreau, 2014), en la formación de lamelipodios. Dado que encontramos que la localización de ORAI1 solapa con la de CTTN, y este regulador del citoesqueleto está controlado por la activación de RAC1, consideramos inicialmente la hipótesis de que ORAI1 pudiera estar también bajo el control de RAC1. En nuestro trabajo hemos observado que la inhibición de RAC1 condujo a una reducción significativa de la translocación de ORAI1 a los lamelipodios. Este resultado se observó tanto con la sobre-expresión de un mutante negativo de RAC1 (RAC1-T17N), como con el tratamiento de las células con NSC 23766. En ambos casos se observó una inhibición de la localización periférica de ORAI1, mostrando estas células un enriquecimiento de ORAI1 en el cis-Golgi. En cambio, cuando se expresa una versión constitutivamente activa de RAC1 (RAC1-G12V), tanto ORAI1 como CTTN se encuentran localizados conjuntamente en la periferia celular, sin que se observe una polarización de la célula. Este resultado puede explicarse por el hecho de que la actividad de RAC1-G12V o la actividad del mutante RAC1-Q61L es independiente de los receptores de tirosina quinasas que se encuentran polarizados en la célula, de modo que es capaz de desencadenar la formación de lamelipodios en toda la periferia celular (Aspenström, 2019; Bourne et al., 1991; Michiels et al., 1995; van Leeuwen et al., 1995; Zhuge & Xu, 2001), dando lugar a una morfología celular en la que toda la periferia actúa como lamelipodio. Todos estos resultados indican que ORAI1 forma parte del complejo molecular que regula la formación de lamelipodios mediante un mecanismo dependiente de la actividad RAC1, la cual tiene un papel crítico en la polimerización y ramificación de la actina en la parte frontal de la célula.

Es conocido que la activación de RAC1 puede llevar a la fosforilación de CTTN por quinasas como Src, controlando RAC1 de esta manera la activación y la localización de CTTN en el frente de migración (Head et al., 2003; Huang et al., 1998), además de promover el reclutamiento de otras proteínas que participan en la nucleación de actina para formar lamelipodios, como la proteína ARP2/3. Por otro lado, la actividad RAC1

Discusión

está regulada por RTKs, a los cuales pertenece el receptor de EGF (EGFR). Estos resultados permiten explicar que en nuestro trabajo observemos mayor coprecipitación de ORAI1 con CTTN y ARP2/3 cuando se estimulan las células con EGF, así como que se muestre una menor coprecipitación de ORAI1 con CTTN en respuesta a EGF tras la inhibición de RAC1 con NSC 23766. Este resultado podría apoyar las conclusiones del estudio realizado en 2007 por Evans y Fake, en el que describieron la necesidad de un influjo de Ca^{2+} en macrófagos para el mantenimiento del *ruffling* de membrana controlado por RAC1 a través de la ruta PI3K, aunque en este trabajo los autores no pudieron establecer el mecanismo molecular por el cual tendría lugar dicho influjo (Evans & Falke, 2007). Gracias al uso de wortmanina, un inhibidor de la PI3K, estos autores observaron una disminución en la producción de PIP_2 en el frente de migración y una inhibición del *ruffling* de membrana, además de concluir que este proceso era dependiente del influjo de Ca^{2+} . En nuestro estudio, hemos visto que la actividad RAC1 controla la localización de ORAI1 en *ruffling* de membrana y hemos observado que la pérdida del *ruffling* es consecuencia directa de la eliminación de ORAI1, ya que la sobreexpresión ectópica del canal de Ca^{2+} en células ORAI1-KO recupera el fenotipo silvestre, mostrando de nuevo las células un fenotipo con *ruffling* de membrana.

Se ha propuesto que otros canales de Ca^{2+} , además de ORAI1, desempeñan una función clave en la migración celular, aunque ninguno de ellos ha sido descrito hasta la fecha como específico del frente de migración. Se conoce que algunos de estos canales, como Cav1.2, TRPM7 y TRPV4 participan en la regulación de la contracción del eje posterior de la célula (Kim et al., 2016; Kuras et al., 2012; Mrkonjić et al., 2015; Yang & Huang, 2005). En este sentido, las ondas de Ca^{2+} mediadas por la acción Cav1.2 en la parte posterior de las células en migración actúan como un transductor esencial en el establecimiento del gradiente creciente de Ca^{2+} desde el eje anterior al eje posterior, el cual es necesario para que tenga lugar una migración celular dirigida (Kim et al., 2016). Se sabe además que esta entrada de Ca^{2+} en el eje posterior activa una ruta iniciada por Ca^{2+} /calmodulina y mediada por CaMKII para activar la quinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) por fosforilación e inhibir la fosfatasa MLCK, lo que conduce a la fosforilación de la actomiosina y promueve la retracción de la actomiosina en la parte posterior de la célula (cola o eje de retracción). Además, es interesante destacar que los canales Cav1.2, TRPM7, TRPV4 y otros miembros de la familia TRPC son canales que presentan mayor conductancia que ORAI1 (50-60 pS para TRPV4, 40 pS para TRPM7, 8 pS para Cav1.2 e inferior a 1 pS para ORAI1) (Abdullaev et al., 2008; Li et al., 2006; Parekh & Putney, 2005; Watanabe et al., 2002), lo que favorece una mayor concentración de Ca^{2+} citosólico en esta región. Todos estos datos, que apoyan en su conjunto la localización de ORAI1 en frente de migración, concuerdan con la propuesta de que existe un gradiente creciente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ desde el frente de migración a la región posterior, de modo que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es menor en el frente de migración y superior en la región de retracción.

Nuestros resultados nos permiten proponer que ORAI1 es translocado al frente de migración por un mecanismo dependiente de RTKs y que este mecanismo puede ser activado por el factor de crecimiento EGF. De este modo, la translocación de ORAI1 a la periferia celular estimulada por EGF sería responsable de activar pulsos locales de Ca^{2+} en el frente de avance de la célula, permitiendo la reorganización del citoesqueleto cortical y la migración celular. Por otro lado, López-Guerrero y cols. establecieron también que la activación de STIM1 se activa en respuesta a EGF bajo el control de la ruta de señalización Src-Raf-MEK-ERK (Lopez-Guerrero, Pascual-Caro, et al., 2017). A la luz de nuestros resultados, proponemos que SOCE relocaliza en *ruffling* de membrana a través de un mecanismo que es regulado por RAC1 y por la ruta de las MAPK (*mitogen-activated-protein kinases*) a través de la activación y relocalización en el frente de migración de sus dos proteínas efectoras, STIM1 y ORAI1. Ambas rutas participan en tumorigénesis, y es bien conocido que la activación de las rutas de señalización mediadas por EGF está directamente relacionada con mayor índice de invasividad, intravasación y metástasis (Wang et al., 2004; Xue et al., 2006). Además, es amplia la bibliografía donde se describe la participación de los canales SOC, y concretamente de ORAI1, en eventos pre-metastáticos (Prevarskaya et al., 2014; van der Zwaag et al., 2010; Yang et al., 2009). El hecho de que EGF, a través de un mecanismo dependiente de RAC1, potencie la relocalización de ORAI1 y STIM1 en *ruffling* de membrana, permite explicar que el influjo de Ca^{2+} a través de este canal estimula la migración celular.

En este trabajo hemos mostrado que ORAI1, además de ser crucial para la migración celular, también es responsable de la invasividad de las células tumorales. Para ello hemos utilizado larvas de pez cebra (mutante casper) como modelo animal y hemos observado que el perfil de invasividad de células en las que se suprimió la expresión de ORAI1 fue menor que en células sin modificación genética. En este sentido es interesante tener en cuenta que la matriz extracelular (ECM) constituye una barrera para la invasividad y diseminación de las células tumorales a otros tejidos circundantes, por lo que una alta actividad pre-metastásica requiere de una alta capacidad invasiva y proteolítica de la ECM (Fidler, 2003; Sabeh et al., 2009). Junto al potencial invasivo que muestran las células que expresan ORAI1, tal y como observamos en los ensayos de invasividad *in vivo* realizados en larvas de pez cebra, se conoce la capacidad proteolítica descrita para CTTN mediante la liberación de metaloproteasas (MMPs) y su participación en la formación de invadopodios (Artym et al., 2006; Clark et al., 2007), protrusiones de membrana que penetran en la matriz extracelular y contribuyen a su degradación (Linder, 2007). En este sentido, Sun y cols. propusieron la participación de SOCE en la invasividad y degradación de la matriz extracelular en estudios llevados a cabo en células de melanoma (Sun et al., 2014), lo que puso de manifiesto que el influjo de Ca^{2+} a través de esta ruta es indispensable para una migración eficiente. En este último trabajo citado, además, se determinó que la actividad de SOCE mediada por ORAI1 y STIM1 participa en el ensamblaje y actividad del invadopodio, lo cual permitió a los autores sugerir

Discusión

también la participación del influjo de Ca^{2+} y su organización espaciotemporal en los procesos invasivos y metastáticos. Estos autores llevaron a cabo diferentes ensayos en células de melanoma humano para analizar la degradación de la ECM en presencia de inhibidores de SOCE, como 2-APB y SKF96365, y observaron que la capacidad proteolítica de las células disminuía cuando éstas eran tratadas con estos inhibidores debido a una reducción en la secreción de metaloproteasas al inhibir SOCE, bien mediante inhibidores del canal o en células *knock-down* para ORAI1 y STIM1. En conjunto, estos datos apoyan el mecanismo propuesto por nuestro grupo, por el cual tanto ORAI1, a través de SOCE, como CTTN podrían actuar sinérgicamente a través del complejo molecular que promueve migración e invasividad. Aunque nosotros no hemos desarrollado estudios de invadopodios, lo anteriormente expuesto podría sugerir una vía de estudio donde ORAI1 y CTTN cooperen, no sólo a través de la formación de lamelipodios, sino un paso más allá del proceso migratorio, es decir a través de su participación en la formación de invadopodios. Todos estos resultados explicarían tanto el bajo índice tumorigénico como metastático de células deficientes en la expresión de ORAI1 y/o CTTN (Stock et al., 2019).

En la transición epitelio-mesénquima (EMT) las células adquieren un fenotipo mesenquimal, lo cual les confiere la capacidad de migrar e invadir otros tejidos. La EMT comparte características comunes con las primeras etapas del proceso metastático a través de la formación de invadopodios. De este modo, se ha descrito la participación de ORAI1 y SOCE en la transición del epitelio-mesénquima (EMT). En relación a ORAI1, se ha descrito por ejemplo su participación en el desarrollo de EMT inducido por TGF- β en células de cáncer colorrectal (Kang et al., 2021). Además, se conoce que RAC1 activa a través de PI3K la última etapa de la EMT (Van Aelst & D'Souza-Schorey, 1997) y que PI3K desempeña un papel crucial en el inicio de la polaridad celular antero-posterior y en el reclutamiento de GEFs de RAC y CDC42 al frente de migración (Nelson, 2009), siendo todos ellos resultados que apoyan un papel para ORAI1 en la capacidad invasiva de las células, como se ha mostrado aquí para las células U2OS. De hecho, en 2019 Guo y cols. propusieron que la metástasis inducida en células de osteosarcoma a través de la ruta RAS-RAC-WAVE2 era promovida por ORAI1 (Guo et al., 2019). En este estudio los autores observaron que el silenciamiento de la expresión de ORAI1 y el bloqueo de SOCE con el inhibidor 2-APB provocaban menor tasa de migración, de adhesión e invasividad, y por consiguiente menor capacidad metastática. Esta observación concuerda con nuestros resultados obtenidos en los ensayos de motilidad e invasividad en larvas de pez cebra para las células ORAI1-KO, lo cual refuerza la propuesta de que ORAI1 y SOCE juegan un papel crítico durante la migración celular. Sin embargo, según el mecanismo establecido por Guo y cols., ORAI1 controla la actividad de RAS-RAC y WAVE2 regulando la participación de estos últimos en migración, una hipótesis que se opone al mecanismo propuesto por nuestro grupo de investigación en el que ORAI1 opera bajo el control de RAC1 promoviendo la reorganización del citoesqueleto y la migración en el frente de

avance celular. Nuestros resultados muestran que la sobre-expresión del mutante activo de RAC1 (G12V) dirige a ORAI1 a toda la periferia celular, lo cual sugiere un papel para ORAI1 en la formación de lamelipodios formando parte del complejo de proteínas activadas por RAC1. No obstante, son múltiples las diferentes rutas que EGF activa a través de RAC1, con una serie de candidatos, tales como PAK o Src, que podrían regular la localización de ORAI1 tras la activación de RAC1.

Adicionalmente nuestros resultados indican que ORAI1 juega un papel importante en el control del ratio de actina-F/actina-G. Se ha mostrado aquí que la ausencia de ORAI1 en la célula provoca un notable incremento en el nivel de la actina filamentosa (actina-F). Este resultado podría indicar que la entrada de Ca^{2+} a través de ORAI1 podría potenciar el desensamblaje de la actina-F, contribuyendo de este modo al reciclaje de la actina y permitiendo así su ramificación y la formación de lamelipodios. En este sentido se ha de destacar que un predominio de la ramificación sobre la elongación reduciría la velocidad de protrusión del lamelipodio, pero aumentaría su persistencia, ocurriendo lo opuesto si predomina la elongación. A nivel estructural, esto da lugar a una alta densidad de la red ramificada cuando la tasa de ramificación es alta. En nuestros resultados hemos observado que las células defectivas en ORAI1-KO presenta un ratio de actina-F/actina-G más elevado, lo cual sugiere la participación del canal de ORAI1 en el reciclaje de la actina filamentosa en las protrusiones de membrana a través de su participación en la ramificación de actina. Por su parte, los factores específicos de ensamblaje de actina de la familia Ena/VASP o las forminas promueven la elongación de filamentos específicos dentro de los lamelipodios y, por lo tanto, aceleran las tasas de protrusión lamelipodial (Krause & Gautreau, 2014). En este caso, tanto Ena/VASP como las forminas reclutan actina-G unida a profilina (profilina promueve el intercambio de ADP por ATP en la actina-G, haciéndola así competente para la polimerización) para elongar la actina-F de forma progresiva (Chesarone & Goode, 2009). En este escenario, las tasas de protrusión están equilibradas por dos actividades principales: La ramificación de actina dependiente de Arp2/3, CTTN y el complejo regulador de WAVE (WRC), que genera redes muy densas y rígidas que se mueven más lentamente y en la cual participa ORAI1 formando parte del complejo proteico anteriormente mencionado, y la elongación de filamentos de actina por miembros de la familia Ena/VASP y/o forminas, lo cual da lugar a redes menos ramificadas y más laxamente organizadas que sobresalen de manera más rápida. En este modelo, la ramificación de actina es responsable de una mayor persistencia direccional, aunque más lenta; mientras que la elongación promovida por factores como Ena/VASP da lugar a lamelipodios con mayores tasas de velocidad, pero menor persistencia direccional de la protrusión al migrar. Esta hipótesis es coherente, por ejemplo, con la dependencia lineal observada previamente en la velocidad de protrusión de la acumulación de EGFP-VASP en el extremo del lamelipodio (Rottner et al., 1999). Asimismo, también se ha descrito que las células deficientes en gelsolina presentan defectos en el *ruffling* de membrana y en la quimiotaxis (Lu et al., 1997; Witke

Discusión

et al., 1995), lo cual puede explicarse por la actuación conjunta de gelsolina y ARP2/3 para generar filamentos ramificados capaces de ejercer presión sobre la membrana, como los lamelipodios (Pantaloni et al., 2000).

Nuestros resultados nos permitieron concluir que ORAI1 media la activación de gelsolina y disminuye el ratio de actina-F/actina-G, facilitando así la ramificación del citoesqueleto de actina y la formación de lamelipodios. De forma paralela también mostramos que ORAI1 juega un papel en el desensamblaje de la actina-F, puesto que la presencia de este canal de Ca^{2+} es esencial para la unión de gelsolina a actina-F, ya que disminuye la coprecipitación de gelsolina a actina filamentosa en ausencia de ORAI1. Todo ello es coherente con un requerimiento de ORAI1 en el frente de migración. Estos resultados no deben resultar sorprendentes, puesto que el Ca^{2+} citosólico participa también en la despolimerización de actina mediante la activación de la cofilina a través de la quinasa dependiente de calcio/calmodulina (CaMK). Visto en conjunto, estos datos sugieren la necesidad de la entrada de Ca^{2+} y un gradiente polarizado en su concentración que garantice los ciclos de polimerización y despolimerización de actina en la célula, jugando ORAI1 un papel crucial en estos procesos.

Una vez analizado el papel de ORAI1 en el frente de migración celular, nos propusimos investigar posibles modificaciones postraduccionales que pudieran regular la actividad del canal de Ca^{2+} ORAI1. Existen algunos estudios que han tratado de determinar los residuos de ORAI1 que se fosforilan y hasta la fecha se ha descrito que la proteína es fosforilada en el extremo N-terminal en los residuos Ser27 y Ser30 por la enzima PKC β (Kawasaki et al., 2010) y en la Ser34 por PKA (Zhang et al., 2019). Kawasaki y cols. observaron que la sustitución de la proteína endógena por la proteína mutada a alanina en los residuos Ser27 y Ser30 (ORAI1-S27A-S30A), inducía un incremento en SOCE y CRAC, por lo que sugirieron que la fosforilación de estos residuos podría regular la interacción de ORAI1 con STIM1, así como la apertura del canal. Por otro lado, en lo referente a la Ser34 de ORAI1, se ha observado que su fosforilación por PKA induce la inactivación del canal dependiente de Ca^{2+} (*CDI*, *Ca²⁺-dependent inactivation*) (Zhang et al., 2019). Estos resultados nos permiten sugerir que la regulación del canal ORAI1 depende en cierto modo de la fosforilación-desfosforilación de alguno de sus residuos por los que nos centramos en determinar el perfil de fosforilación de la proteína ORAI1.

En el perfil de fosforilación de ORAI1 que hemos obtenido mediante análisis de espectrometría de masas se observó la presencia de fosfo-residuos en el extremo N-terminal (las serinas 12, 13, 34 y la treonina 51) y en el extremo C-terminal (Thr295, Ser298 y Tyr300). Nuestros resultados confirman los hallazgos obtenidos en diferentes análisis previos realizados por espectrometría de masas y que estaban dirigidos a analizar el proteoma completo, y no una única proteína.

La importancia del extremo C-terminal en la interacción de ORAI1 con la proteína reguladora STIM1, así como la ausencia de una función descrita hasta la fecha para la secuencia de ORAI1 que comprende los residuos 295-301 del C-terminal (TPGSHYA) (Lunz et al., 2019), nos llevó a centrar nuestra investigación en el papel de la fosforilación de ORAI1 en el extremo C-terminal. Nuestros resultados muestran que la inhibición de la fosforilación del residuo Tyr300 no tiene, aparentemente, un efecto significativo sobre la actividad del canal. Por otro lado, resulta interesante que la mutación a alanina de los residuos Thr295 y Ser298 (T295A/S298A) induce un aumento en la entrada de Ca^{2+} en las células, y que la fosforilación de estos residuos aumenta significativamente cuando la corriente de Ca^{2+} a través del canal está inhibida (ORAI1-106A). Estos resultados nos permiten sugerir que existe una relación directa entre la actividad del canal y el nivel de fosforilación de ORAI1 en los residuos Thr295 y Ser298. Por otro lado, nuestros resultados muestran que en condiciones basales un gran pool de la proteína ORAI1 se encuentra fosforilado en estos residuos, lo que permite explicar que la mutación de ORAI1 a glutamato (ORAI1-T295E/S298E), que simula la fosforilación constitutiva de estos residuos, no presente ningún cambio en la entrada de Ca^{2+} en la célula y se comporte de forma similar a la proteína silvestre.

Un aspecto importante en la regulación de la actividad del canal ORAI1 es su localización celular. Según trabajos publicados por Machaca y cols., en reposo la mayor parte del pool de ORAI1 (aproximadamente un 60 %) se encuentra internalizado, mientras que el 40 % restante se localiza en la membrana plasmática. De este modo, este grupo relaciona la activación de SOCE con un incremento en el pool de ORAI1 localizado en la MP (del 40 al 65%), así como la inhibición de SOCE con la internalización del canal ORAI1 (Hodeify et al., 2015). En este sentido, nuestros resultados muestran que la localización de ORAI1 fosforilado en estos residuos es principalmente cortical y en zonas de *ruffles* de membrana, aunque también se detecta un pequeño pool de proteína fosforilada en regiones del interior celular. Sin embargo, resulta interesante el hecho de que exista un enriquecimiento de ORAI1 en el interior celular cuando expresamos la proteína ORAI1 mutada a alanina (ORAI1-S295A/T298A). Este resultado concuerda con la disminución en el nivel de fosforilación de ORAI1 cuando se induce su internalización con el inhibidor de RAC1 NSC 23766. En conjunto, estos resultados permiten sugerir que la proteína ORAI1 desfosforilada en los residuos Thr295 y Ser298 está relacionada con una mayor actividad del canal, y que la internalización de ORAI1 desfosforilado podría estar relacionada con la regulación negativa de la alta actividad presentada por el mutante ORAI1-T295A/S298A. Este mecanismo apoyaría trabajos realizados por otros grupos en los que SOCE es inhibido durante la mitosis de células de mamíferos mediante un mecanismo de internalización celular (Preston et al., 1991; Tani et al., 2007). También durante la meiosis en *Xenopus* se ha descrito la inhibición de SOCE mediante la internalización de la proteína ORAI1 a través de una vía endocítica dependiente de la proteína Rho, perteneciente a las RHO GTPasas, caveolina, Rab5 y

Discusión

dinamina (Yu et al., 2010), participando de este modo la endocitosis en el reciclaje y degradación de ORAI1 y en la cantidad de proteína disponible en la membrana plasmática. Durante la meiosis, la posible explicación de la inhibición de SOCE a través del internamiento del canal puede verse como un mecanismo de seguridad para prevenir la activación prematura del óvulo (Machaca & Haun, 2002). En el caso de ORAI1-T295A/S298A, la internalización de esta versión mutada del canal ORAI1 podría regular la alta actividad presentada con respecto a ORAI1-WT.

Siguiendo con la localización subcelular de ORAI1, estudios previos han demostrado que RAC1 dirige la localización de CTTN a *ruffling* de membrana (Ridley et al., 1992). Cuando las células del carcinoma de páncreas se trataron con dasatinib, un inhibidor de la quinasa Src, disminuyó la fosforilación de la Tyr42 de CTTN (Nam et al., 2005) y ésta se translocó desde la membrana plasmática al interior celular (Stock et al., 2019), de modo que estos resultados ponen de manifiesto que el enriquecimiento de CTTN en el frente de migración es dirigido por RAC1 mediante un mecanismo dependiente de fosforilación/desfosforilación. En este trabajo mostramos que RAC1 también dirige la localización de ORAI1 a *ruffling* de membrana. Resulta interesante que cuando se expresa el mutante a alanina de ORAI1, ORAI1-T295A/S298A, se observa un enriquecimiento tanto de ORAI1 como de CTTN en el interior celular. Este resultado nos permite sugerir que la localización subcelular de ORAI1 también podría estar regulada por un mecanismo de fosforilación/desfosforilación y que la señalización celular que dirige el *ruffling* de membrana en células en migración estaría determinado por el eje RAC1 → ORAI1 → CTTN, y no al contrario. Es decir que la relocalización de CTTN a la membrana plasmática, estimulada por RAC1, es regulada por la actividad del canal de Ca²⁺ ORAI1.

Otro de nuestros objetivos fue determinar si la translocación de ORAI1 al frente de migración inducida por EGF está acompañada por un incremento en la fosforilación de ORAI1 en los residuos Thr295 y Ser298. Nuestros resultados muestran que en presencia de EGF no tiene lugar un incremento en el pool de ORAI1 fosforilado en estos residuos. Tal y como se ha comentado anteriormente, el nivel basal de fosforilación de ORAI1 en los residuos Thr295 y Ser298 es alto, de modo que es posible que ORAI1 ya se encuentre fosforilado cuando EGF, a través de RAC1, induce la translocación de ORAI1 al frente de migración. De este modo, habría que investigar otras posibles rutas de señalización implicadas en la estimulación o inhibición de la fosforilación de la proteína ORAI1.

En conclusión, nuestros resultados muestran que ORAI1 tiene un papel crítico en la migración celular e invasividad a través de su interacción con marcadores del frente de avance celular, como es el caso de su interacción con CTTN. Además, la translocación de ORAI1 al frente de migración está regulada por la actividad de RAC1 y es potenciada por el factor de crecimiento epidérmico (EGF), lo cual sugiere que cuando ORAI1 se

encuentra activo en membrana plasmática forma parte del complejo molecular que controla y modula el avance de la migración celular. Por último, nuestros datos sugieren que la actividad del canal ORAI1 puede estar regulada por la fosforilación de los residuos Thr295 y Ser298, observándose una regulación negativa que está relacionada con la internalización del canal cuando estos residuos se encuentran desfosforilados.

Los resultados mostrados en nuestro trabajo ayudan a definir la regulación del citoesqueleto y la migración celular por STIM1-ORAI1, lo que podría permitir extrapolar estos resultados a situaciones patológicas como la metástasis en ciertos procesos tumorales. Existen actualmente algunos fármacos en quimioterapia que actúan a nivel de la señalización de Ras-Raf-MEK-ERK, que de hecho es una ruta que controla la fosforilación de STIM1. De igual modo existen algunos fármacos en quimioterapia que actúan a nivel de la señalización de RAC1. Se conoce que RAC1 estimula la iniciación de tumores, de modo que descubrir interactores o efectores específicos de RAC1, como ORAI1, podría ser una estrategia terapéutica plausible para el avance científico en este campo. En conclusión, estos resultados permiten conocer detalles moleculares de la interacción STIM1-ORAI1-citoesqueleto para poder actuar en estas rutas de señalización, de modo que el número de efectos colaterales no deseados de los fármacos utilizados en quimioterapia sea el menor posible.

Conclusiones

Las conclusiones derivadas del trabajo realizado durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral son:

1. La ausencia de ORAI1 provoca menor velocidad de migración, menor persistencia direccional y menor distancia de protrusiones en el frente de avance de las células, por lo que ORAI1 tiene un papel crítico en la regulación de la migración celular.
2. La ausencia de ORAI1 disminuye el potencial invasivo de las células U2OS en el modelo animal de larvas de pez cebra, lo que indica que el canal de Ca^{2+} ORAI1 es crítico tanto en los procesos de migración como de metástasis e invasividad celular.
3. ORAI1 forma parte del complejo macromolecular que regula la reorganización del citoesqueleto de actina y la formación de lamelipodios en el frente de migración y la formación de este complejo puede ser estimulada por EGF.
4. Tanto la sobre-expresión de un mutante negativo de RAC1, como el tratamiento con NSC 23766, conducen a la pérdida de localización polarizada de ORAI1, de modo que RAC1 es responsable de la translocación de ORAI1 a zonas del frente de migración celular a través de una ruta de señalización mediada por EGF-RAC1-CTTN-ORAI1.
5. Los anticuerpos generados en este trabajo confirman por primera vez la presencia *in vivo* de los residuos fosforilados en ORAI1 Thr295 y Ser298, más allá de los experimentos de fosfoproteómica publicados hasta la fecha.
6. La inhibición de la fosforilación de los residuos Thr295 y Ser298 (mutante T295A/S298A) induce un aumento en la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos intracelulares y la acumulación de ORAI1 en el interior celular, lo que indica que la fosforilación de ORAI1 en estos residuos está relacionada directamente con la actividad de este canal de Ca^{2+} .

Materiales y Métodos

1. Cultivos celulares

Para llevar a cabo este estudio se han empleado principalmente las células humanas de osteosarcoma U2OS, un modelo celular con un alto potencial invasivo (Lauvrak et al., 2013). Además, para algunos experimentos concretos se ha utilizado la línea celular HEK293 (células embrionarias de riñón humano).

Las líneas celulares se crioconservan en medio de congelación¹ en viales almacenados a -80°C. Las células se cultivan en medio DMEM completo² a 37°C y en una atmósfera húmeda de 5% de CO₂. Las células cultivadas crecen adheridas a la base de la placa formando monocapas hasta alcanzar una confluencia del 70-80%. Para recrecer un cultivo celular se procede a lavar la monocapa de células con PBS³ y a continuación se incuba con una solución de tripsina⁴ durante 3-4 minutos a 37°C. Transcurrido ese tiempo se inactiva la tripsinización mediante la adición de medio completo². En caso de que el experimento requiera un número determinado de células, se toma una alícuota de la suspensión celular y se procede al conteo de células utilizando para ello un hematocitómetro⁵.

2. Líneas celulares

2.1. Líneas celulares empleadas

Para los estudios que se han llevado a cabo se han empleado las siguientes líneas celulares:

- U2OS FLP-In T-REx proporcionadas por el Dr. Gopal Sapkota (Universidad de Dundee, Reino Unido).
- U2OS ORAI1-KO generadas como se describe en (Lopez-Guerrero, Tomas-Martin, et al., 2017).
- U2OS FLP-In T-REx que sobre-expresan de manera estable Flag-RAC1-WT, Flag-RAC1-G12V y Flag-RAC1-T17N generadas como se describe en (Pozo-Guisado et al., 2010).

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

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

³ **PBS:** NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 4.3 mM, KH₂PO₄ 1.4 mM, pH 7.4.

⁴ **Solución de tripsina (Gibco):** Tripsina 0.05%, EDTA (1X).

⁵ **Hematocitómetro:** Cámara de Neubauer o Countess™ Cell Counting Chamber Slides (*Invitrogen* C10283).

Materiales y Métodos

- U2OS FLP-In T-REx que sobre-expresan ORAI1-GFP (NP_116179.2) y ORAI1-T295A/S298A-GFP.
- U2OS ORAI1-KO que sobre-expresan Flag-Orai1, Flag-Orai1-T295A/S298A, Flag-Orai1-T295E/S298E, Flag-Orai1-Y300F, Flag-Orai1-Y300E.
- HEK293 FLP-In T-REx que sobre-expresan Flag-Orai1 (NP_116179.2).
- U2OS ORAI1-KO que sobre-expresan ORAI1 (NP_116179.2).

2.2. Generación de líneas estables mediante el sistema FLP-In T-REx

Las líneas celulares U2OS se transfectan de forma estable gracias al sistema FLP-In T-REx y mediante la clonación del cDNA de ORAI1 (ver Anexo I) en un vector pcDNA5/FRT/TO (*Invitrogen*). Este proceso se lleva a cabo en tres pasos:

1. Generación de células FLP-In T-REx mediante la integración independiente de dos plásmidos en el genoma de las células: un plásmido con un sitio de unión FRT para la recombinasa Flp (figura 69.A) y otro que expresa un represor Tet (tetraciclina) de forma constitutiva (figura 69.B). La integración de ambos se produce al azar y es independiente una de otra. Este paso ya se encontraba ejecutado en las líneas celulares que nos cedió el Dr Gopal Sapkota de la Universidad de Dundee, por lo que en este trabajo se inició el proceso en el siguiente punto.
2. Integración del vector que contiene el gen de interés bajo un promotor inducible por doxiciclina (figura 69.C). Para ello las células se transfectan con dos vectores; uno que expresa de forma constitutiva la recombinasa Flp (pOG44) y otro que contiene el gen de interés (pcDNA5/FRT/TO), 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 70).

Para transfectar de forma estable la línea FLP-In T-Rex U2OS, las células se transfectan con una mezcla de transfección⁶ que contiene el cDNA de ORAI1 en el vector pcDNA5/FRT/TO y el cDNA de la 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 5 µg/ml de blasticidina para seleccionar las células transfectadas de forma estable. La expresión de ORAI1-GFP se determina mediante inmunoblot y la

⁶ **Mezcla de transfección:** 1-5 µg de cDNA + 20 µl de polietilenimina (PEI 0.1 M) + 1 ml de DMEM (sin suplementar), por placa de 10 cm de diámetro.

visualización de células en un microscopio de fluorescencia. Mediante esta técnica se generaron líneas celulares que expresan ORAI1-WT y ORAI1-T295A/S298.

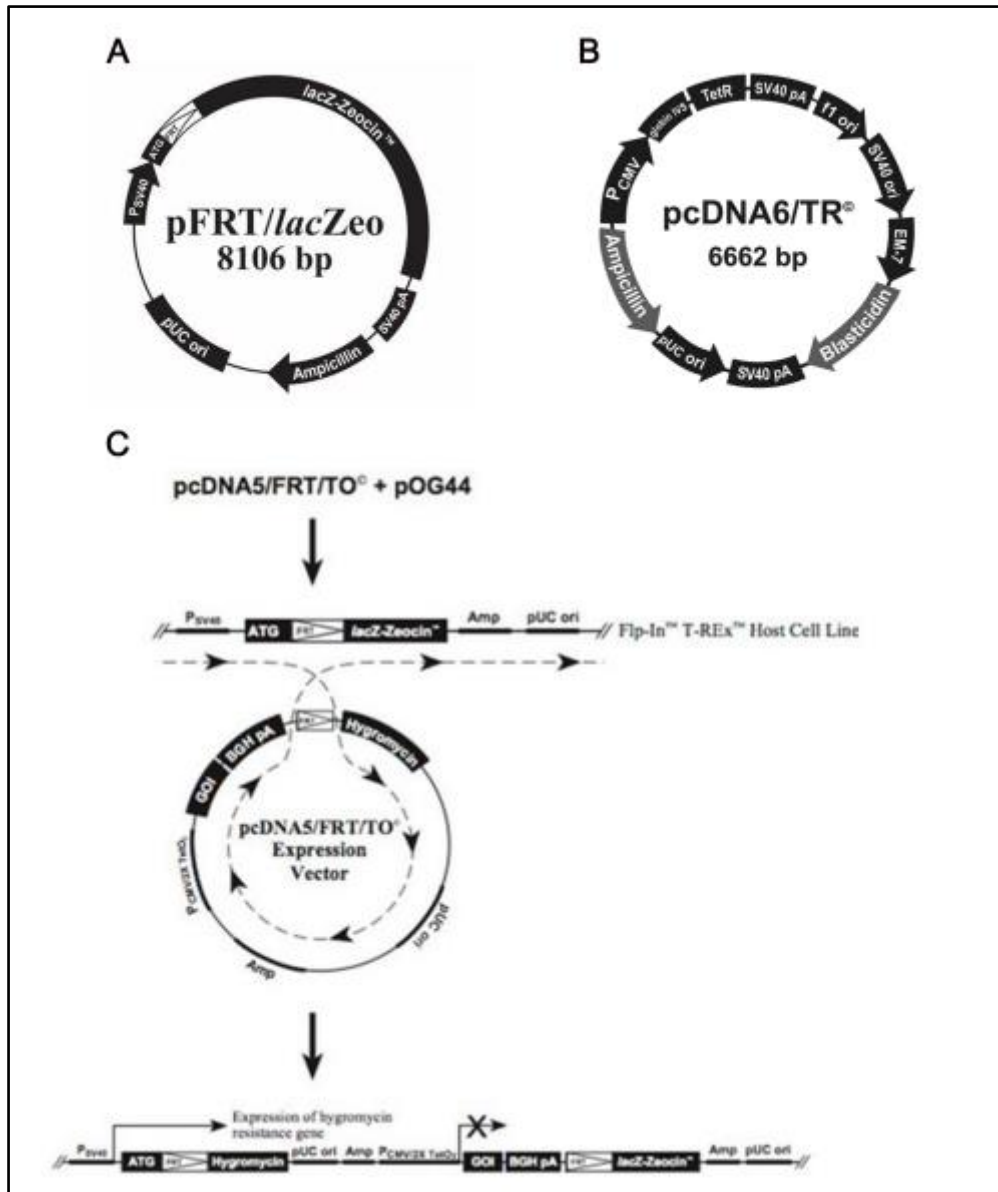


Figura 69. Obtención de las líneas FLP-In T-REx. *Panel A:* Plásmido pFRT/lacZeo que contiene un sitio FRT para unión de la recombinasa y un gen de resistencia a zeocina. *Panel B:* Plásmido pcDNA6/TR[®] que expresa el represor Tet de forma constitutiva y tiene un gen de resistencia a blasticidina. *Panel 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.

2.2.1. Inducción de la expresión de ORAI1-GFP en la línea celular U2OS

Una vez generadas las líneas celulares, éstas se cultivan en placas de 10 cm de diámetro en medio de selección suplementado con 100 µg/ml higromicina y 5 µg/ml

Materiales y Métodos

blastidina. La expresión de ORAI1-GFP en células FLP-In T-REx U2OS está bajo el control de un promotor sensible a doxiciclina (Dox), un antibiótico que pertenece al grupo de las tetraciclinas. De manera estándar, se ha empleado la incubación de las células con 1 µg/ml de doxiciclina durante 24-30 horas, para inducir unos niveles adecuados de expresión de la proteína ORAI1-GFP.

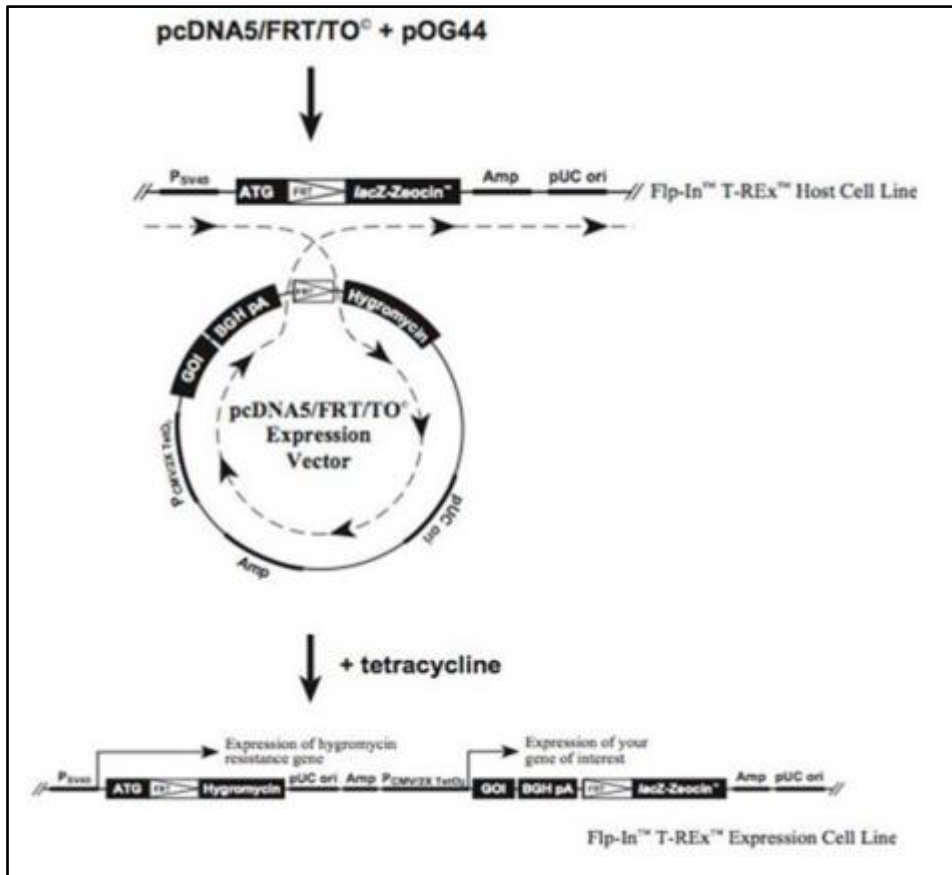


Figura 70. Expresión del gen de interés inducida por la adición de doxiciclina. La proteína represora Tet (TetR) es expresada por el plásmido pcDNA6/TR[©] en las células FLP-In T-REx. Homodímeros de TetR se unen a la secuencia Tet operador 2 (TetO₂) del vector pcDNA5/FRT/TO[©] reprimiendo la transcripción del gen de interés. Tras la 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 operadora e induciendo así la expresión del gen de interés.

2.3. Generación de líneas celulares con expresión estable de proteína ectópica mediante transducción retroviral

Los sistemas de transfección retrovirales utilizan las propiedades de replicación víricas para llevar a cabo la integración de una secuencia deseada de DNA en un genoma hospedador. Estos retrovirus modificados conservan la capacidad de infectar a las células hospedadoras; sin embargo, no poseen los genes esenciales para la producción

de nuevas partículas víricas (viriones), de manera que pueden transferir un cDNA de interés al genoma de células diana sin llevar a cabo la replicación viral en las mismas. Para facilitar este sistema, existen células empaquetadoras de partículas virales como las Phoenix-AMPHO HEK293 que contienen en su genoma los genes responsables de la encapsulación del virus como son *gag*, *pol* y *env*, de modo que sólo deben ser transfectadas con el vector que lleva el cDNA de interés. Estas células garantizan un alto porcentaje de transfección y producción de viriones, por lo que su uso está ampliamente extendido en laboratorios de biología molecular y celular. Un esquema representativo de este sistema se ilustra en la figura 71.

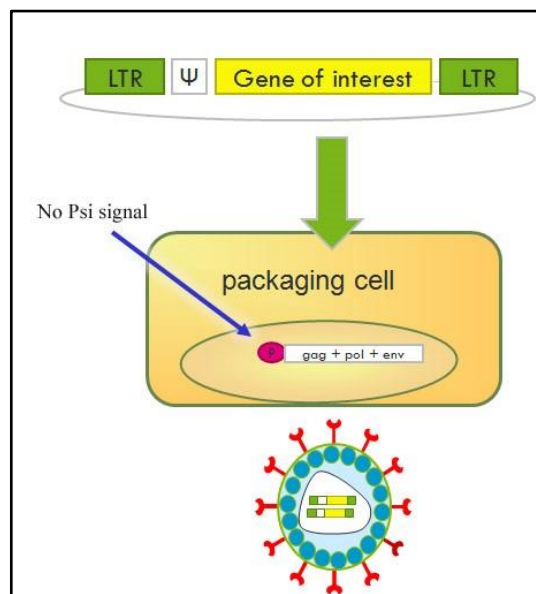


Figura 71. Generación de viriones con replicación defectiva en células empaquetadoras. Las células empaquetadoras (Phoenix-AMPHO HEK293 en nuestro estudio), las cuales han sido modificadas para expresar las proteínas estructurales de retrovirus, son transfectadas con un vector retroviral que contiene el inserto/gen de interés, y tras producirse la retrotranscripción viral se generan viriones que incorporan el mRNA del inserto de interés. El medio extracelular del cultivo, que contiene los viriones, se puede usar para transducir células diana *ex vivo* o *in vivo*. Fuente de la imagen (*Duke Viral Vector Core*, Universidad de Duke 2017).

En el desarrollo de este estudio se ha utilizado esta técnica para generar líneas U2OS ORAI1-KO que expresan de forma estable Flag-ORAI1, Flag-ORAI1-T295A/S298A, Flag-ORAI1-T295E/S298E, Flag-ORAI1-Y300F y Flag-ORAI1-Y300E. El vector empleado en todos los casos fue pBABED con resistencia a higromicina (de la Universidad de Dundee, mrcppureagents.dundee.ac.uk #37127).

El protocolo de transducción retroviral empleado en este trabajo es el descrito en (Karlseder et al., 2002; Li & de Lange, 2003), el cual se desarrolla en varios pasos:

1. Las células Phoenix HEK293 se siembran en placas de 10 cm de diámetro para que, transcurridas 24 horas, presenten una confluencia del 40-50%.

Materiales y Métodos

2. Transcurridas 24 horas en cultivo, las células se transfectan con 12 μg del cDNA de interés, empleando el agente de transfección PEI⁶. Este mismo día se siembran las células diana (U2OS ORAI1-KO en el caso de nuestro estudio) para tener una confluencia del 30-40% al día siguiente.
3. Transcurridas 24 horas desde la transfección, se recoge el medio de las células Phoenix (contiene partículas virales), se filtra (0.22 μm de tamaño de poro) para que no exista contaminación entre líneas celulares de distinto origen, y se añade medio fresco a las células Phoenix, las cuales se devuelven de nuevo al incubador para que sigan creciendo y generando viriones para el día siguiente.
4. A continuación, las células diana U2OS ORAI1-KO se incuban con el medio de partículas virales mezclado con polibreno, el cual es usado como agente de transducción (5 ml medio viriones + 1.06 μl polibreno (stock 18.75 mg/ml), para una placa de 10 cm de diámetro).
5. A las 6-8 horas posteriores a la incubación con los viriones (en la que el polibreno se encuentra a una concentración de 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) se añaden 5 ml de medio suplementado a la placa para que la concentración de polibreno no sea superior a 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, pues una incubación prolongada de las células con una concentración que supere dicho valor es tóxica para las células.
6. Al día siguiente, se repite el mismo procedimiento en una segunda ronda o ciclo de infección tras retirar el medio con viriones de las células Phoenix HEK293.
7. Transcurridas 48 horas desde la primera transducción en células dianas, se elimina el medio con viriones y se añade medio fresco para favorecer el crecimiento de las células.
8. Tras 24 horas de recuperación en medio de cultivo, las células se incuban en medio de selección (medio de cultivo con higromicina 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en base a la resistencia antibiótica que presenta el vector empleado).

Finalmente, las células se mantienen en medio de selección, reemplazando el medio cada 48 horas, hasta obtener colonias resistentes (8-12 días). La validación de la línea celular generada se realiza por inmunodetección de la proteína sobre-expresada a partir de lisados celulares y observando el cultivo en el microscopio de fluorescencia invertido en el caso de que la proteína presente el tag fluorescente GFP. Una vez que se confirma que las células expresan correctamente la proteína de interés, los cultivos se expanden y se almacenan en crioviales en N_2 líquido hasta su utilización.

3. Clonaje molecular y transfección

3.1. Cuantificación del DNA

La cuantificación de DNA se calcula por espectrofotometría, 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 resultar un valor comprendido entre 1.8-1.85 para una disolución de DNA puro.

3.2. Transformación bacteriana

El método de transformación bacteriana seguido es el descrito por Hanahan (Hanahan, 1983) y se basa en permeabilizar a las bacterias con un choque térmico. Se transforman 45 µl de bacterias competentes *Escherichia coli* DH5αF' con 5 µl de mezcla de ligación (plásmido con la resistencia al antibiótico y el inserto de cDNA correspondiente en cada caso). A continuación, se incuban en hielo durante 30 minutos y después se da un choque térmico a 42°C durante 90 segundos, seguido de una breve incubación en hielo durante 5 minutos. A continuación, se añade a las bacterias 1 ml de medio LB (Luria-Bertani) y se incuban durante 1.5-2 horas en agitación suave a 37°C. Para finalizar se siembran 50-70 µl de esta suspensión de bacterias en una placa de LB-agar suplementada con el antibiótico de selección, la cual se incuban a 37°C durante 16-18 horas. En el anexo I se muestran las construcciones utilizadas en el desarrollo de este trabajo.

3.3. Obtención de DNA plasmídico

A partir de las bacterias crecidas en la placa de LB-agar, se realiza un crecimiento de las colonias seleccionadas en 2 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml) o kanamicina (50 µg/ml) y se incuban a 37°C en agitación (250 rpm) durante 10-12 horas. Tras el crecimiento del cultivo se procede a su centrifugación a 4°C y 10.000 x g durante 5 minutos. Finalmente se realiza la purificación del plásmido siguiendo el protocolo de purificación del kit *ZymoPure*. Una vez extraído y purificado el DNA se procede a su secuenciación, que en nuestro caso se realizó en el Servicio de Técnicas Aplicadas a las Biociencias (STAB), de los Servicios de Apoyo a la Investigación de la UEx (SAIUEx).

3.4. Construcciones de DNA y transfección transitoria

Para la transfección transitoria de ORAI1-GFP, GFP-empty, mCherry-CTTN, EGFP-RAC1-WT, EGFP-RAC1-Q61L, mCherry-RAC1-G12V, Flag-ORAI1-WT, Flag-ORAI1-T295A/S298A, Flag-ORAI1-E106A, Flag-ORAI1-V102C y Flag-empty, las células se transfectan con plásmidos que incluyen los cDNA que codifican para las proteínas de

Materiales y Métodos

interés. En el Anexo I se detallan las diferentes construcciones empleadas en el desarrollo de este trabajo.

El DNA utilizado para la transfección se purifica a partir de bacterias *Escherichia coli* DH5 α F' utilizando el kit de ZymoPure para la extracción de plásmidos siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial. La construcción de DNA para la transfección transitoria de mCherry-CTTN (plásmido #27676, Addgene) fue proporcionada por el Dr. Christien Merrifield (*Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales*, CNRS, Gif sur Yvette, Francia). Los plásmidos pcDNA3-EGFP-RAC1-WT (Addgene #13719) y pcDNA3-EGFP-RAC1-Q61L (Addgene #13720) fueron proporcionados por el Dr. Klaus Hahn (Universidad de Carolina del Norte, EE.UU.) y el plásmido pmCherry-RAC1-G12V por el Dr. Francesc Tebar (Universidad de Barcelona, España).

La transfección transitoria de las líneas celulares U2OS con las diferentes construcciones de DNA se realiza 8-12 horas tras la siembra, utilizando 1-2 μ g de DNA y el agente de transfección PEI⁶ (20 μ l de una solución stock 1 mg/ml por placa de 10 cm de diámetro). La transfección se lleva a cabo 24-30 horas antes del inicio del experimento para asegurar un adecuado nivel de expresión de la proteína de interés. En caso de que el plásmido requiera doxiciclina para inducir la expresión de la proteína, a la mezcla de transfección se le añade doxiciclina de manera que la concentración final sea 1 μ g/ml.

4. Tratamiento de las líneas celulares

4.1. Tratamiento de las líneas U2OS y HEK293

Las células se siembran y se mantienen en cultivo al menos 24 horas para que se adhieran a la placa y crezcan formando una monocapa celular con el fin de que alcancen una confluencia óptima en función del experimento a realizar. En caso de que las células requieran antibiótico de selección para expresar de manera estable la proteína de estudio, las células se cultivan en presencia de los antibióticos para los que el vector de clonación incluya gen de resistencia (higromicina en el caso de la expresión estable por transducción retroviral, o higromicina y blasticidina en el sistema FLP-In T-REx). Para ensayos de inmunolocalización, motilidad celular o medidas de Ca²⁺ citosólico la confluencia necesaria es de un 50-60%, mientras que en caso de ensayos de pull-down o co-inmunoprecipitación la confluencia celular puede alcanzar el 70-80%.

Para la estimulación de las células con el factor de crecimiento epidérmico (EGF⁷), las células son deprivadas de suero reemplazando el medio de cultivo DMEM por medio

⁷ EGF (SRP3027 Sigma-Aldrich): Factor de crecimiento epidérmico (EGF de sus siglas en inglés: *Epidermal Growth Factor*).

RPMI⁸ libre de suero y rojo fenol durante 8-10 horas, siendo éste el tiempo óptimo para que se reduzca la actividad de las enzimas/rutas implicadas en este estudio. Transcurrido este tiempo se lleva a cabo la estimulación con EGF 50 ng/ml durante diferentes tiempos: 1, 3, 5 y 8 minutos.

Para el tratamiento de inhibición de RAC1, las células se preincuban con el inhibidor NSC 23766⁹ 50 µM en el momento de deprivación, manteniéndose 8-10 horas, tiempo tras el cual se procede a la estimulación con EGF en las condiciones anteriormente citadas.

Para ensayos de inmunolocalización y medidas de Ca²⁺ citosólico las células se siembran en cubres pretratados con colágeno¹⁰ al 0.01% durante un mínimo de 2 horas a 37°C, lavándose el exceso de colágeno posteriormente con PBS estéril antes de proceder a la siembra celular. La deprivación de las líneas celulares se mantiene el tiempo requerido según el tipo de ensayo que se vaya a realizar (entre 8 y 16 horas).

5. Preparación de lisados celulares e inmunoblot

5.1. Preparación de lisados celulares

Los lisados celulares se obtienen a partir de los diferentes cultivos celulares sembrados en placas de 10 cm de diámetro. Se retira el medio de cultivo en el que han crecido las células y éstas se lavan con PBS frío y se lisan añadiendo 1 ml de tampón de lisis¹¹ para la obtención de extractos proteicos celulares. Dado que ORAI1 es una proteína transmembranal, los lisados celulares son sonicados posteriormente con el procesador ultrasónico *UP200S Hielscher* (4 ciclos de 10 segundos a 40% de amplitud) para disgregar las membranas celulares y facilitar la solubilización de las proteínas. A continuación, las muestras ya sonicadas se clarifican centrifugando a 20.000 x *g* durante 20 minutos y se elimina el precipitado guardando el sobrenadante a -80°C. Todo el proceso de obtención de extractos celulares se realiza en frío (4°C).

⁸ **RPMI libre de suero y rojo fenol (Gibco):** RPMI 1640 suplementado con L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml.

⁹ **NSC 23766 (2161 Tocris):** N6 -[2-[[4-(Diethylamino)-1-methylbutyl]amino]-6-methyl-4-pyrimidinyl]-2-methyl-4,6-quinolinediamine trihydrochloride.

¹⁰ **Solución de colágeno Tipo-I (C3867 Sigma-Aldrich):** Solución de colágeno Tipo-I al 0.01% (0.1 mg/ml).

¹¹ **Tampón de lisis para extractos proteicos totales:** Tris-HCl 50 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, fluoruro sódico 50 mM, pirofosfato sódico 5 mM, ortovanadato sódico 1 mM, 1% Nonidet-P40, sacarosa 270 mM, DTT 1 mM, benzamidina 1 mM y PMSF 1 mM.

Materiales y Métodos

5.2. Medida de la concentración de proteína

La concentración de proteína de los extractos celulares se determina mediante el método colorimétrico de Bradford, utilizando como estándar cantidades conocidas de la albúmina de suero bovino (BSA). La concentración de proteína se determina midiendo la absorbancia de las muestras a 594 nm e interpolando los valores obtenidos con la recta patrón generada con la proteína BSA (cantidades utilizadas entre 1-5 µg). Si las células son lisadas en tampón de lisis que contenga detergente SDS, la concentración de proteína se determina empleando el reactivo de ensayo de proteínas 660 nm Pierce™ (*ThermoFisher Scientific #22660*) al presentar un mayor rango de compatibilidad a detergentes iónicos y midiendo la absorbancia de las muestras a 660 nm, como describe el fabricante.

5.3. Ensayos de pull-down y co-inmunoprecipitación

Para inmunoprecipitar proteínas de fusión unidas a GFP, los extractos celulares se incuban con una resina de agarosa con afinidad por la proteína GFP (GFP-Trap beads, *ChromoTek*) durante 1 hora a 4°C con rotación suave. Una vez unida la proteína de estudio a las GFP-beads se precipita este complejo, se descarta el sobrenadante y el precipitado se lava con tampón de lisis suplementado con NaCl 0.5 M durante 10 minutos en rotación. Si se pretende analizar las proteínas coprecipitadas con la proteína de estudio, el tampón de lisis se suplementa con NaCl 150 mM, eliminando así sólo las proteínas unidas por enlaces débiles al complejo proteico. A continuación, el precipitado se lava con tampón A¹² durante 5 minutos (los lavados siempre se llevan a cabo a 4°C con rotación) para eliminar los restos de sales y posteriormente las proteínas precipitadas se eluyen de la resina de agarosa (GFP-Trap agarosa) con 15 µl de tampón de elución¹³ y vórtex. Una vez eluidas las proteínas, las muestras son hervidas a 95°C durante 3 minutos. Para descartar la resina de agarosa, las muestras se pasan por columnas de filtración (Spin-X). Las proteínas purificadas se someten a electroforesis en gel de acrilamida y transferencia a membrana de nitrocelulosa tal y como se describe a continuación.

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

Para la realización de electroforesis de proteínas en geles desnaturizantes de poli(acrilamida) se emplea el sistema de tampón discontinuo descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). La cantidad determinada (5-40 µg) de los extractos celulares se mezcla con el volumen adecuado de tampón de carga¹⁴. Las proteínas se someten a

¹² **Tampón A:** Tris-HCl 50 mM, EGTA 0.1 mM, pH 7.5.

¹³ **Tampón de elución:** LDS (2X) (Nu-Page) β-mercaptoetanol 300 mM.

¹⁴ **Tampón de carga:** LDS (4X) (Nu-Page) DTT 40 mM y azul de bromofenol.

electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes por la presencia del detergente iónico SDS (SDS-PAGE¹⁵) y se separan en función de su peso molecular. En función del tamaño de la proteína de estudio se emplean geles de poliacrilamida de diferentes concentraciones, entre el 6.5% y el 12% de acrilamida. Una vez realizada la electroforesis, las proteínas presentes en el gel se transfieren a membranas de nitrocelulosa por aplicación de un campo eléctrico en un tanque que contiene tampón de transferencia¹⁶. La transferencia se realiza a 4°C durante 2-3 horas a 10 V.

5.5. Inmunodetección

Una vez terminada la transferencia, las membranas se tiñen con el colorante Ponceau S¹⁷ que permite comprobar la eficiencia en la transferencia de proteínas a la membrana de nitrocelulosa, así como la homogeneidad en la cantidad de proteína cargada en cada muestra. Para ensayos de inmunoblot, las membranas se mantienen durante 1 hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo¹⁸ y seguidamente se incuban con el anticuerpo primario correspondiente empleando las condiciones y diluciones indicadas en la Tabla II. Tras seis lavados de 10 minutos en solución TBS-T¹⁹, las membranas se incuban en solución de bloqueo con el anticuerpo conjugado con la enzima HRP (*horseradish peroxidase*) a una dilución de 1:10000 durante 60 minutos a temperatura ambiente en rotación. A continuación, se procede a lavar las membranas un total de 6 veces (cada lavado de 10 minutos) en TBS-T más un lavado final en TBS²⁰ de 5 minutos. Finalmente, se añade el sustrato quimioluminiscente Clarity o Clarity MaxTM Western ECL (*Bio-Rad*) durante 1-3 minutos a temperatura ambiente. Las bandas inmunoreactivas se revelan en un Chemidoc XRS + imager (*Bio-Rad*). La cuantificación de las bandas resultantes del revelado de las membranas se lleva a cabo con el software Image Lab (*Bio-Rad*).

Algunas membranas de nitrocelulosa son reutilizadas para la incubación con más de un anticuerpo, como es el caso de la detección de proteínas coprecipitadas con la proteína de estudio. En este caso, la membrana se bloquea y se expone en primer lugar al anticuerpo que detectan las proteínas que interaccionan con la proteína que se ha inmunoprecipitado y posteriormente al correspondiente anticuerpo secundario. A continuación, se añade el sustrato quimioluminiscente y se procede al revelado. Finalmente, se puede utilizar esta misma membrana para la detección de otras proteínas de interés.

¹⁵ **Tampón de electroforesis:** Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0.1% (p/v).

¹⁶ **Tampón de transferencia:** Tris 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20% (v/v).

¹⁷ **Ponceau S:** Ponceau S 0.5% (p/v), ácido acético 5% (v/v).

¹⁸ **Solución de bloqueo:** Leche desnatada en polvo 10% (p/v) disuelta en TBS-T.

¹⁹ **TBS-T:** Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 75 mM, Tween-20 0.2% (v/v).

²⁰ **TBS:** Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 75 mM.

Materiales y Métodos

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	DILUCIÓN	TIEMPO DE INCUBACIÓN
Mouse anti-CTTN (clon 4F11)	<i>Millipore</i>	1 µg/ml	4°C 12-16 h
Rabbit anti-CYFIP1 (AB6046)	<i>Millipore</i>	1 µg/ml	4°C 12-16 h
Sheep anti-GFP	<i>(Universidad de Dundee)</i>	1 µg/ml	4°C 12-16 h
Mouse anti-GAPDH (6C5): sc-32233	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>	1:3000	4°C 12-16 h
Mouse anti-Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa (H-3): sc-48345	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>	1:2000	4°C 12-16 h
Rabbit anti-phospho-ERK1/2 (#9106S)	<i>Cell Signaling Technology</i>	1:1000	4°C 12-16 h
Rabbit anti-total-ERK1/2 (#9102S)	<i>Cell Signaling Technology</i>	1:1000	4°C 12-16 h
Rabbit anti-phospho-PAK1/2 (#2601T)	<i>Cell Signaling Technology</i>	1:1000	4°C 12-16 h
Rabbit anti-total-PAK1 (#2602T)	<i>Cell Signaling Technology</i>	1:1000	4°C 12-16 h
Mouse anti-RAC1 (Monoclonal IgG2b, incluido en el kit <i>Active Rac1 Pull-Down and Detection #16118</i>)	<i>ThermoFisher Scientific</i>	1:1000	4°C 12-16 h
Mouse anti-ARP2/3 (clon 13C9)	<i>Millipore</i>	1:500	4°C 12-16 h
Rabbit anti-p38 MAPK #9212	<i>Cell Signaling Technology</i>	1:500	4°C 12-16 h
Sheep anti-phospho-T295-ORAI1	<i>(Universidad de Dundee)</i>	1 µg/ml + 10 µg/ml blocking peptide	4°C 12-16 h*
Sheep anti-phospho-S298-ORAI1	<i>(Universidad de Dundee)</i>	1 µg/ml + 10 µg/ml blocking peptide	4°C 12-16 h*
Mouse anti-Flag (F3165)	<i>Sigma-Aldrich</i>	1:1000	4°C 12-16 h + RT 1h
Mouse anti-actin (clon 7A8.2.1)	<i>Cytoskeleton</i>	1 µg/ml	RT 1h
Mouse anti-gelsolin (H-5): sc-398244	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>	1 µg/ml	4°C 12-16 h

Tabla II: Relación de anticuerpos utilizados en inmunoblots. RT: Temperatura ambiente.

* Los anticuerpos anti-fosfo-ORAI1 se preincuban con su péptido específico no fosforilado durante 60 minutos de forma previa a su uso.

6. Ensayo de biotilación de proteínas de superficie celular

Para cuantificar la cantidad de ORAI1 que está externalizado en la membrana plasmática se emplea un kit comercial que permite el aislamiento de proteínas de superficie celular (Pierce, *ThermoFisher Scientific* #89881) mediante biotilación selectiva y su posterior purificación. Para ello, las células se siembran en placas de 10 cm de diámetro y se mantienen en cultivo durante 48 horas. A continuación, se lavan con PBS estéril y se incuban durante 30 minutos a 4°C con un reactivo de biotilación (*Sulfo-NHS-SS-Biotin*), el cual permite marcar las aminas primarias de las proteínas expuestas en la superficie celular. La reacción de marcaje se para mediante la adición de una solución *quenching*, tras lo cual se recogen las células marcadas, se lavan con PBS y se centrifugan a 500 x *g* descartando el sobrenadante. A continuación, se procede a lisar el precipitado celular con un tampón de lisis a 4°C durante 30 minutos mediante pipeteo suave de las células y agitando cada 5 minutos durante el tiempo de lisis. Una vez transcurridos los 30 minutos, el lisado celular se centrifuga a 10.000 x *g* a 4°C durante 2 minutos. El sobrenadante clarificado se transfiere a un nuevo tubo, tomándose una alícuota para determinar la concentración de proteína total y así poder analizar mediante inmunoblot la cantidad total de la proteína de estudio, ORAI1-GFP. Para purificar las proteínas de superficie celular biotiladas se incuban 0.5 ml de lisado celular (0.3 mg de proteína) con la resina de agarosa NeutrAvidin y posteriormente son eluidas mediante tampón de elución con poder reductor (DTT), tras lo cual se procede al análisis mediante inmunoblot de la proteína de estudio biotilada (ORAI1-GFP biotilada), empleando para su detección el anticuerpo anti-GFP.

7. Ensayos de actividad de RAC1

Para detectar RAC1 activo (unido a GTP) se emplea el kit de pull-down y detección de RAC1 activo (Pierce, *ThermoFisher Scientific* #16118). Este kit permite el enriquecimiento selectivo y la detección de RAC1 unido a GTP a través de una interacción específica de proteínas con el dominio de unión de proteínas (PBD) de PAK1. Las células se siembran y crecen durante 48 horas en placas de 10 cm de diámetro, pasando posteriormente a ser privadas de suero en medio RPMI libre de rojo fenol durante 12 horas. En caso de que las células se tengan que incubar con NSC 23766 50 μM , este inhibidor se añade en el medio de privación. A las 12 horas siguientes las células son estimuladas con EGF 50 ng/ml a diferentes tiempos (30 segundos y 1, 3, 5 minutos), tras lo cual son lisadas empleando el tampón de lisis del kit comercial suplementado con inhibidores de proteasas. Tras la obtención de los lisados celulares, se toma una alícuota para medir la cantidad de proteína total mediante el método de determinación de proteínas de Pierce. Una vez medida la concentración de proteína, se incuban 0.6 mg de proteína total con 20 μg de la proteína de fusión GST-PAK1-PBD en una columna que contiene resina de glutatión-agarosa (GSH) durante 1 hora a 4°C en

Materiales y Métodos

agitación suave. A continuación, la resina se lava con el tampón de lavado y las proteínas son eluidas con tampón de carga, tras lo cual se procede a su separación mediante electroforesis en geles SDS-PAGE. Posteriormente se realiza su transferencia a membrana de nitrocelulosa, empleándose el anticuerpo correspondiente en la detección de la proteína RAC1.

8. Inmunolocalización

Las células son sembradas en cubreobjetos pretratados con colágeno al 0.01% y fijadas en paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS, durante 10 minutos y a temperatura ambiente. A continuación, se permeabilizan con Tritón X-100 0.2% durante 10 minutos y se incuban en solución de bloqueo²¹ durante 30-60 minutos. A continuación, las células se incuban con el anticuerpo primario utilizando la dilución y el tiempo de incubación establecidos para cada anticuerpo (Tabla III). Posteriormente se procede a lavar las células con PBS-Tween 0.2% y se incuban con el anticuerpo secundario correspondiente, marcado con Alexa Fluor 488 o Alexa Fluor 594, diluido 1:500-1:2000 respectivamente en solución de bloqueo²¹, durante 20 minutos y a temperatura ambiente. Por último, las células se lavan con PBS-Tween al 0.2% más un lavado final de PBS.

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	DILUCIÓN	TIEMPO DE INCUBACIÓN
Sheep Anti-GM130 (AF8199)	<i>R&D Systems</i>	1:100	4°C 12-16 h
Rabbit anti-TGN46 (ABT95)	<i>Millipore</i>	1:500	4°C 12-16 h
Mouse Anti-EEA1 (610456)	<i>BD Biosciences</i>	1:100	4°C 12-16 h
Mouse anti-LAMP (611042)	<i>BD Biosciences</i>	1:50	4°C 12-16 h
Rabbit anti-Sec13a (#PA5-21339)	<i>ThermoFisher</i>	1:50	4°C 12-16 h
Sheep anti-phospho-T295-Orai1	<i>(Universidad de Dundee)</i>	5 µg/ml + 50 µg/ml blocking peptide	4°C 12-16 h*
Sheep anti-phospho-S298-Orai1	<i>(Universidad de Dundee)</i>	5 µg/ml + 50 µg/ml blocking peptide	4°C 12-16 h*

Tabla III: Relación de anticuerpos utilizados para inmunolocalización.

* Los anticuerpos fosfo-Orai1 se preincuban con su péptido específico no fosforilado durante 60 minutos de forma previa a su uso.

²¹ **Solución de bloqueo:** 3% gelatina de piel de pescado (*Cold water fish skin gelatin, Sigma-Aldrich*) disuelta en PBS-Tween 0.2% pH 7.4 (suplementada con NaF 0.5 mM en el caso de la determinación de epítomos fosforilados).

Para garantizar la fosfoespecificidad de los anticuerpos que reconocen los residuos fosforilados Thr295 y Ser298 de ORAI1, un control del experimento consiste en tratar las células fijadas con fosfatasa λ (10 U/ μ l) de la casa comercial *Santa Cruz Biotechnology* (lambda phosphatase sc-200312) durante 8-10 h a 30°C y posteriormente realizar el ensayo de inmunolocalización.

8.1. Análisis por epifluorescencia en célula fijada

Una vez llevado a cabo el protocolo de inmunolocalización se fijan las células, se lavan con agua destilada para eliminar las sales y a continuación se montan en portaobjetos utilizando el medio Hydromount® (*National Diagnostics*). Para la observación de la localización de las proteínas se emplea un microscopio invertido Nikon Ti-E equipado con filtros de excitación, espejo dicróico y filtros de emisión específicos de cada fluoróforo (GFP o mCherry). Las imágenes se capturan con una cámara CCD Hamamatsu C9100-02 acoplada al microscopio de fluorescencia invertido y con un objetivo Aplanachromat 100 \times de inmersión en aceite. La evaluación del coeficiente de correlación de Pearson se lleva a cabo diseñando regiones de interés, ROIs²², de 1.1-1.18 μ m² sobre la periferia celular. Se evalúan 70-90 ROIs por célula con el fin de evaluar el perímetro de la célula que permanece libre de contactos célula-célula. El análisis de imágenes se lleva a cabo con el software *NIS-Elements Advanced Research*.

8.2. Análisis por epifluorescencia en célula viva

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

9. Ensayo de secreción de la luciferasa *Gaussia*

Para monitorizar la vía secretora en células de mamífero vivas se lleva a cabo un ensayo de monitorización de la secreción de la luciferasa *Gaussia* (Gluc) siguiendo el

²² ROIs: Regiones de interés (ROI: *Regions of Interest*).

Materiales y Métodos

método descrito por Badr y cols (Badr et al., 2007). Para ello, las células son transducidas para la expresión estable de una proteína de fusión que incluye Gluc en el N-terminal y la proteína de fluorescencia amarilla (YFP) en el C-terminal (figura 72). La proteína Gluc-YFP permite visualizar la vía secretora intracelularmente y monitorizar la liberación de la actividad luciferasa en tiempo real estableciendo una linealidad en base al número de células.



Figura 72. Representación esquemática del cassette para la expresión de Gluc-YFP clonado en el vector de lentivirus. Las células huésped son infectadas por el vector de lentivirus que contiene el cassette para la expresión de la proteína de fusión Gluc-YFP, a través de la cual se monitoriza la vía secretora en tiempo real. Fuente de la imagen (Badr et al., 2007).

El ensayo de actividad de la luciferasa *Gaussia* permite estudiar una hipotética interrupción en la vía secretora como consecuencia del tratamiento con fármacos o por la presencia de mutaciones en la célula. Para llevar a cabo este ensayo, las células son transducidas con la construcción CSCW-Gluc-YFP (ver anexo I). Las células que expresan la luciferasa *Gaussia* (Gluc) se siembran a una densidad de 50.000 células por pocillo en placas de 96 multipocillos. A las 6 horas de la siembra se induce la expresión de la línea Flag-RAC1-T17N mediante la adición de 1 $\mu\text{g/ml}$ de doxiciclina, tratamiento que se mantiene durante 22 horas hasta el momento de medir la actividad luciferasa. En paralelo se trabaja con la línea celular U2OS que expresa de manera endógena la proteína RAC1 *wild-type*. Estas células se incuban con NSC 23766 50 μM durante 8 horas antes de iniciar la medida de la actividad luciferasa. La luminiscencia se mide en un luminómetro Varioskan Flash (*ThermoFisher Scientific*) empleando el kit comercial *Gaussia* Luciferase Glow Assay (*ThermoFisher Scientific* #16161) para evaluar la actividad luciferasa en el medio de cultivo (Gluc secretada) y la actividad luciferasa intracelular. Como control negativo del ensayo de secreción de la luciferasa se emplean células incubadas con 5 $\mu\text{g/ml}$ de brefeldina A²³, un inhibidor del tráfico de proteínas intracelulares desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi (Fujiwara et al., 1988; Misumi et al., 1986), durante 2-4 horas.

10. Ensayos de migración y motilidad celular

Con el fin de evaluar la motilidad celular en base a diferentes parámetros (velocidad, protrusión de lamelipodios, persistencia y direccionalidad en la migración)

²³ **Brefeldina A (sc-200861 Santa Cruz Biotechnology):** Metabolito fúngico aislado de *Penicillium brefeldianum*.

se siembran células en placas ibidi de 35 mm de diámetro pretratadas con colágeno al 0.01% durante 3-4 horas a 37°C. Previamente a la siembra, se procede a disgregar la monocapa de células de una placa con una confluencia celular baja que no supere el 50%, empleándose para ello TrypLE™ Express²⁴ como agente de disociación durante 2 minutos, tiempo tras el cual se inactiva la disgregación mediante la adición de medio de cultivo DMEM. Las células recogidas se centrifugan a 270 x g durante 5 minutos, aspirándose el sobrenadante y resuspendiendo el precipitado celular en medio Leibovitz's L-15 suplementado con 10% de suero. A continuación, se lleva a cabo un conteo celular empleando una cámara de Neubauer y se procede a sembrar un total de 45.000-50.000 células por placa en medio L15. En el momento inmediatamente anterior a la siembra celular, las placas pretratadas con colágeno son lavadas con PBS estéril. Una vez sembradas, las células se mantienen a 37°C en un incubador UNO-Okolab durante 2-4 horas tras las cuales se monitoriza la migración celular con un microscopio Nikon Ti-E tomando imágenes secuencialmente durante 4-6 horas.

10.1. Análisis de imágenes

Las grabaciones se llevaron a cabo con el software NIS-AR usando un objetivo Nikon Ph1 Plan Achromat 10x. La monitorización manual de la trayectoria migrada por las células se realizó con la herramienta Tracking Tool™ Pro (Gradientech, Uppsala, Suecia). A partir de las imágenes y vídeos se analizaron diferentes parámetros de la migración celular como se indica a continuación:

- **Velocidad de migración:** Se calcula a través de la distancia que migra la célula en un intervalo de tiempo determinado ($\mu\text{m}/\text{min}$) entre dos fotogramas secuenciales.
- **Distancia acumulada de migración:** Hace referencia a la distancia total que ha recorrido la célula desde el punto inicial donde empezó a migrar hasta el punto final de la trayectoria migrada (figura 73).

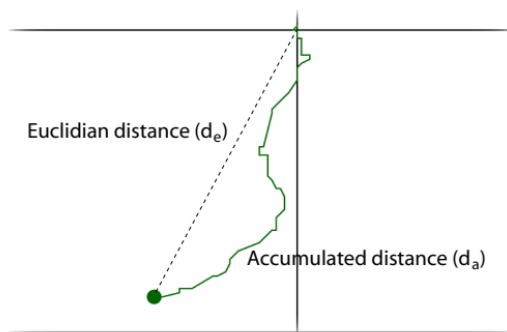


Figura 73. Distancia acumulada y distancia euclidiana. La distancia acumulada (d_a , *Accumulated distance*) es la distancia total que recorre la célula desde el punto inicial hasta el punto final de la trayectoria migrada. Por su parte, la distancia euclidiana (d_e , *Euclidian distance*) es la distancia rectilínea desde el punto inicial hasta el punto final de la trayectoria migrada.

²⁴ Tryple™ Express (Gibco): Enzima recombinante libre de origen animal sin rojo fenol.

Materiales y Métodos

- **Direccionalidad:** En términos matemáticos se puede decir que la direccionalidad mide la rectilinealidad de las trayectorias celulares durante la migración. Se calcula comparando la distancia euclidiana (d_e) y la distancia acumulada (d_a) entre el punto de partida y el punto final de la trayectoria recorrida por la célula durante la migración. Los valores de la direccionalidad son siempre positivos y se encuentran entre 0 y 1, siendo una direccionalidad de $D = 1$ igual a una migración en línea recta desde el punto inicial hasta el punto final de la trayectoria.
- **Tamaño de lamelipodios:** Para evaluar su tamaño se mide la longitud del borde de frente de migración, es decir, la longitud de la lámina que se extiende a lo largo de la parte frontal de las células en migración.
- **Circularidad celular:** La circularidad es evaluada midiendo el perímetro y el área total de células individuales, definiéndose la circularidad como:

$$\text{Circularidad} = (4 \times \pi \times \text{área}) / \text{perímetro}$$

Un aumento en la circularidad indica una menor polarización de la célula.

Por otra parte, parámetros como la **distancia de protrusión** y la **persistencia lamelipodial** se analizaron mediante quimografía (Hinz et al., 1999), una técnica que permite evaluar la persistencia direccional y la distancia de protrusión a partir del montaje de imágenes obtenidas durante la monitorización del ensayo de motilidad. Un quimógrafo es un montaje que se genera extrayendo valores de intensidad a lo largo de una región de líneas definida en cada imagen de una serie *time-lapse*, las cuales se combinan para generar una imagen compuesta del movimiento del objeto analizado a lo largo del tiempo (Bear et al., 2002). De este modo, un quimógrafo revela la dinámica de la actividad de la membrana en un único punto a lo largo del perímetro celular, lo que permite cuantificar la frecuencia de extensión de la membrana en una dirección (distancia de protrusión, μm) y determinar el tiempo medio que la membrana permanece en dicha protrusión individual (persistencia direccional, segundos). La intensidad de la partícula en movimiento se traza en un gráfico de tiempo frente a espacio, donde el eje X representa el tiempo y el eje Y la distancia (Hinz et al., 1999). En nuestro análisis utilizamos una línea de 3 píxeles de anchura trazada en la dirección de la extensión celular, y un tiempo de análisis de 200 segundos, lo que nos permitió evaluar la persistencia y distancia de la protrusión a partir del quimógrafo resultante.

11. Medida de la concentración de calcio libre intracelular

La medida de la concentración de Ca^{2+} libre intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) se determina mediante el método descrito en (Pozo-Guisado et al., 2010) empleando Fura-2 como fluoróforo sensible a Ca^{2+} . Fura-2 presenta un espectro de excitación con dos máximos situados a 340 y 380 nm (figura 74).

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. El espectro de emisión de este indicador presenta un único máximo situado a 510 nm. La constante de disociación (K_d) para Ca²⁺ es de 225 nM, lo cual convierte a esta sonda en adecuada para determinar los valores de Ca²⁺ que oscilan de 20-30 nM hasta 1-2 μM (Thomas and Delaville, 1991).

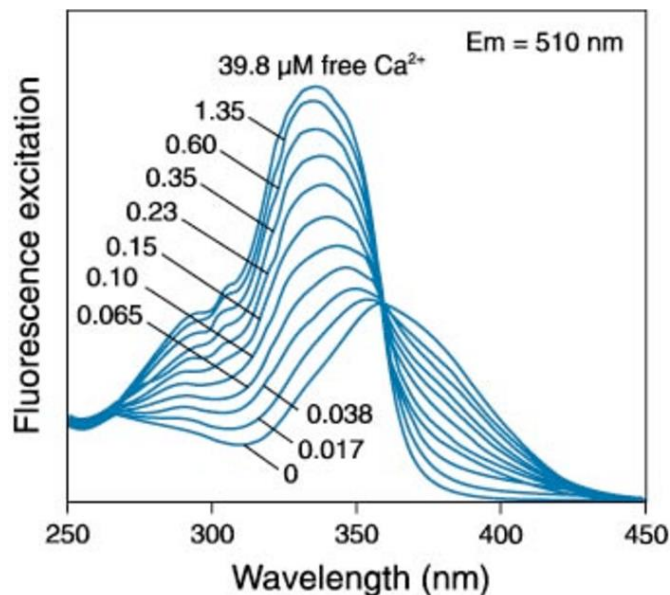


Figura 74. Espectro de excitación de Fura-2 AM. La gráfica representa el espectro de excitación de la sonda fluorescente Fura-2 AM en solución con concentraciones de Ca²⁺ saturantes (38.9 μM), y concentraciones que se encuentran incluidas en el rango de intervalo de detección de Fura-2 (0,017-1.70 μM) para una longitud de onda de emisión de 510 nm.

El Fura-2 es un anión policarboxilato, por lo que no difunde fácilmente a través de la bicapa lipídica, lo que conlleva que este indicador deba ser cargado en la célula mediante la dispersión de su forma acetoximetiléster (AM). Los grupos carboxílicos del indicador son esenciales para que éste sea sensible a Ca²⁺, por lo que los grupos esterificados a los mismos han de ser eliminados una vez que el indicador ha penetrado en la célula. Esta acción es llevada a cabo por la actividad esterasa intracelular, capaz de liberar la forma policarboxilato sensible a Ca²⁺. Una problemática aparejada a los acetoximetilésteres de los indicadores es su baja solubilidad en soluciones acuosas, de manera que la carga del Fura-2 AM requiere realizarse conjuntamente con pluronic F-127, un surfactante no iónico que facilita la dispersión de los mismos, para que sea efectiva.

11.1. Carga con Fura-2 AM en células U2OS

Para realizar la medida de la [Ca²⁺]_i se procede en primer lugar a la carga de las células con Fura-2 AM. Para ello las células se incuban con Fura-2 AM 1 μM y pluronic F-

Materiales y Métodos

127 0.025% en medio de cultivo, durante 1 hora y a 37°C. Trascorrido este tiempo las células se lavan con medio HBSS²⁵ y se lleva a cabo el registro de los valores de fluorescencia.

11.2. Medida de los valores de fluorescencia

Para determinar la fluorescencia de la sonda en el interior de las células se utiliza un microscopio invertido Nikon Ti-E. El registro de emisión de fluorescencia consta de tres registros simultáneos: (1) el registro de la emisión de fluorescencia utilizando una excitación a 340 nm (F340), (2) el registro de la emisión de fluorescencia utilizando una excitación a 380 nm (F380) y (3) el registro del cociente (ratio de fluorescencia, $R = F340/F380$) entre la emisión de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 340 nm y la emisión de fluorescencia con una longitud de onda de 380 nm. Todas las medidas se realizan a 36-37°C (controlador de temperatura DH-40i de Warner Instruments, Inc.). Las imágenes se obtienen utilizando los filtros de excitación 340/26 nm y 387/11 nm, un espejo dicróico de 510 nm y un filtro de emisión de 510/10 nm (*Semrock*). Las imágenes son capturadas con una cámara CCD Hamamatsu C9100-02 acoplada al microscopio de fluorescencia invertido y analizadas con el software NIS-Elements AR.

11.3. Calibración de la medida

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

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

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

11.4. Activación de SOCE con tapsigargina

Para inducir la apertura de los canales operados por depósitos intracelulares (canales SOC) se utiliza tapsigargina (Tg), un inhibidor específico de disociación lenta de la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarco(endo)plasmático (SERCA) (Lytton et al., 1991; Thastrup et al., 1990) que impide su relleno, induciendo de esta forma un vaciado de Ca^{2+} del RE. El vaciado de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} se determina incubando las células

²⁵ **Medio HBSS (Gibco):** Solución salina equilibrada de Hanks sin rojo fenol. Su composición es NaCl 138mM; KCl 5.3mM; Na_2HPO_4 0.34mM; KH_2PO_4 0.44mM; $NaHCO_3$ 4.17mM; Mg^{2+} 4mM (pH=7.4).

con Tg 1 μM en tampón HBSS²⁵ libre de Ca^{2+} suplementado con Mg^{2+} 2.2 mM y EGTA 0.1 mM. Por otro lado, la activación de canales SOC se confirma por el incremento del ratio F340/F380 tras la adición de CaCl_2 2 mM al medio extracelular.

11.5. Activación de SOCE con ATP y carbacol

Una manera alternativa de inducir el vaciado de los depósitos de calcio es mediante la estimulación de las células con ATP y carbacol (CCh), un agonista de receptores colinérgicos acoplados a proteínas G que estimula la liberación de Ca^{2+} de reservorios intracelulares a través de la producción de inositol trifosfato, IP_3 (Berridge, 1997; Kobayashi et al., 1989). Para ello, las células son estimuladas con pulsos de ATP 100 μM y carbacol 100 μM en tampón HBSS libre de Ca^{2+} suplementado con Mg^{2+} 2.2 mM y EGTA 0.1 mM, como se describe en (Pozo-Guisado et al., 2010). Una vez se ha producido la depleción de los depósitos de calcio, se añade CaCl_2 2 mM al medio extracelular y se monitoriza la concentración citosólica de calcio midiendo el incremento del ratio F340/F380.

12. Ensayo de invasión *in vivo*

Todos los ensayos de invasión *in vivo* se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones de la *Directiva 2010/63/EU* del Parlamento Europeo y el Consejo de la Unión Europea y el *Real Decreto 53/2013* por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos. Los experimentos fueron aprobados por los Comités de Bioética de la Universidad de Murcia (referencias #75/2014, #216/2014 y #395/2017), donde se llevaron a cabo según lo descrito en (Gabellini et al., 2018) utilizando larvas de pez cebra (mutante casper) como modelo experimental. Las células son lavadas con PBS y marcadas con 4 ng/ μl Dil²⁶ en PBS suplementado con 5% de suero. A continuación, las células se incuban secuencialmente a 37°C durante 15 minutos y a 4°C otros 15 minutos y seguidamente se lavan y centrifugan en PBS suplementado con suero, resuspendiéndose el precipitado celular en la solución de lavado²⁷. Tal y como se detalla en la figura 75, un total de 200 células son inyectadas en el saco vitelino de las larvas del pez cebra *roy^{ag/ag}; nacre^{w2/w2}* en las 48 horas posteriores a la fertilización y 5 días más tarde se analizan las larvas a 35°C para estudiar la diseminación de las células humanas U2OS por microscopía de fluorescencia.

²⁶ Dil (**ThermoFisher Scientific**): Colorante de membrana lipofílica (perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina ('Dil'; $\text{DiIC}_{18}(3)$)).

²⁷ **Solución de lavado:** PBS al 67% + 5% FBS.

Materiales y Métodos

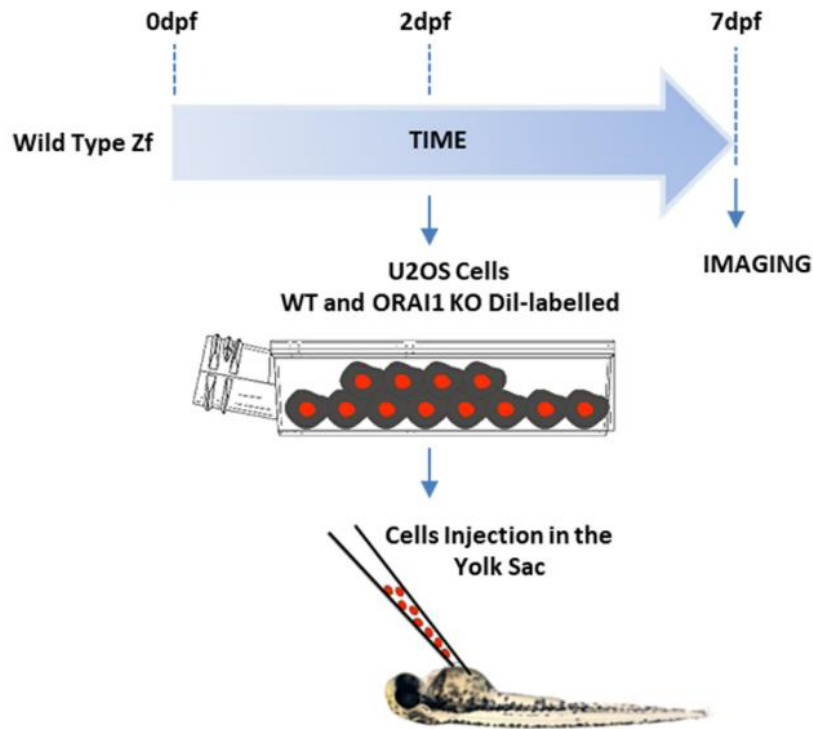


Figura 75. Diseño experimental de un ensayo de invasión *in vivo*. Las células U2OS fueron marcadas con perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina ('Dil'; DiIC₁₈(3)) en un tampón de PBS suplementado con 5% de suero. Se inyectaron 200 células/embrión de larvas de pez cebra (mutante casper) a las 48 horas siguientes a la fecundación (dpf: *days post-fertilization*) y tras mantenerse durante 5 días a 35°C, se analizó la diseminación de las células en las larvas mediante microscopía de fluorescencia. El grado de invasión celular fue calculado como el porcentaje de larvas invadidas por células humanas U2OS relativo al número total de larvas analizadas.

12.1. Cálculo del grado de invasividad celular

El grado de invasividad se calcula como el porcentaje de larvas del pez cebra que son invadidas por las células U2OS, cuyo potencial invasivo se pretende analizar, sobre el número total de larvas analizadas. Para ello se tiene en cuenta la presencia de al menos 3 focos tumorales por larva para considerar ésta positiva en la contabilización de la invasión. A su vez, las larvas positivas en invasión se distribuyen en tres grupos en función del número de focos tumorales que presenten: (1) 1-5 focos por larva, (2) 5-15 focos por larva y (3) más de 15 focos por larva. Las imágenes se toman mediante un estereomicroscopio de fluorescencia Leica MZ16F y son posteriormente procesadas mediante el software ImageJ.

13. Ensayo *in vivo* del ratio actina-F/actina-G

Para determinar la cantidad de actina filamentosa (actina-F) presente en el citoesqueleto frente al contenido de actina globular libre (actina-G) en el citosol se llevaron a cabo ensayos de fraccionamiento *in vivo* de actina-F/actina-G empleando el

kit #BK037 de *Cytoskeleton* (Denver, CO, EE.UU.). Para ello, se siembran células en placas de 10 cm y se mantienen en medio de cultivo DMEM completo unas 36 horas hasta alcanzar una confluencia al 60-70%. Posteriormente, las células se lisan en un volumen predeterminado de tampón de lisis con detergentes que estabiliza las formas filamentosa y globular de la actina. A continuación, las células se homogeneizan con jeringa de aguja de 25G y se incuban durante 10 minutos a 37°C. En este punto se toma una alícuota para evaluar posteriormente los niveles de proteína total a partir de lisados totales. Tras una centrifugación de 5 minutos a 1.000 x *g* para eliminar los restos celulares, se realiza una ultracentrifugación a 100.000 x *g* durante 1 h a 37°C para precipitar la actina-F y separar de este modo la actina filamentosa y la actina globular. A continuación, se rescata la actina-G del sobrenadante y la actina-F precipitada se resuspende en un tampón despolimerizante y se incuba a 4°C durante 1 hora para potenciar la despolimerización de la actina filamentosa. Por último, a partir de las fracciones obtenidas de actina-F y actina-G, se evalúa por inmunoblot cada una de las fracciones de actina, usando para su detección un anticuerpo anti-actina incluido en el kit de *Cytoskeleton*.

Bibliografía

- Abdullaev, I. F., Bisailon, J. M., Potier, M., Gonzalez, J. C., Motiani, R. K., & Trebak, M. (2008). Stim1 and Orai1 mediate CRAC currents and store-operated calcium entry important for endothelial cell proliferation. *Circ Res*, *103*(11), 1289-1299. <https://doi.org/10.1161/01.Res.0000338496.95579.56>
- Ahuja, R., Pinyol, R., Reichenbach, N., Custer, L., Klingensmith, J., Kessels, M. M., & Qualmann, B. (2007). Cordon-bleu is an actin nucleation factor and controls neuronal morphology. *Cell*, *131*(2), 337-350. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.030>
- Akella, N. M., Ciraku, L., & Reginato, M. J. (2019). Fueling the fire: emerging role of the hexosamine biosynthetic pathway in cancer. *BMC Biol*, *17*(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0671-3>
- Amann, K. J., & Pollard, T. D. (2001). Direct real-time observation of actin filament branching mediated by Arp2/3 complex using total internal reflection fluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(26), 15009-15013. <https://doi.org/10.1073/pnas.211556398>
- Ambudkar, I. S. (2007). TRPC1: a core component of store-operated calcium channels. *Biochem Soc Trans*, *35*(Pt 1), 96-100. <https://doi.org/10.1042/bst0350096>
- Ambudkar, I. S., Ong, H. L., Liu, X., Bandyopadhyay, B. C., & Cheng, K. T. (2007). TRPC1: the link between functionally distinct store-operated calcium channels. *Cell Calcium*, *42*(2), 213-223. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2007.01.013>
- Angelucci, A., & Bologna, M. (2007). Targeting vascular cell migration as a strategy for blocking angiogenesis: the central role of focal adhesion protein tyrosine kinase family. *Curr Pharm Des*, *13*(21), 2129-2145. <https://doi.org/10.2174/138161207781039643>
- Ardern, H., Sandilands, E., Machesky, L. M., Timpson, P., Frame, M. C., & Brunton, V. G. (2006). Src-dependent phosphorylation of Scar1 promotes its association with the Arp2/3 complex. *Cell Motil Cytoskeleton*, *63*(1), 6-13. <https://doi.org/10.1002/cm.20101>
- Artym, V. V., Zhang, Y., Seillier-Moisewitsch, F., Yamada, K. M., & Mueller, S. C. (2006). Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function. *Cancer Res*, *66*(6), 3034-3043. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-05-2177>
- Aspenström, P. (2019). The Intrinsic GDP/GTP Exchange Activities of Cdc42 and Rac1 Are Critical Determinants for Their Specific Effects on Mobilization of the Actin Filament System. *Cells*, *8*(7). <https://doi.org/10.3390/cells8070759>
- Assaker, G., Ramel, D., Wculek, S. K., González-Gaitán, M., & Emery, G. (2010). Spatial restriction of receptor tyrosine kinase activity through a polarized endocytic cycle controls border cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(52), 22558-22563. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010795108>
- Badr, C. E., Hewett, J. W., Breakefield, X. O., & Tannous, B. A. (2007). A highly sensitive assay for monitoring the secretory pathway and ER stress. *PLoS One*, *2*(6), e571. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000571>
- Ballestrem, C., Wehrle-Haller, B., Hinz, B., & Imhof, B. A. (2000). Actin-dependent lamellipodia formation and microtubule-dependent tail retraction control-directed cell migration. *Mol Biol Cell*, *11*(9), 2999-3012. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.9.2999>

Bibliografía

- Barry, S. T., Flinn, H. M., Humphries, M. J., Critchley, D. R., & Ridley, A. J. (1997). Requirement for Rho in integrin signalling. *Cell Adhes Commun*, 4(6), 387-398. <https://doi.org/10.3109/15419069709004456>
- Bear, J. E., Svitkina, T. M., Krause, M., Schafer, D. A., Loureiro, J. J., Strasser, G. A., Maly, I. V., Chaga, O. Y., Cooper, J. A., Borisy, G. G., & Gertler, F. B. (2002). Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell*, 109(4), 509-521. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00731-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00731-6)
- Beaty, B. T., & Condeelis, J. (2014). Digging a little deeper: the stages of invadopodium formation and maturation. *Eur J Cell Biol*, 93(10-12), 438-444. <https://doi.org/10.1016/j.eicb.2014.07.003>
- Ben-Kasus Nissim, T., Zhang, X., Elazar, A., Roy, S., Stolwijk, J. A., Zhou, Y., Motiani, R. K., Gueguinou, M., Hempel, N., Hershfinkel, M., Gill, D. L., Trebak, M., & Sekler, I. (2017). Mitochondria control store-operated Ca²⁺ entry through Na⁺ and redox signals. *Embo j*, 36(6), 797-815. <https://doi.org/10.15252/emboj.201592481>
- Berridge, M. J. (1997). Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Physiol*, 499 (Pt 2)(Pt 2), 291-306. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1997.sp021927>
- Berridge, M. J. (1998). Neuronal calcium signaling. *Neuron*, 21(1), 13-26. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80510-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80510-3)
- Berridge, M. J. (2005). Unlocking the secrets of cell signaling. *Annu Rev Physiol*, 67, 1-21. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.67.040103.152647>
- Berridge, M. J. (2012). Cell Signalling Biology.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., & Roderick, H. L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(7), 517-529. <https://doi.org/10.1038/nrm1155>
- Berridge, M. J., Lipp, P., & Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1(1), 11-21. <https://doi.org/10.1038/35036035>
- Biou, V., & Cherfils, J. (2004). Structural principles for the multispecificity of small GTP-binding proteins. *Biochemistry*, 43(22), 6833-6840. <https://doi.org/10.1021/bi049630u>
- Bisaillon, J. M., Motiani, R. K., Gonzalez-Cobos, J. C., Potier, M., Halligan, K. E., Alzawahra, W. F., Barroso, M., Singer, H. A., Jourd'heuil, D., & Trebak, M. (2010). Essential role for STIM1/Orai1-mediated calcium influx in PDGF-induced smooth muscle migration. *Am J Physiol Cell Physiol*, 298(5), C993-1005. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00325.2009>
- Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., & Plastino, J. (2014). Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol Rev*, 94(1), 235-263. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2013>
- Blanchoin, L., Pollard, T. D., & Mullins, R. D. (2000). Interactions of ADF/cofilin, Arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodeling of branched actin filament networks. *Curr Biol*, 10(20), 1273-1282. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)00749-1](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00749-1)
- Blaustein, M. P., & Lederer, W. J. (1999). Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev*, 79(3), 763-854. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.3.763>

- Bogeski, I., Kummerow, C., Al-Ansary, D., Schwarz, E. C., Koehler, R., Kozai, D., Takahashi, N., Peinelt, C., Griesemer, D., Bozem, M., Mori, Y., Hoth, M., & Niemeyer, B. A. (2010). Differential redox regulation of ORAI ion channels: a mechanism to tune cellular calcium signaling. *Sci Signal*, 3(115), ra24. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000672>
- Bogeski, I., & Niemeyer, B. A. (2014). Redox regulation of ion channels. *Antioxid Redox Signal*, 21(6), 859-862. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6019>
- Bootman, M. D., Lipp, P., & Berridge, M. J. (2001). The organisation and functions of local Ca(2+) signals. *J Cell Sci*, 114(Pt 12), 2213-2222. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.12.2213>
- Bos, J. L., Rehmann, H., & Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell*, 129(5), 865-877. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.018>
- Bourne, H. R., Sanders, D. A., & McCormick, F. (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*, 348(6297), 125-132. <https://doi.org/10.1038/348125a0>
- Bourne, H. R., Sanders, D. A., & McCormick, F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, 349(6305), 117-127. <https://doi.org/10.1038/349117a0>
- Bringuier, P. P., Tamimi, Y., Schuurin, E., & Schalken, J. (1996). Expression of cyclin D1 and EMS1 in bladder tumours; relationship with chromosome 11q13 amplification. *Oncogene*, 12(8), 1747-1753.
- Brown, M. C., & Turner, C. E. (2004). Paxillin: adapting to change. *Physiol Rev*, 84(4), 1315-1339. <https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2004>
- Brugnera, E., Haney, L., Grimsley, C., Lu, M., Walk, S. F., Tosello-Trampont, A. C., Macara, I. G., Madhani, H., Fink, G. R., & Ravichandran, K. S. (2002). Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. *Nat Cell Biol*, 4(8), 574-582. <https://doi.org/10.1038/ncb824>
- Brundage, R. A., Fogarty, K. E., Tuft, R. A., & Fay, F. S. (1991). Calcium gradients underlying polarization and chemotaxis of eosinophils. *Science*, 254(5032), 703-706. <https://doi.org/10.1126/science.1948048>
- Budd, S. L., & Nicholls, D. G. (1996). Mitochondria, calcium regulation, and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurochem*, 67(6), 2282-2291. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.67062282.x>
- Bulla, M., Gyimesi, G., Kim, J. H., Bhardwaj, R., Hediger, M. A., Frieden, M., & Demaurex, N. (2019). ORAI1 channel gating and selectivity is differentially altered by natural mutations in the first or third transmembrane domain. *J Physiol*, 597(2), 561-582. <https://doi.org/10.1113/jp277079>
- 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(7), e609. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000609>
- Calloway, N., Holowka, D., & Baird, B. (2010). A basic sequence in STIM1 promotes Ca2+ influx by interacting with the C-terminal acidic coiled coil of Orai1. *Biochemistry*, 49(6), 1067-1071. <https://doi.org/10.1021/bi901936q>
- Campbell, D. H., deFazio, A., Sutherland, R. L., & Daly, R. J. (1996). Expression and tyrosine phosphorylation of EMS1 in human breast cancer cell lines. *Int J Cancer*,

Bibliografía

- 68(4), 485-492. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19961115\)68:4<485::Aid-ijc14>3.0.Co;2-4](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19961115)68:4<485::Aid-ijc14>3.0.Co;2-4)
- Campbell, D. H., Sutherland, R. L., & Daly, R. J. (1999). Signaling pathways and structural domains required for phosphorylation of EMS1/cortactin. *Cancer Res*, 59(20), 5376-5385.
- Campellone, K. G., Webb, N. J., Znameroski, E. A., & Welch, M. D. (2008). WHAMM is an Arp2/3 complex activator that binds microtubules and functions in ER to Golgi transport. *Cell*, 134(1), 148-161. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.032>
- Carafoli, E., Santella, L., Branca, D., & Brini, M. (2001). Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 36(2), 107-260. <https://doi.org/10.1080/20014091074183>
- Carlier, M. F., Ressad, F., & Pantaloni, D. (1999). Control of actin dynamics in cell motility. Role of ADF/cofilin. *J Biol Chem*, 274(48), 33827-33830. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.48.33827>
- Casas-Rua, V., Tomas-Martin, P., Lopez-Guerrero, A. M., Alvarez, I. S., Pozo-Guisado, E., & Martin-Romero, F. J. (2015). STIM1 phosphorylation triggered by epidermal growth factor mediates cell migration. *Biochim Biophys Acta*, 1853(1), 233-243. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.10.027>
- Catterall, W. A. (1998). Structure and function of neuronal Ca²⁺ channels and their role in neurotransmitter release. *Cell Calcium*, 24(5-6), 307-323. [https://doi.org/10.1016/s0143-4160\(98\)90055-0](https://doi.org/10.1016/s0143-4160(98)90055-0)
- Catterall, W. A., & Zheng, N. (2015). Deciphering voltage-gated Na⁽⁺⁾ and Ca⁽²⁺⁾ channels by studying prokaryotic ancestors. *Trends Biochem Sci*, 40(9), 526-534. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.07.002>
- Chan, K. T., Cortesio, C. L., & Huttenlocher, A. (2009). FAK alters invadopodia and focal adhesion composition and dynamics to regulate breast cancer invasion. *J Cell Biol*, 185(2), 357-370. <https://doi.org/10.1083/jcb.200809110>
- Che, H., Li, G., Sun, H. Y., Xiao, G. S., Wang, Y., & Li, G. R. (2015). Roles of store-operated Ca²⁺ channels in regulating cell cycling and migration of human cardiac c-kit⁺ progenitor cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 309(10), H1772-1781. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00260.2015>
- Chen, S. C., Chen, F. C., & Li, W. H. (2010). Phosphorylated and nonphosphorylated serine and threonine residues evolve at different rates in mammals. *Mol Biol Evol*, 27(11), 2548-2554. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq142>
- Chen, Y. F., Chen, Y. T., Chiu, W. T., & Shen, M. R. (2013). Remodeling of calcium signaling in tumor progression. *J Biomed Sci*, 20(1), 23. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-20-23>
- Chen, Y. F., Chiu, W. T., Chen, Y. T., Lin, P. Y., Huang, H. J., Chou, C. Y., Chang, H. C., Tang, M. J., & Shen, M. R. (2011). Calcium store sensor stromal-interaction molecule 1-dependent signaling plays an important role in cervical cancer growth, migration, and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(37), 15225-15230. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103315108>
- Chen, Y. W., Lai, C. S., Chen, Y. F., Chiu, W. T., Chen, H. C., & Shen, M. R. (2017). STIM1-dependent Ca⁽²⁺⁾ signaling regulates podosome formation to facilitate cancer cell invasion. *Sci Rep*, 7(1), 11523. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11273-2>
- Chen, Z., Borek, D., Padrick, S. B., Gomez, T. S., Metlagel, Z., Ismail, A. M., Umetani, J., Billadeau, D. D., Otwinowski, Z., & Rosen, M. K. (2010). Structure and control of

- the actin regulatory WAVE complex. *Nature*, 468(7323), 533-538. <https://doi.org/10.1038/nature09623>
- Chesarone, M. A., & Goode, B. L. (2009). Actin nucleation and elongation factors: mechanisms and interplay. *Curr Opin Cell Biol*, 21(1), 28-37. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.12.001>
- Clapham, D. E. (2007). Calcium signaling. *Cell*, 131(6), 1047-1058. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>
- Clark, E. A., King, W. G., Brugge, J. S., Symons, M., & Hynes, R. O. (1998). Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases. *J Cell Biol*, 142(2), 573-586. <https://doi.org/10.1083/jcb.142.2.573>
- Clark, E. S., Whigham, A. S., Yarbrough, W. G., & Weaver, A. M. (2007). Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia. *Cancer Res*, 67(9), 4227-4235. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-06-3928>
- Cohen, P. (2000). The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update. *Trends Biochem Sci*, 25(12), 596-601. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(00\)01712-6](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(00)01712-6)
- Condeelis, J. (1993). Life at the leading edge: the formation of cell protrusions. *Annu Rev Cell Biol*, 9, 411-444. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.09.110193.002211>
- Côté, J. F., & Vuori, K. (2002). Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity. *J Cell Sci*, 115(Pt 24), 4901-4913. <https://doi.org/10.1242/jcs.00219>
- Cox, E. A., & Huttenlocher, A. (1998). Regulation of integrin-mediated adhesion during cell migration. *Microsc Res Tech*, 43(5), 412-419. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0029\(19981201\)43:5<412::Aid-jemt7>3.0.Co;2-f](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0029(19981201)43:5<412::Aid-jemt7>3.0.Co;2-f)
- Daub, H., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Sobel, A., & Hall, A. (2001). Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16. *J Biol Chem*, 276(3), 1677-1680. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000635200>
- Davis, F. M., Peters, A. A., Grice, D. M., Cabot, P. J., Parat, M. O., Roberts-Thomson, S. J., & Monteith, G. R. (2012). Non-stimulated, agonist-stimulated and store-operated Ca²⁺ influx in MDA-MB-468 breast cancer cells and the effect of EGF-induced EMT on calcium entry. *PLoS One*, 7(5), e36923. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036923>
- De Corte, V., Bruyneel, E., Boucherie, C., Mareel, M., Vandekerckhove, J., & Gettemans, J. (2002). Gelsolin-induced epithelial cell invasion is dependent on Ras-Rac signaling. *Embo j*, 21(24), 6781-6790. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf680>
- DeHaven, W. I., Smyth, J. T., Boyles, R. R., & Putney, J. W., Jr. (2007). Calcium inhibition and calcium potentiation of Orai1, Orai2, and Orai3 calcium release-activated calcium channels. *J Biol Chem*, 282(24), 17548-17556. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611374200>
- Der, C. J., Krontiris, T. G., & Cooper, G. M. (1982). Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79(11), 3637-3640. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.11.3637>

Bibliografía

- Derler, I., Fahrner, M., Muik, M., Lackner, B., Schindl, R., Groschner, K., & 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(37), 24933-24938. <https://doi.org/10.1074/jbc.C109.024083>
- DerMardirossian, C., & Bokoch, G. M. (2005). GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol*, 15(7), 356-363. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.05.001>
- Derry, J. M., Ochs, H. D., & Francke, U. (1994). Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell*, 79(5), following 922.
- Diekmann, D., Brill, S., Garrett, M. D., Totty, N., Hsuan, J., Monfries, C., Hall, C., Lim, L., & Hall, A. (1991). Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac. *Nature*, 351(6325), 400-402. <https://doi.org/10.1038/351400a0>
- DiPolo, R., & Beaugé, L. (2006). Sodium/calcium exchanger: influence of metabolic regulation on ion carrier interactions. *Physiol Rev*, 86(1), 155-203. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2005>
- Dong, H., Fiorin, G., Carnevale, V., Treptow, W., & Klein, M. L. (2013). Pore waters regulate ion permeation in a calcium release-activated calcium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(43), 17332-17337. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316969110>
- Dörr, K., Kilch, T., Kappel, S., Alansary, D., Schwär, G., Niemeyer, B. A., & Peinelt, C. (2016). Cell type-specific glycosylation of Orai1 modulates store-operated Ca²⁺ entry. *Sci Signal*, 9(418), ra25. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaa9913>
- Ebashi, S., & Lipmann, F. (1962). ADENOSINE TRIPHOSPHATE-LINKED CONCENTRATION OF CALCIUM IONS IN A PARTICULATE FRACTION OF RABBIT MUSCLE. *J Cell Biol*, 14(3), 389-400. <https://doi.org/10.1083/jcb.14.3.389>
- Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A. V., Mann, M., & Kirschner, M. W. (2002). Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature*, 418(6899), 790-793. <https://doi.org/10.1038/nature00859>
- Eichler, J. (2019). Protein glycosylation. *Curr Biol*, 29(7), R229-r231. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.01.003>
- Etienne-Manneville, S., & Hall, A. (2001). Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell*, 106(4), 489-498. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00471-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00471-8)
- Etienne-Manneville, S., & Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature*, 420(6916), 629-635. <https://doi.org/10.1038/nature01148>
- Evans, J. H., & Falke, J. J. (2007). Ca²⁺ influx is an essential component of the positive-feedback loop that maintains leading-edge structure and activity in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(41), 16176-16181. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707719104>
- Faouzi, M., Hague, F., Potier, M., Ahidouch, A., Sevestre, H., & Ouadid-Ahidouch, H. (2011). Down-regulation of Orai3 arrests cell-cycle progression and induces apoptosis in breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells. *J Cell Physiol*, 226(2), 542-551. <https://doi.org/10.1002/jcp.22363>
- Feng, M., Grice, D. M., Faddy, H. M., Nguyen, N., Leitch, S., Wang, Y., Muend, S., Kenny, P. A., Sukumar, S., Roberts-Thomson, S. J., Monteith, G. R., & Rao, R. (2010). Store-independent activation of Orai1 by SPCA2 in mammary tumors. *Cell*, 143(1), 84-98. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.040>

- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S. H., Tanasa, B., Hogan, P. G., Lewis, R. S., Daly, M., & Rao, A. (2006). A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*, *441*(7090), 179-185. <https://doi.org/10.1038/nature04702>
- Feske, S., Prakriya, M., Rao, A., & 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*(5), 651-662. <https://doi.org/10.1084/jem.20050687>
- Fidler, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, *3*(6), 453-458. <https://doi.org/10.1038/nrc1098>
- Fiorio Pla, A., Kondratska, K., & Prevarskaya, N. (2016). STIM and ORAI proteins: crucial roles in hallmarks of cancer. *Am J Physiol Cell Physiol*, *310*(7), C509-519. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00364.2015>
- Folio, C., Zalacain, M., Zanduetta, C., Ormazábal, C., Sierrasesúmaga, L., San Julián, M., de las Rivas, J., Toledo, G., Lecanda, F., & Patiño-García, A. (2011). Cortactin (CTTN) overexpression in osteosarcoma correlates with advanced stage and reduced survival. *Cancer Biomark*, *10*(1), 35-41. <https://doi.org/10.3233/cbm-2012-0227>
- Friedl, P., & Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*, *3*(5), 362-374. <https://doi.org/10.1038/nrc1075>
- Friedl, P., Zänker, K. S., & Bröcker, E. B. (1998). Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function. *Microsc Res Tech*, *43*(5), 369-378. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0029\(19981201\)43:5<369::Aid-jemt3>3.0.Co;2-6](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0029(19981201)43:5<369::Aid-jemt3>3.0.Co;2-6)
- Frings, S. (1997). Cyclic nucleotide-gated channels and calcium: an intimate relation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*, *31*, 75-82. [https://doi.org/10.1016/s1040-7952\(97\)80010-9](https://doi.org/10.1016/s1040-7952(97)80010-9)
- Fujiwara, T., Oda, K., Yokota, S., Takatsuki, A., & Ikehara, Y. (1988). Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, *263*(34), 18545-18552.
- Gabellini, C., Gómez-Abenza, E., Ibáñez-Molero, S., Tupone, M. G., Pérez-Oliva, A. B., de Oliveira, S., Del Bufalo, D., & Mulero, V. (2018). Interleukin 8 mediates bcl-xL-induced enhancement of human melanoma cell dissemination and angiogenesis in a zebrafish xenograft model. *Int J Cancer*, *142*(3), 584-596. <https://doi.org/10.1002/ijc.31075>
- Giannone, G., Dubin-Thaler, B. J., Döbereiner, H. G., Kieffer, N., Bresnick, A. R., & Sheetz, M. P. (2004). Periodic lamellipodial contractions correlate with rearward actin waves. *Cell*, *116*(3), 431-443. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00058-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00058-3)
- Giannone, G., Dubin-Thaler, B. J., Rossier, O., Cai, Y., Chaga, O., Jiang, G., Beaver, W., Döbereiner, H. G., Freund, Y., Borisy, G., & Sheetz, M. P. (2007). Lamellipodial actin mechanically links myosin activity with adhesion-site formation. *Cell*, *128*(3), 561-575. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.12.039>
- Gill, D. L., Chueh, S. H., & Whitlow, C. L. (1984). Functional importance of the synaptic plasma membrane calcium pump and sodium-calcium exchanger. *J Biol Chem*, *259*(17), 10807-10813.
- Gordienko, D. V., & Zholos, A. V. (2004). Regulation of muscarinic cationic current in myocytes from guinea-pig ileum by intracellular Ca²⁺ release: a central role of

Bibliografía

- inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Cell Calcium*, 36(5), 367-386. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2004.02.021>
- Grahovac, J., & Wells, A. (2014). Matrikine and matricellular regulators of EGF receptor signaling on cancer cell migration and invasion. *Lab Invest*, 94(1), 31-40. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2013.132>
- Gross, S. A., Wissenbach, U., Philipp, S. E., Freichel, M., Cavalié, A., & Flockerzi, V. (2007). Murine ORAI2 splice variants form functional Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) channels. *J Biol Chem*, 282(27), 19375-19384. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701962200>
- Gudermann, T., Hofmann, T., Mederos y Schnitzler, M., & Dietrich, A. (2004). Activation, subunit composition and physiological relevance of DAG-sensitive TRPC proteins. *Novartis Found Symp*, 258, 103-118; discussion 118-122, 155-109, 263-106.
- Guo, Y., Zhu, J., Wang, X., Li, R., Jiang, K., Chen, S., Fan, J., Xue, L., & Hao, D. (2019). Orai1 Promotes Osteosarcoma Metastasis by Activating the Ras-Rac1-WAVE2 Signaling Pathway. *Med Sci Monit*, 25, 9227-9236. <https://doi.org/10.12659/msm.919594>
- Gwack, Y., Srikanth, S., Feske, S., Cruz-Guilloty, F., Oh-hora, M., Neems, D. S., Hogan, P. G., & Rao, A. (2007). Biochemical and functional characterization of Orai proteins. *J Biol Chem*, 282(22), 16232-16243. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609630200>
- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, 279(5350), 509-514. <https://doi.org/10.1126/science.279.5350.509>
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166(4), 557-580. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(83)80284-8)
- Harper, K., Arsenault, D., Boulay-Jean, S., Lauzier, A., Lucien, F., & Dubois, C. M. (2010). Autotaxin promotes cancer invasion via the lysophosphatidic acid receptor 4: participation of the cyclic AMP/EPAC/Rac1 signaling pathway in invadopodia formation. *Cancer Res*, 70(11), 4634-4643. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-09-3813>
- Hart, G. W., Housley, M. P., & Slawson, C. (2007). Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature*, 446(7139), 1017-1022. <https://doi.org/10.1038/nature05815>
- Hasselbach, W., & Makinose, M. (1961). [The calcium pump of the "relaxing granules" of muscle and its dependence on ATP-splitting]. *Biochem Z*, 333, 518-528.
- Hawkins, P. T., Eguinoa, A., Qiu, R. G., Stokoe, D., Cooke, F. T., Walters, R., Wennström, S., Claesson-Welsh, L., Evans, T., Symons, M., & et al. (1995). PDGF stimulates an increase in GTP-Rac via activation of phosphoinositide 3-kinase. *Curr Biol*, 5(4), 393-403. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(95\)00080-7](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(95)00080-7)
- Head, J. A., Jiang, D., Li, M., Zorn, L. J., Schaefer, E. M., Parsons, J. T., & Weed, S. A. (2003). Cortactin tyrosine phosphorylation requires Rac1 activity and association with the cortical actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell*, 14(8), 3216-3229. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-11-0753>
- Higgs, H. N., & Pollard, T. D. (2001). Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu Rev Biochem*, 70, 649-676. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.649>
- Hinz, B., Alt, W., Johnen, C., Herzog, V., & Kaiser, H. W. (1999). Quantifying lamella dynamics of cultured cells by SACED, a new computer-assisted motion analysis. *Exp Cell Res*, 251(1), 234-243. <https://doi.org/10.1006/excr.1999.4541>

- Hodeify, R., Selvaraj, S., Wen, J., Arredouani, A., Hubrack, S., Dib, M., Al-Thani, S. N., McGraw, T., & Machaca, K. (2015). A STIM1-dependent 'trafficking trap' mechanism regulates Orai1 plasma membrane residence and Ca²⁺ influx levels. *J Cell Sci*, *128*(16), 3143-3154. <https://doi.org/10.1242/jcs.172320>
- Hodge, R. G., Schaefer, A., Howard, S. V., & Der, C. J. (2020). RAS and RHO family GTPase mutations in cancer: twin sons of different mothers? *Crit Rev Biochem Mol Biol*, *55*(4), 386-407. <https://doi.org/10.1080/10409238.2020.1810622>
- Hofer, A. M., Curci, S., Doble, M. A., Brown, E. M., & Soybel, D. I. (2000). Intercellular communication mediated by the extracellular calcium-sensing receptor. *Nat Cell Biol*, *2*(7), 392-398. <https://doi.org/10.1038/35017020>
- Hogan, P. G., & Rao, A. (2015). Store-operated calcium entry: Mechanisms and modulation. *Biochem Biophys Res Commun*, *460*(1), 40-49. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.02.110>
- Hooper, R., Zhang, X., Webster, M., Go, C., Kedra, J., Marchbank, K., Gill, D. L., Weeraratna, A. T., Trebak, M., & Soboloff, J. (2015). Novel Protein Kinase C-Mediated Control of Orai1 Function in Invasive Melanoma. *Mol Cell Biol*, *35*(16), 2790-2798. <https://doi.org/10.1128/mcb.01500-14>
- Huang, C., Liu, J., Haudenschild, C. C., & Zhan, X. (1998). The role of tyrosine phosphorylation of cortactin in the locomotion of endothelial cells. *J Biol Chem*, *273*(40), 25770-25776. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.40.25770>
- Huang, C., Tandon, N. N., Greco, N. J., Ni, Y., Wang, T., & Zhan, X. (1997). Proteolysis of platelet cortactin by calpain. *J Biol Chem*, *272*(31), 19248-19252. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.31.19248>
- Huang, Y. W., Chang, S. J., Harn, H. I., Huang, H. T., Lin, H. H., Shen, M. R., Tang, M. J., & Chiu, W. T. (2015). Mechanosensitive store-operated calcium entry regulates the formation of cell polarity. *J Cell Physiol*, *230*(9), 2086-2097. <https://doi.org/10.1002/jcp.24936>
- Jeannot, P., Nowosad, A., Perchey, R. T., Callot, C., Bennana, E., Katsube, T., Mayeux, P., Guillonneau, F., Manenti, S., & Besson, A. (2017). p27(Kip1) promotes invadopodia turnover and invasion through the regulation of the PAK1/Cortactin pathway. *Elife*, *6*. <https://doi.org/10.7554/eLife.22207>
- Ji, R., Zhu, X.-J., Wang, Z.-R., & Huang, L.-Q. (2020). Cortactin in Epithelial–Mesenchymal Transition [Review]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.585619>
- Johnson, J., Blackman, R., Gross, S., & Soboloff, J. (2022). Control of STIM and Orai function by post-translational modifications. *Cell Calcium*, *103*, 102544. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2022.102544>
- Johnson, S. A., & Hunter, T. (2005). Kinomics: methods for deciphering the kinome. *Nat Methods*, *2*(1), 17-25. <https://doi.org/10.1038/nmeth731>
- Kang, Q., Peng, X., Li, X., Hu, D., Wen, G., Wei, Z., & Yuan, B. (2021). Calcium Channel Protein ORAI1 Mediates TGF-β Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Colorectal Cancer Cells. *Front Oncol*, *11*, 649476. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.649476>
- Kanner, S. B., Reynolds, A. B., Vines, R. R., & Parsons, J. T. (1990). Monoclonal antibodies to individual tyrosine-phosphorylated protein substrates of oncogene-encoded tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *87*(9), 3328-3332. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.9.3328>

Bibliografia

- Kappel, S., Borgström, A., Stokłosa, P., Dörr, K., & Peinelt, C. (2019). Store-operated calcium entry in disease: Beyond STIM/Orai expression levels. *Semin Cell Dev Biol*, 94, 66-73. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.01.003>
- Karlseder, J., Smogorzewska, A., & de Lange, T. (2002). Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science*, 295(5564), 2446-2449. <https://doi.org/10.1126/science.1069523>
- Kawasaki, T., Ueyama, T., Lange, I., Feske, S., & Saito, N. (2010). Protein kinase C-induced phosphorylation of Orai1 regulates the intracellular Ca²⁺ level via the store-operated Ca²⁺ channel. *J Biol Chem*, 285(33), 25720-25730. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.022996>
- Kelleher, J. F., Atkinson, S. J., & Pollard, T. D. (1995). Sequences, structural models, and cellular localization of the actin-related proteins Arp2 and Arp3 from *Acanthamoeba*. *J Cell Biol*, 131(2), 385-397. <https://doi.org/10.1083/jcb.131.2.385>
- Kelley, L. C., Hayes, K. E., Ammer, A. G., Martin, K. H., & Weed, S. A. (2010). Cortactin phosphorylated by ERK1/2 localizes to sites of dynamic actin regulation and is required for carcinoma lamellipodia persistence. *PLoS One*, 5(11), e13847. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013847>
- Kelley, L. C., Hayes, K. E., Ammer, A. G., Martin, K. H., & Weed, S. A. (2011). Revisiting the ERK/Src cortactin switch. *Commun Integr Biol*, 4(2), 205-207. <https://doi.org/10.4161/cib.4.2.14420>
- Kilch, T., Alansary, D., Peglow, M., Dörr, K., Rychkov, G., Rieger, H., Peinelt, C., & Niemeyer, B. A. (2013). Mutations of the Ca²⁺-sensing stromal interaction molecule STIM1 regulate Ca²⁺ influx by altered oligomerization of STIM1 and by destabilization of the Ca²⁺ channel Orai1. *J Biol Chem*, 288(3), 1653-1664. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.417246>
- Kim, J. M., Lee, M., Kim, N., & Heo, W. D. (2016). Optogenetic toolkit reveals the role of Ca²⁺ sparklets in coordinated cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(21), 5952-5957. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518412113>
- Knöll, B., & Drescher, U. (2004). Src family kinases are involved in EphA receptor-mediated retinal axon guidance. *J Neurosci*, 24(28), 6248-6257. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0985-04.2004>
- Kobayashi, K., Kuroda, S., Fukata, M., Nakamura, T., Nagase, T., Nomura, N., Matsuura, Y., Yoshida-Kubomura, N., Iwamatsu, A., & Kaibuchi, K. (1998). p140Sra-1 (specifically Rac1-associated protein) is a novel specific target for Rac1 small GTPase. *J Biol Chem*, 273(1), 291-295. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.1.291>
- Kobayashi, S., Kitazawa, T., Somlyo, A. V., & Somlyo, A. P. (1989). Cytosolic heparin inhibits muscarinic and alpha-adrenergic Ca²⁺ release in smooth muscle. Physiological role of inositol 1,4,5-trisphosphate in pharmacomechanical coupling. *J Biol Chem*, 264(30), 17997-18004.
- Kondratska, K., Kondratskyi, A., Yassine, M., Lemonnier, L., Lepage, G., Morabito, A., Skryma, R., & Prevarskaya, N. (2014). Orai1 and STIM1 mediate SOCE and contribute to apoptotic resistance of pancreatic adenocarcinoma. *Biochim Biophys Acta*, 1843(10), 2263-2269. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.02.012>

- Korzeniowski, M. K., Manjarrés, I. M., Varnai, P., & Balla, T. (2010). Activation of STIM1-Orai1 involves an intramolecular switching mechanism. *Sci Signal*, 3(148), ra82. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001122>
- Kozma, R., Ahmed, S., Best, A., & Lim, L. (1995). The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol*, 15(4), 1942-1952. <https://doi.org/10.1128/mcb.15.4.1942>
- Krause, M., & Gautreau, A. (2014). Steering cell migration: lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(9), 577-590. <https://doi.org/10.1038/nrm3861>
- Kunda, P., Craig, G., Dominguez, V., & Baum, B. (2003). Abi, Sra1, and Kette control the stability and localization of SCAR/WAVE to regulate the formation of actin-based protrusions. *Curr Biol*, 13(21), 1867-1875. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.10.005>
- Kuras, Z., Yun, Y. H., Chimote, A. A., Neumeier, L., & Conforti, L. (2012). KCa3.1 and TRPM7 channels at the uropod regulate migration of activated human T cells. *PLoS One*, 7(8), e43859. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043859>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lauffenburger, D. A., & Horwitz, A. F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, 84(3), 359-369. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81280-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81280-5)
- Lauvrak, S. U., Munthe, E., Kresse, S. H., Stratford, E. W., Namløs, H. M., Meza-Zepeda, L. A., & Myklebost, O. (2013). Functional characterisation of osteosarcoma cell lines and identification of mRNAs and miRNAs associated with aggressive cancer phenotypes. *Br J Cancer*, 109(8), 2228-2236. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.549>
- Lee, J., Ishihara, A., Oxford, G., Johnson, B., & Jacobson, K. (1999). Regulation of cell movement is mediated by stretch-activated calcium channels. *Nature*, 400(6742), 382-386. <https://doi.org/10.1038/22578>
- Lee, K. P., Yuan, J. P., Zeng, W., So, I., Worley, P. F., & Muallem, S. (2009). Molecular determinants of fast Ca²⁺-dependent inactivation and gating of the Orai channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(34), 14687-14692. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904664106>
- Leng, Y., Zhang, J., Badour, K., Arpaia, E., Freeman, S., Cheung, P., Siu, M., & Siminovitch, K. (2005). Abelson-interactor-1 promotes WAVE2 membrane translocation and Abelson-mediated tyrosine phosphorylation required for WAVE2 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(4), 1098-1103. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409120102>
- Levin, E. G. (2005). Cancer therapy through control of cell migration. *Curr Cancer Drug Targets*, 5(7), 505-518. <https://doi.org/10.2174/156800905774574048>
- Lewis, R. S. (2007). The molecular choreography of a store-operated calcium channel. *Nature*, 446(7133), 284-287. <https://doi.org/10.1038/nature05637>
- Li, B., & de Lange, T. (2003). Rap1 affects the length and heterogeneity of human telomeres. *Mol Biol Cell*, 14(12), 5060-5068. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-06-0403>

Bibliografía

- Li, M., Jiang, J., & Yue, L. (2006). Functional characterization of homo- and heteromeric channel kinases TRPM6 and TRPM7. *J Gen Physiol*, 127(5), 525-537. <https://doi.org/10.1085/jgp.200609502>
- Li, Y., Tondravi, M., Liu, J., Smith, E., Haudenschild, C. C., Kaczmarek, M., & Zhan, X. (2001). Cortactin potentiates bone metastasis of breast cancer cells. *Cancer Res*, 61(18), 6906-6911.
- Lin, C. W., Sun, M. S., Liao, M. Y., Chung, C. H., Chi, Y. H., Chiou, L. T., Yu, J., Lou, K. L., & Wu, H. C. (2014). Podocalyxin-like 1 promotes invadopodia formation and metastasis through activation of Rac1/Cdc42/cortactin signaling in breast cancer cells. *Carcinogenesis*, 35(11), 2425-2435. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgu139>
- Lin, J., Xie, Z., Zhu, H., & Qian, J. (2010). Understanding protein phosphorylation on a systems level. *Brief Funct Genomics*, 9(1), 32-42. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elp045>
- Linardopoulou, E. V., Parghi, S. S., Friedman, C., Osborn, G. E., Parkhurst, S. M., & Trask, B. J. (2007). Human subtelomeric WASH genes encode a new subclass of the WASP family. *PLoS Genet*, 3(12), e237. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030237>
- Linder, S. (2007). The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends Cell Biol*, 17(3), 107-117. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.01.002>
- Liou, J., Kim, M. L., Heo, W. D., Jones, J. T., Myers, J. W., Ferrell, J. E., Jr., & Meyer, T. (2005). STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Curr Biol*, 15(13), 1235-1241. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.05.055>
- Lis, A., Peinelt, C., Beck, A., Parvez, S., Monteilh-Zoller, M., Fleig, A., & Penner, R. (2007). CRACM1, CRACM2, and CRACM3 are store-operated Ca²⁺ channels with distinct functional properties. *Curr Biol*, 17(9), 794-800. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.03.065>
- Litjens, T., Harland, M. L., Roberts, M. L., Barritt, G. J., & Rychkov, G. Y. (2004). Fast Ca(2+)-dependent inactivation of the store-operated Ca²⁺ current (ISOC) in liver cells: a role for calmodulin. *J Physiol*, 558(Pt 1), 85-97. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.065870>
- Lo, C. M., Wang, H. B., Dembo, M., & Wang, Y. L. (2000). Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J*, 79(1), 144-152. [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(00\)76279-5](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(00)76279-5)
- Lopez-Guerrero, A. M., Pascual-Caro, C., Martin-Romero, F. J., & Pozo-Guisado, E. (2017). Store-operated calcium entry is dispensable for the activation of ERK1/2 pathway in prostate cancer cells. *Cell Signal*, 40, 44-52. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.08.010>
- Lopez-Guerrero, A. M., Tomas-Martin, P., Pascual-Caro, C., Macartney, T., Rojas-Fernandez, A., Ball, G., Alessi, D. R., Pozo-Guisado, E., & Martin-Romero, F. J. (2017). Regulation of membrane ruffling by polarized STIM1 and ORAI1 in cortactin-rich domains. *Sci Rep*, 7(1), 383. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00331-4>
- Lu, M., Witke, W., Kwiatkowski, D. J., & Kosik, K. S. (1997). Delayed retraction of filopodia in gelsolin null mice. *J Cell Biol*, 138(6), 1279-1287. <https://doi.org/10.1083/jcb.138.6.1279>

- Luik, R. M., Wu, M. M., Buchanan, J., & Lewis, R. S. (2006). The elementary unit of store-operated Ca^{2+} entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions. *J Cell Biol*, 174(6), 815-825. <https://doi.org/10.1083/jcb.200604015>
- Lunz, V., Romanin, C., & Frischauf, I. (2019). STIM1 activation of Orai1. *Cell Calcium*, 77, 29-38. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2018.11.009>
- Lynch, D. K., Winata, S. C., Lyons, R. J., Hughes, W. E., Lehrbach, G. M., Wasinger, V., Corthals, G., Cordwell, S., & Daly, R. J. (2003). A Cortactin-CD2-associated protein (CD2AP) complex provides a novel link between epidermal growth factor receptor endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, 278(24), 21805-21813. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211407200>
- Lytton, J., Westlin, M., & Hanley, M. R. (1991). Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J Biol Chem*, 266(26), 17067-17071.
- Machaca, K., & Haun, S. (2002). Induction of maturation-promoting factor during *Xenopus* oocyte maturation uncouples Ca^{2+} store depletion from store-operated Ca^{2+} entry. *J Cell Biol*, 156(1), 75-85. <https://doi.org/10.1083/jcb.200110059>
- Machesky, L. M., Atkinson, S. J., Ampe, C., Vandekerckhove, J., & Pollard, T. D. (1994). Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J Cell Biol*, 127(1), 107-115. <https://doi.org/10.1083/jcb.127.1.107>
- Machesky, L. M., & Insall, R. H. (1998). Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol*, 8(25), 1347-1356. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(98\)00015-3](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(98)00015-3)
- Madden, D. R. (2002). The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat Rev Neurosci*, 3(2), 91-101. <https://doi.org/10.1038/nrn725>
- Manning, G., Plowman, G. D., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002). Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem Sci*, 27(10), 514-520. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(02\)02179-5](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(02)02179-5)
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 298(5600), 1912-1934. <https://doi.org/10.1126/science.1075762>
- Mattila, P. K., & Lappalainen, P. (2008). Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(6), 446-454. <https://doi.org/10.1038/nrm2406>
- McNally, B. A., Somasundaram, A., Jairaman, A., Yamashita, M., & Prakriya, M. (2013). The C- and N-terminal STIM1 binding sites on Orai1 are required for both trapping and gating CRAC channels. *J Physiol*, 591(11), 2833-2850. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.250456>
- McNally, B. A., Somasundaram, A., Yamashita, M., & Prakriya, M. (2012). Gated regulation of CRAC channel ion selectivity by STIM1. *Nature*, 482(7384), 241-245. <https://doi.org/10.1038/nature10752>
- Meissner, G. (1994). Ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annu Rev Physiol*, 56, 485-508. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.56.030194.002413>

Bibliografía

- Memon, A. R. (2004). The role of ADP-ribosylation factor and SAR1 in vesicular trafficking in plants. *Biochim Biophys Acta*, 1664(1), 9-30. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.04.005>
- Micaroni, M., Perinetti, G., Berrie, C. P., & Mironov, A. A. (2010). The SPCA1 Ca²⁺ pump and intracellular membrane trafficking. *Traffic*, 11(10), 1315-1333. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01096.x>
- Michiels, F., Habets, G. G., Stam, J. C., van der Kammen, R. A., & Collard, J. G. (1995). A role for Rac in Tiam1-induced membrane ruffling and invasion. *Nature*, 375(6529), 338-340. <https://doi.org/10.1038/375338a0>
- Mignen, O., Thompson, J. L., & Shuttleworth, T. J. (2008). Orai1 subunit stoichiometry of the mammalian CRAC channel pore. *J Physiol*, 586(2), 419-425. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.147249>
- Miki, H., Miura, K., & Takenawa, T. (1996). N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *Embo j*, 15(19), 5326-5335.
- Miki, H., Suetsugu, S., & Takenawa, T. (1998). WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *Embo j*, 17(23), 6932-6941. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.23.6932>
- Misumi, Y., Misumi, Y., Miki, K., Takatsuki, A., Tamura, G., & Ikehara, Y. (1986). Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem*, 261(24), 11398-11403.
- Mladinich, K. M., & Huttenlocher, A. (2013). WRAMPing up calcium in migrating cells by localized ER transport. *Dev Cell*, 26(6), 560-561. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.09.013>
- Moshfegh, Y., Bravo-Cordero, J. J., Miskolci, V., Condeelis, J., & Hodgson, L. (2014). A Trio-Rac1-Pak1 signalling axis drives invadopodia disassembly. *Nat Cell Biol*, 16(6), 574-586. <https://doi.org/10.1038/ncb2972>
- Motiani, R. K., Zhang, X., Harmon, K. E., Keller, R. S., Matrougui, K., Bennett, J. A., & Trebak, M. (2013). Orai3 is an estrogen receptor α -regulated Ca²⁺ channel that promotes tumorigenesis. *Faseb j*, 27(1), 63-75. <https://doi.org/10.1096/fj.12-213801>
- Mrkonjić, S., Garcia-Elias, A., Pardo-Pastor, C., Bazellières, E., Trepát, X., Vriens, J., Ghosh, D., Voets, T., Vicente, R., & Valverde, M. A. (2015). TRPV4 participates in the establishment of trailing adhesions and directional persistence of migrating cells. *Pflugers Arch*, 467(10), 2107-2119. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1679-8>
- Muik, M., Frischauf, I., Derler, I., Fahrner, M., Bergsmann, J., Eder, P., Schindl, R., Hesch, C., Polzinger, B., Fritsch, R., Kahr, H., Madl, J., Gruber, H., Groschner, K., & Romanin, C. (2008). Dynamic coupling of the putative coiled-coil domain of ORAI1 with STIM1 mediates ORAI1 channel activation. *J Biol Chem*, 283(12), 8014-8022. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708898200>
- Mullins, F. M., Park, C. Y., Dolmetsch, R. E., & Lewis, R. S. (2009). STIM1 and calmodulin interact with Orai1 to induce Ca²⁺-dependent inactivation of CRAC channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(36), 15495-15500. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906781106>
- Mullins, R. D., Heuser, J. A., & 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(11), 6181-6186. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6181>
- Mullins, R. D., Stafford, W. F., & Pollard, T. D. (1997). Structure, subunit topology, and actin-binding activity of the Arp2/3 complex from *Acanthamoeba*. *J Cell Biol*, 136(2), 331-343. <https://doi.org/10.1083/jcb.136.2.331>
- Nam, S., Kim, D., Cheng, J. Q., Zhang, S., Lee, J.-H., Buettner, R., Mirosevich, J., Lee, F. Y., & Jove, R. (2005). Action of the Src Family Kinase Inhibitor, Dasatinib (BMS-354825), on Human Prostate Cancer Cells. *Cancer Research*, 65(20), 9185-9189. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-05-1731>
- Nelson, W. J. (2009). Remodeling epithelial cell organization: transitions between front-rear and apical-basal polarity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1(1), a000513. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000513>
- Niemeyer, B. A. (2016). Changing calcium: CRAC channel (STIM and Orai) expression, splicing, and posttranslational modifiers. *Am J Physiol Cell Physiol*, 310(9), C701-709. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00034.2016>
- Niemeyer, B. A. (2017). The STIM-Orai Pathway: Regulation of STIM and Orai by Thiol Modifications. *Adv Exp Med Biol*, 993, 99-116. https://doi.org/10.1007/978-3-319-57732-6_6
- Nobes, C. D., & Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, 81(1), 53-62. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90370-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90370-4)
- North, R. A., & Barnard, E. A. (1997). Nucleotide receptors. *Curr Opin Neurobiol*, 7(3), 346-357. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(97\)80062-1](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(97)80062-1)
- Nunes, P., & Demaurex, N. (2014). Redox regulation of store-operated Ca²⁺ entry. *Antioxid Redox Signal*, 21(6), 915-932. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5615>
- Olofsson, B. (1999). Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal*, 11(8), 545-554. [https://doi.org/10.1016/s0898-6568\(98\)00063-1](https://doi.org/10.1016/s0898-6568(98)00063-1)
- Pantaloni, D., Boujemaa, R., Didry, D., Gounon, P., & Carlier, M. F. (2000). The Arp2/3 complex branches filament barbed ends: functional antagonism with capping proteins. *Nat Cell Biol*, 2(7), 385-391. <https://doi.org/10.1038/35017011>
- Parada, L. F., Tabin, C. J., Shih, C., & Weinberg, R. A. (1982). Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature*, 297(5866), 474-478. <https://doi.org/10.1038/297474a0>
- Parekh, A. B., & Putney, J. W., Jr. (2005). Store-operated calcium channels. *Physiol Rev*, 85(2), 757-810. <https://doi.org/10.1152/physrev.00057.2003>
- Park, C. Y., Hoover, P. J., Mullins, F. M., Bachhawat, P., Covington, E. D., Raunser, S., Walz, T., Garcia, K. C., Dolmetsch, R. E., & Lewis, R. S. (2009). STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell*, 136(5), 876-890. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.014>
- Parsons, J. T. (2003). Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci*, 116(Pt 8), 1409-1416. <https://doi.org/10.1242/jcs.00373>
- Pasapera, A. M., Plotnikov, S. V., Fischer, R. S., Case, L. B., Egelhoff, T. T., & Waterman, C. M. (2015). Rac1-dependent phosphorylation and focal adhesion recruitment of myosin IIA regulates migration and mechanosensing. *Curr Biol*, 25(2), 175-186. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.11.043>

Bibliografía

- Patel, A. S., Schechter, G. L., Wasilenko, W. J., & Somers, K. D. (1998). Overexpression of EMS1/cortactin in NIH3T3 fibroblasts causes increased cell motility and invasion in vitro. *Oncogene*, *16*(25), 3227-3232. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201850>
- Paterson, E. K., & Courtneidge, S. A. (2018). Invadosomes are coming: new insights into function and disease relevance. *Febs j*, *285*(1), 8-27. <https://doi.org/10.1111/febs.14123>
- Paterson, E. K., & Courtneidge, S. A. (2018). Invadosomes are coming: new insights into function and disease relevance. *The FEBS Journal*, *285*(1), 8-27. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/febs.14123>
- Penna, A., Demuro, A., Yeromin, A. V., Zhang, S. L., Safrina, O., Parker, I., & Cahalan, M. D. (2008). The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers. *Nature*, *456*(7218), 116-120. <https://doi.org/10.1038/nature07338>
- Perrin, B. J., Amann, K. J., & Huttenlocher, A. (2006). Proteolysis of cortactin by calpain regulates membrane protrusion during cell migration. *Mol Biol Cell*, *17*(1), 239-250. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-06-0488>
- Petrie, R. J., Doyle, A. D., & Yamada, K. M. (2009). Random versus directionally persistent cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *10*(8), 538-549. <https://doi.org/10.1038/nrm2729>
- Petrie, R. J., & Yamada, K. M. (2012). At the leading edge of three-dimensional cell migration. *J Cell Sci*, *125*(Pt 24), 5917-5926. <https://doi.org/10.1242/jcs.093732>
- Pettit, E. J., & Fay, F. S. (1998). Cytosolic free calcium and the cytoskeleton in the control of leukocyte chemotaxis. *Physiol Rev*, *78*(4), 949-967. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.4.949>
- Philippart, U., Roussos, E. T., Oser, M., Yamaguchi, H., Kim, H. D., Giampieri, S., Wang, Y., Goswami, S., Wyckoff, J. B., Lauffenburger, D. A., Sahai, E., Condeelis, J. S., & Gertler, F. B. (2008). A Mena invasion isoform potentiates EGF-induced carcinoma cell invasion and metastasis. *Dev Cell*, *15*(6), 813-828. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.09.003>
- Pisanti, S., Rimondi, E., Pozza, E., Melloni, E., Zauli, E., Bifulco, M., Martinelli, R., & Marcuzzi, A. (2022). Prenylation Defects and Oxidative Stress Trigger the Main Consequences of Neuroinflammation Linked to Mevalonate Pathway Deregulation. *Int J Environ Res Public Health*, *19*(15). <https://doi.org/10.3390/ijerph19159061>
- Pozo-Guisado, E., Campbell, D. G., Deak, M., Alvarez-Barrientos, A., Morrice, N. A., Alvarez, I. S., Alessi, D. R., & Martín-Romero, F. J. (2010). Phosphorylation of STIM1 at ERK1/2 target sites modulates store-operated calcium entry. *J Cell Sci*, *123*(Pt 18), 3084-3093. <https://doi.org/10.1242/jcs.067215>
- Pozo-Guisado, E., Casas-Rua, V., Tomas-Martin, P., Lopez-Guerrero, A. M., Alvarez-Barrientos, A., & Martín-Romero, F. J. (2013). Phosphorylation of STIM1 at ERK1/2 target sites regulates interaction with the microtubule plus-end binding protein EB1. *J Cell Sci*, *126*(Pt 14), 3170-3180. <https://doi.org/10.1242/jcs.125054>
- Prakriya, M., Feske, S., Gwack, Y., Srikanth, S., Rao, A., & Hogan, P. G. (2006). Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature*, *443*(7108), 230-233. <https://doi.org/10.1038/nature05122>

- Prakriya, M., & Lewis, R. S. (2015). Store-Operated Calcium Channels. *Physiol Rev*, 95(4), 1383-1436. <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2014>
- Preston, S. F., Sha'afi, R. I., & Berlin, R. D. (1991). Regulation of Ca²⁺ influx during mitosis: Ca²⁺ influx and depletion of intracellular Ca²⁺ stores are coupled in interphase but not mitosis. *Cell Regul*, 2(11), 915-925. <https://doi.org/10.1091/mbc.2.11.915>
- Prevarskaya, N., Ouadid-Ahidouch, H., Skryma, R., & Shuba, Y. (2014). Remodelling of Ca²⁺ transport in cancer: how it contributes to cancer hallmarks? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 369(1638), 20130097. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0097>
- Price, L. S., Leng, J., Schwartz, M. A., & Bokoch, G. M. (1998). Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading. *Mol Biol Cell*, 9(7), 1863-1871. <https://doi.org/10.1091/mbc.9.7.1863>
- Prior, I. A., Hood, F. E., & Hartley, J. L. (2020). The Frequency of Ras Mutations in Cancer. *Cancer Res*, 80(14), 2969-2974. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-19-3682>
- Pruyne, D., Evangelista, M., Yang, C., Bi, E., Zigmund, S., Bretscher, A., & Boone, C. (2002). Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science*, 297(5581), 612-615. <https://doi.org/10.1126/science.1072309>
- Putney, J. W. (2009). Capacitative calcium entry: from concept to molecules. *Immunol Rev*, 231(1), 10-22. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00810.x>
- Putney, J. W., Jr. (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*, 7(1), 1-12. [https://doi.org/10.1016/0143-4160\(86\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0143-4160(86)90026-6)
- Quinlan, M. E., Heuser, J. E., Kerkhoff, E., & Mullins, R. D. (2005). Drosophila Spire is an actin nucleation factor. *Nature*, 433(7024), 382-388. <https://doi.org/10.1038/nature03241>
- Quinlan, M. E., & Kerkhoff, E. (2008). Actin nucleation: bacteria get in-Spired. *Nat Cell Biol*, 10(1), 13-15. <https://doi.org/10.1038/ncb0108-13>
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Lin, C. Y., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Trevino, A. E., Scott, D. A., Inoue, A., Matoba, S., Zhang, Y., & Zhang, F. (2013). Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 154(6), 1380-1389. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.021>
- Reig, G., Pulgar, E., & Concha, M. L. (2014). Cell migration: from tissue culture to embryos. *Development*, 141(10), 1999-2013. <https://doi.org/10.1242/dev.101451>
- Ren, X. D., Kiosses, W. B., & Schwartz, M. A. (1999). Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *Embo j*, 18(3), 578-585. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.3.578>
- Ridley, A. J. (2001). Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol*, 11(12), 471-477. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(01\)02153-5](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(01)02153-5)
- Ridley, A. J., & Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, 70(3), 389-399. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90163-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90163-7)
- Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D., & Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*, 70(3), 401-410. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90164-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90164-8)

Bibliografía

- Robinson, R. C., Turbedsky, K., Kaiser, D. A., Marchand, J. B., Higgs, H. N., Choe, S., & Pollard, T. D. (2001). Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science*, *294*(5547), 1679-1684. <https://doi.org/10.1126/science.1066333>
- 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., Velichebi, G., & Stauderman, K. A. (2005). STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *J Cell Biol*, *169*(3), 435-445. <https://doi.org/10.1083/jcb.200502019>
- Rottner, K., Behrendt, B., Small, J. V., & Wehland, J. (1999). VASP dynamics during lamellipodia protrusion. *Nat Cell Biol*, *1*(5), 321-322. <https://doi.org/10.1038/13040>
- Sabeh, F., Shimizu-Hirota, R., & Weiss, S. J. (2009). Protease-dependent versus -independent cancer cell invasion programs: three-dimensional amoeboid movement revisited. *J Cell Biol*, *185*(1), 11-19. <https://doi.org/10.1083/jcb.200807195>
- Santos, E., Tronick, S. R., Aaronson, S. A., Pulciani, S., & Barbacid, M. (1982). T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB- and Harvey-MSV transforming genes. *Nature*, *298*(5872), 343-347. <https://doi.org/10.1038/298343a0>
- Schaff, U. Y., Dixit, N., Procyk, E., Yamayoshi, I., Tse, T., & Simon, S. I. (2010). Orai1 regulates intracellular calcium, arrest, and shape polarization during neutrophil recruitment in shear flow. *Blood*, *115*(3), 657-666. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-05-224659>
- Schoenwaelder, S. M., & Burridge, K. (1999). Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Opin Cell Biol*, *11*(2), 274-286. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(99\)80037-4](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(99)80037-4)
- 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*(1), 83-96. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)00562-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)00562-7)
- Schuuring, E., Verhoeven, E., Litvinov, S., & Michalides, R. J. (1993). The product of the EMS1 gene, amplified and overexpressed in human carcinomas, is homologous to a v-src substrate and is located in cell-substratum contact sites. *Mol Cell Biol*, *13*(5), 2891-2898. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.5.2891-2898.1993>
- Schuuring, E., Verhoeven, E., Mooi, W. J., & Michalides, R. J. (1992). Identification and cloning of two overexpressed genes, U21B31/PRAD1 and EMS1, within the amplified chromosome 11q13 region in human carcinomas. *Oncogene*, *7*(2), 355-361.
- Selbach, M., & Backert, S. (2005). Cortactin: an Achilles' heel of the actin cytoskeleton targeted by pathogens. *Trends Microbiol*, *13*(4), 181-189. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.02.007>
- Sharafutdinov, I., Backert, S., & Tegtmeyer, N. (2020). Cortactin: A Major Cellular Target of the Gastric Carcinogen Helicobacter pylori. *Cancers (Basel)*, *12*(1). <https://doi.org/10.3390/cancers12010159>
- Sharma, A., & Mayer, B. J. (2008). Phosphorylation of p130Cas initiates Rac activation and membrane ruffling. *BMC Cell Biol*, *9*, 50. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-9-50>

- Shuttleworth, T. J. (1996). Arachidonic acid activates the noncapacitative entry of Ca²⁺ during [Ca²⁺]_i oscillations. *J Biol Chem*, 271(36), 21720-21725. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.36.21720>
- Small, J. V., Stradal, T., Vignal, E., & Rottner, K. (2002). The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol*, 12(3), 112-120. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(01\)02237-1](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(01)02237-1)
- Smyth, J. T., Hwang, S. Y., Tomita, T., DeHaven, W. I., Mercer, J. C., & Putney, J. W. (2010). Activation and regulation of store-operated calcium entry. *J Cell Mol Med*, 14(10), 2337-2349. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01168.x>
- Soboloff, J., Rothberg, B. S., Madesh, M., & Gill, D. L. (2012). STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(9), 549-565. <https://doi.org/10.1038/nrm3414>
- Soboloff, J., Spassova, M. A., Tang, X. D., Hewavitharana, T., Xu, W., & Gill, D. L. (2006). Orai1 and STIM reconstitute store-operated calcium channel function. *J Biol Chem*, 281(30), 20661-20665. <https://doi.org/10.1074/jbc.C600126200>
- Sossey-Alaoui, K., Li, X., & Cowell, J. K. (2007). c-Abl-mediated phosphorylation of WAVE3 is required for lamellipodia formation and cell migration. *J Biol Chem*, 282(36), 26257-26265. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701484200>
- Srikanth, S., Jung, H. J., Kim, K. D., Souda, P., Whitelegge, J., & 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(5), 436-446. <https://doi.org/10.1038/ncb2045>
- Stanzione, R., Forte, M., Cotugno, M., Bianchi, F., Marchitti, S., & Rubattu, S. (2022). Relevance of stromal interaction molecule 1 (STIM1) in experimental and human stroke. *Pflugers Arch*, 474(1), 141-153. <https://doi.org/10.1007/s00424-021-02636-w>
- Stock, K., Borriek, R., Mikesch, J.-H., Hansmeier, A., Rehkämper, J., Trautmann, M., Wardelmann, E., Hartmann, W., Sperveslage, J., & Steinestel, K. (2019). Overexpression and Tyr421-phosphorylation of cortactin is induced by three-dimensional spheroid culturing and contributes to migration and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) cells. *Cancer Cell International*, 19(1), 77. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0798-x>
- Streb, H., Irvine, R. F., Berridge, M. J., & Schulz, I. (1983). Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature*, 306(5938), 67-69. <https://doi.org/10.1038/306067a0>
- Stuart, J. R., Gonzalez, F. H., Kawai, H., & Yuan, Z. M. (2006). c-Abl interacts with the WAVE2 signaling complex to induce membrane ruffling and cell spreading. *J Biol Chem*, 281(42), 31290-31297. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602389200>
- Suetsugu, S., Miki, H., & Takenawa, T. (1999). Identification of two human WAVE/SCAR homologues as general actin regulatory molecules which associate with the Arp2/3 complex. *Biochem Biophys Res Commun*, 260(1), 296-302. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0894>
- Suetsugu, S., Yamazaki, D., Kurisu, S., & Takenawa, T. (2003). Differential roles of WAVE1 and WAVE2 in dorsal and peripheral ruffle formation for fibroblast cell migration. *Dev Cell*, 5(4), 595-609. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(03\)00297-1](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(03)00297-1)

Bibliografía

- Sun, H. Q., Yamamoto, M., Mejillano, M., & Yin, H. L. (1999). Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein. *J Biol Chem*, 274(47), 33179-33182. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.47.33179>
- Sun, J., Lu, F., He, H., Shen, J., Messina, J., Mathew, R., Wang, D., Sarnaik, A. A., Chang, W. C., Kim, M., Cheng, H., & Yang, S. (2014). STIM1- and Orai1-mediated Ca²⁺ oscillation orchestrates invadopodium formation and melanoma invasion. *J Cell Biol*, 207(4), 535-548. <https://doi.org/10.1083/jcb.201407082>
- Symons, M., Derry, J. M., Karlak, B., Jiang, S., Lemahieu, V., McCormick, F., Francke, U., & Abo, A. (1996). Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell*, 84(5), 723-734. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81050-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81050-8)
- Taberner, F. J., Fernández-Ballester, G., Fernández-Carvajal, A., & Ferrer-Montiel, A. (2015). TRP channels interaction with lipids and its implications in disease. *Biochim Biophys Acta*, 1848(9), 1818-1827. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2015.03.022>
- Takai, Y., Sasaki, T., & Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*, 81(1), 153-208. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.1.153>
- Takenawa, T., & Miki, H. (2001). WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J Cell Sci*, 114(Pt 10), 1801-1809. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.10.1801>
- Takenawa, T., & Suetsugu, S. (2007). The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(1), 37-48. <https://doi.org/10.1038/nrm2069>
- Tani, D., Monteilh-Zoller, M. K., Fleig, A., & Penner, R. (2007). Cell cycle-dependent regulation of store-operated I(CRAC) and Mg²⁺-nucleotide-regulated MagNum (TRPM7) currents. *Cell Calcium*, 41(3), 249-260. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2006.07.004>
- Tehrani, S., Tomasevic, N., Weed, S., Sakowicz, R., & Cooper, J. A. (2007). Src phosphorylation of cortactin enhances actin assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(29), 11933-11938. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701077104>
- Thastrup, O., Cullen, P. J., Drøbak, B. K., Hanley, M. R., & Dawson, A. P. (1990). Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(7), 2466-2470. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.7.2466>
- Thomas, A. P. & Delaville, F. (1991). The use of fluorescent indicators for measurements of cytosolic-free calcium concentration in cell population and single cells. *Cellular calcium*, (eds J. G. McCormack and P. H. Cobbold), pp. 1-54. Oxford, UK: IRL Press.
- Thompson, J. L., Mignen, O., & Shuttleworth, T. J. (2009). The Orai1 severe combined immune deficiency mutation and calcium release-activated Ca²⁺ channel function in the heterozygous condition. *J Biol Chem*, 284(11), 6620-6626. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808346200>
- Tilghman, R. W., & Hoover, R. L. (2002). The Src-cortactin pathway is required for clustering of E-selectin and ICAM-1 in endothelial cells. *Faseb j*, 16(10), 1257-1259. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0969fje>
- Timpson, P., Jones, G. E., Frame, M. C., & Brunton, V. G. (2001). Coordination of cell polarization and migration by the Rho family GTPases requires Src tyrosine

- kinase activity. *Curr Biol*, 11(23), 1836-1846. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(01\)00583-8](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00583-8)
- Timpson, P., Lynch, D. K., Schramek, D., Walker, F., & Daly, R. J. (2005). Cortactin overexpression inhibits ligand-induced down-regulation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res*, 65(8), 3273-3280. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-04-2118>
- Tsai, F. C., Seki, A., Yang, H. W., Hayer, A., Carrasco, S., Malmersjö, S., & Meyer, T. (2014). A polarized Ca²⁺, diacylglycerol and STIM1 signalling system regulates directed cell migration. *Nat Cell Biol*, 16(2), 133-144. <https://doi.org/10.1038/ncb2906>
- Ubersax, J. A., & Ferrell, J. E., Jr. (2007). Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(7), 530-541. <https://doi.org/10.1038/nrm2203>
- Uruno, T., Liu, J., Zhang, P., Fan, Y., Egile, C., Li, R., Mueller, S. C., & Zhan, X. (2001). Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin. *Nat Cell Biol*, 3(3), 259-266. <https://doi.org/10.1038/35060051>
- Van Aelst, L., & D'Souza-Schorey, C. (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev*, 11(18), 2295-2322. <https://doi.org/10.1101/gad.11.18.2295>
- Van Baelen, K., Dode, L., Vanoevelen, J., Callewaert, G., De Smedt, H., Missiaen, L., Parys, J. B., Raeymaekers, L., & Wuytack, F. (2004). The Ca²⁺/Mn²⁺ pumps in the Golgi apparatus. *Biochim Biophys Acta*, 1742(1-3), 103-112. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.08.018>
- van der Zwaag, B., Staal, W. G., Hochstenbach, R., Poot, M., Spierenburg, H. A., de Jonge, M. V., Verbeek, N. E., van 't Slot, R., van Es, M. A., Staal, F. J., Freitag, C. M., Buizer-Voskamp, J. E., Nelen, M. R., van den Berg, L. H., van Amstel, H. K., van Engeland, H., & Burbach, J. P. (2010). A co-segregating microduplication of chromosome 15q11.2 pinpoints two risk genes for autism spectrum disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 153b(4), 960-966. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.31055>
- Van Haastert, P. J., & Devreotes, P. N. (2004). Chemotaxis: signalling the way forward. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(8), 626-634. <https://doi.org/10.1038/nrm1435>
- van Leeuwen, F. N., van der Kammen, R. A., Habets, G. G., & Collard, J. G. (1995). Oncogenic activity of Tiam1 and Rac1 in NIH3T3 cells. *Oncogene*, 11(11), 2215-2221.
- van Rossum, A. G., de Graaf, J. H., Schuurings-Scholtes, E., Kluin, P. M., Fan, Y. X., Zhan, X., Moolenaar, W. H., & Schuurings, E. (2003). Alternative splicing of the actin binding domain of human cortactin affects cell migration. *J Biol Chem*, 278(46), 45672-45679. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306688200>
- Vashisht, A., Trebak, M., & Motiani, R. K. (2015). STIM and Orai proteins as novel targets for cancer therapy. A Review in the Theme: Cell and Molecular Processes in Cancer Metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 309(7), C457-469. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00064.2015>
- Vetter, I. R., & Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*, 294(5545), 1299-1304. <https://doi.org/10.1126/science.1062023>
- Vial, C., Roberts, J. A., & Evans, R. J. (2004). Molecular properties of ATP-gated P2X receptor ion channels. *Trends Pharmacol Sci*, 25(9), 487-493. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.07.008>

Bibliografía

- Vidal, C., Geny, B., Melle, J., Jandrot-Perrus, M., & Fontenay-Roupie, M. (2002). Cdc42/Rac1-dependent activation of the p21-activated kinase (PAK) regulates human platelet lamellipodia spreading: implication of the cortical-actin binding protein cortactin. *Blood*, *100*(13), 4462-4469. <https://doi.org/10.1182/blood.V100.13.4462>
- Vig, M., Beck, A., Billingsley, J. M., Lis, A., Parvez, S., Peinelt, C., Koomoa, D. L., Soboloff, J., Gill, D. L., Fleig, A., Kinet, J. P., & Penner, R. (2006). CRACM1 multimers form the ion-selective pore of the CRAC channel. *Curr Biol*, *16*(20), 2073-2079. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.08.085>
- Vig, M., Peinelt, C., Beck, A., Koomoa, D. L., Rabah, D., Koblan-Huberson, M., Kraft, S., Turner, H., Fleig, A., Penner, R., & Kinet, J. P. (2006). CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca²⁺ entry. *Science*, *312*(5777), 1220-1223. <https://doi.org/10.1126/science.1127883>
- Wang, G. C., Hsieh, P. S., Hsu, H. H., Sun, G. H., Nieh, S., Yu, C. P., & Jin, J. S. (2009). Expression of cortactin and survivin in renal cell carcinoma associated with tumor aggressiveness. *World J Urol*, *27*(4), 557-563. <https://doi.org/10.1007/s00345-009-0376-2>
- Wang, W., Goswami, S., Lapidus, K., Wells, A. L., Wyckoff, J. B., Sahai, E., Singer, R. H., Segall, J. E., & Condeelis, J. S. (2004). Identification and testing of a gene expression signature of invasive carcinoma cells within primary mammary tumors. *Cancer Res*, *64*(23), 8585-8594. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-04-1136>
- Wang, Y., & McNiven, M. A. (2012). Invasive matrix degradation at focal adhesions occurs via protease recruitment by a FAK-p130Cas complex. *J Cell Biol*, *196*(3), 375-385. <https://doi.org/10.1083/jcb.201105153>
- Watanabe, H., Davis, J. B., Smart, D., Jerman, J. C., Smith, G. D., Hayes, P., Vriens, J., Cairns, W., Wissenbach, U., Prenen, J., Flockerzi, V., Droogmans, G., Benham, C. D., & Nilius, B. (2002). Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol derivatives. *J Biol Chem*, *277*(16), 13569-13577. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200062200>
- Watanabe, N., Kato, T., Fujita, A., Ishizaki, T., & Narumiya, S. (1999). Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat Cell Biol*, *1*(3), 136-143. <https://doi.org/10.1038/11056>
- Weaver, A. M., Heuser, J. E., Karginov, A. V., Lee, W. L., Parsons, J. T., & Cooper, J. A. (2002). Interaction of cortactin and N-WASp with Arp2/3 complex. *Curr Biol*, *12*(15), 1270-1278. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)01035-7](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)01035-7)
- Weaver, A. M., Karginov, A. V., Kinley, A. W., Weed, S. A., Li, Y., Parsons, J. T., & Cooper, J. A. (2001). Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. *Curr Biol*, *11*(5), 370-374. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(01\)00098-7](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00098-7)
- Webb, B. A., Zhou, S., Eves, R., Shen, L., Jia, L., & Mak, A. S. (2006). Phosphorylation of cortactin by p21-activated kinase. *Arch Biochem Biophys*, *456*(2), 183-193. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2006.06.011>
- Weed, S. A., Du, Y., & Parsons, J. T. (1998). Translocation of cortactin to the cell periphery is mediated by the small GTPase Rac1. *J Cell Sci*, *111* (Pt 16), 2433-2443. <https://doi.org/10.1242/jcs.111.16.2433>

- Weed, S. A., Karginov, A. V., Schafer, D. A., Weaver, A. M., Kinley, A. W., Cooper, J. A., & Parsons, J. T. (2000). Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex. *J Cell Biol*, *151*(1), 29-40. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.1.29>
- Wei, C., Wang, X., Chen, M., Ouyang, K., Song, L. S., & Cheng, H. (2009). Calcium flickers steer cell migration. *Nature*, *457*(7231), 901-905. <https://doi.org/10.1038/nature07577>
- Weis, K. (2003). Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell*, *112*(4), 441-451. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00082-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00082-5)
- Welch, M. D., DePace, A. H., Verma, S., Iwamatsu, A., & Mitchison, T. J. (1997). The human Arp2/3 complex is composed of evolutionarily conserved subunits and is localized to cellular regions of dynamic actin filament assembly. *J Cell Biol*, *138*(2), 375-384. <https://doi.org/10.1083/jcb.138.2.375>
- Welch, M. D., Iwamatsu, A., & Mitchison, T. J. (1997). Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature*, *385*(6613), 265-269. <https://doi.org/10.1038/385265a0>
- Welch, M. D., Rosenblatt, J., Skoble, J., Portnoy, D. A., & Mitchison, T. J. (1998). Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science*, *281*(5373), 105-108. <https://doi.org/10.1126/science.281.5373.105>
- Welch, M. D., & Way, M. (2013). Arp2/3-mediated actin-based motility: a tail of pathogen abuse. *Cell Host Microbe*, *14*(3), 242-255. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.08.011>
- Witke, W., Sharpe, A. H., Hartwig, J. H., Azuma, T., Stossel, T. P., & Kwiatkowski, D. J. (1995). Hemostatic, inflammatory, and fibroblast responses are blunted in mice lacking gelsolin. *Cell*, *81*(1), 41-51. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90369-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90369-0)
- Wu, H., & 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*(6), 1417-1426. <https://doi.org/10.1083/jcb.120.6.1417>
- Wu, H., Reynolds, A. B., Kanner, S. B., Vines, R. R., & Parsons, J. T. (1991). Identification and characterization of a novel cytoskeleton-associated pp60src substrate. *Mol Cell Biol*, *11*(10), 5113-5124. <https://doi.org/10.1128/mcb.11.10.5113-5124.1991>
- Wu, M. M., Buchanan, J., Luik, R. M., & Lewis, R. S. (2006). Ca²⁺ store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *J Cell Biol*, *174*(6), 803-813. <https://doi.org/10.1083/jcb.200604014>
- Xue, C., Wyckoff, J., Liang, F., Sidani, M., Violini, S., Tsai, K. L., Zhang, Z. Y., Sahai, E., Condeelis, J., & Segall, J. E. (2006). Epidermal growth factor receptor overexpression results in increased tumor cell motility in vivo coordinately with enhanced intravasation and metastasis. *Cancer Res*, *66*(1), 192-197. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-05-1242>
- Yamazaki, D., Suetsugu, S., Miki, H., Kataoka, Y., Nishikawa, S., Fujiwara, T., Yoshida, N., & Takenawa, T. (2003). WAVE2 is required for directed cell migration and cardiovascular development. *Nature*, *424*(6947), 452-456. <https://doi.org/10.1038/nature01770>

Bibliografía

- Yan, C., Martinez-Quiles, N., Eden, S., Shibata, T., Takeshima, F., Shinkura, R., Fujiwara, Y., Bronson, R., Snapper, S. B., Kirschner, M. W., Geha, R., Rosen, F. S., & Alt, F. W. (2003). WAVE2 deficiency reveals distinct roles in embryogenesis and Rac-mediated actin-based motility. *Embo j*, 22(14), 3602-3612. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg350>
- Yang, S., & Huang, X. Y. (2005). Ca²⁺ influx through L-type Ca²⁺ channels controls the trailing tail contraction in growth factor-induced fibroblast cell migration. *J Biol Chem*, 280(29), 27130-27137. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501625200>
- Yang, S., Zhang, J. J., & Huang, X. Y. (2009). Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis. *Cancer Cell*, 15(2), 124-134. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.12.019>
- Yáñez, M., Gil-Longo, J., & Campos-Toimil, M. (2012). Calcium binding proteins. *Adv Exp Med Biol*, 740, 461-482. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2_19
- Yasmeen, A., Bismar, T. A., & Al Moustafa, A. E. (2006). ErbB receptors and epithelial-cadherin-catenin complex in human carcinomas. *Future Oncol*, 2(6), 765-781. <https://doi.org/10.2217/14796694.2.6.765>
- Yeromin, A. V., Zhang, S. L., Jiang, W., Yu, Y., Safrina, O., & Cahalan, M. D. (2006). Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature*, 443(7108), 226-229. <https://doi.org/10.1038/nature05108>
- Yu, F., Sun, L., & Machaca, K. (2010). Constitutive recycling of the store-operated Ca²⁺ channel Orai1 and its internalization during meiosis. *J Cell Biol*, 191(3), 523-535. <https://doi.org/10.1083/jcb.201006022>
- Yuan, B. Z., Zhou, X., Zimonjic, D. B., Durkin, M. E., & Popescu, N. C. (2003). Amplification and overexpression of the EMS 1 oncogene, a possible prognostic marker, in human hepatocellular carcinoma. *J Mol Diagn*, 5(1), 48-53. [https://doi.org/10.1016/s1525-1578\(10\)60451-5](https://doi.org/10.1016/s1525-1578(10)60451-5)
- Yuan, J. P., Lee, K. P., Hong, J. H., & Muallem, S. (2012). The closing and opening of TRPC channels by Homer1 and STIM1. *Acta Physiol (Oxf)*, 204(2), 238-247. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2011.02319.x>
- Yuan, J. P., Zeng, W., Dorwart, M. R., Choi, Y. J., Worley, P. F., & Muallem, S. (2009). SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels. *Nat Cell Biol*, 11(3), 337-343. <https://doi.org/10.1038/ncb1842>
- Zerial, M., & McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(2), 107-117. <https://doi.org/10.1038/35052055>
- Zhang, S. L., Kozak, J. A., Jiang, W., Yeromin, A. V., Chen, J., Yu, Y., Penna, A., Shen, W., Chi, V., & 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(25), 17662-17671. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801536200>
- Zhang, S. L., Yeromin, A. V., Zhang, X. H., Yu, Y., Safrina, O., Penna, A., Roos, J., Stauderman, K. A., & Cahalan, M. D. (2006). Genome-wide RNAi screen of Ca(2+) influx identifies genes that regulate Ca(2+) release-activated Ca(2+) channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(24), 9357-9362. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603161103>
- Zhang, X., Pathak, T., Yoast, R., Emrich, S., Xin, P., Nwokonko, R. M., Johnson, M., Wu, S., Delierneux, C., Gueguinou, M., Hempel, N., Putney, J. W., Jr., Gill, D. L., & Trebak,

- M. (2019). A calcium/cAMP signaling loop at the ORAI1 mouth drives channel inactivation to shape NFAT induction. *Nat Commun*, 10(1), 1971. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09593-0>
- Zhuge, Y., & Xu, J. (2001). Rac1 mediates type I collagen-dependent MMP-2 activation. role in cell invasion across collagen barrier. *J Biol Chem*, 276(19), 16248-16256. <https://doi.org/10.1074/jbc.m010190200>
- Zuchero, J. B., Coutts, A. S., Quinlan, M. E., Thangue, N. B., & Mullins, R. D. (2009). p53-cofactor JMY is a multifunctional actin nucleation factor. *Nat Cell Biol*, 11(4), 451-459. <https://doi.org/10.1038/ncb1852>

ANEXO I. Relación de construcciones empleadas en este estudio.

Construcción	Proteína	Especie	RefSeq (o ENSEMBL)	Plásmido parental	Enzimas de restricción
pEGFP-Empty	-	-	-	pEGFP-N1	-
pmCherry-CTTN (Addgene #27676)	mCherry-CTTN	<i>Mus musculus</i>	NM_001252572.2	pmCherry-C1	-
pcDNA5D FRT/TO FLAG RAC1 Q2-L192(end) (DU17293)	Flag-RAC1-WT	<i>Homo sapiens</i>	NM_006908.5	pcDNA5FRT/TO	
pcDNA5FRT/TO FLAG RAC1 G12V (DU17294)	Flag-RAC1-G12V	<i>Homo sapiens</i>	NM_006908.5	pcDNA5FRT/TO	
pcDNA5 FRT/TO FLAG RAC1 T17N	Flag-RAC1-T17N	<i>Homo sapiens</i>	NM_006908.5	pcDNA5FRT/TO	
pcDNA3-EGFP-RAC1(wt) (Addgene #13719)	EGFP-RAC1-WT	<i>Homo sapiens</i>	NM_006908.5	pcDNA3	HindIII/ XhoI
pcDNA3-EGFP-RAC1(Q61L) (Addgene #13720)	EGFP-RAC1-Q61L	<i>Homo sapiens</i>	NM_006908.5	pcDNA3	HindIII/ XhoI
pmCherry-RAC1(G12V)	mCherry-RAC1- G12V	<i>Homo sapiens</i>	NM_006908.5		
CSCW-Gluc-YFP	Gluc-YFP	<i>Gaussia princeps</i>			
Orai1-KO (sense)	-	<i>Homo sapiens</i>	ENSG00000276045	pBABED P U6	-
Orai1-KO (antisense)	-	<i>Homo sapiens</i>	ENSG00000276045	pX335	-
pcDNA5FRT/TO-Orai1-GFP (#FJMR-025)	Orai1-WT-GFP	<i>Homo sapiens</i>	NM_032790.3	pcDNA5FRT/TO	
pcDNA5FRT/TO-Orai1- T295A/S298A-GFP (#FJMR-152)	Orai1-295A/S298A- GFP	<i>Homo sapiens</i>	NM_032790.3	pcDNA5FRT/TO	
pBABED-Flag-Orai1 (#FJMR-264)	Flag-Orai1-WT	<i>Homo sapiens</i>	NM_032790.3	pBABED-Hygro (Addgene #37127)	EcoRI/NotI
pBABED-Flag-Orai1-T295A/S298A (#FJMR-258)	Flag-Orai1- T295A/S298A	<i>Homo sapiens</i>	NM_032790.3	pBABED-Hygro (Addgene #37127)	EcoRI/NotI
pBABED-Flag-Orai1-T295E/S298E (#FJMR-259)	Flag-Orai1- T295E/S298E	<i>Homo sapiens</i>	NM_032790.3	pBABED-Hygro (Addgene #37127)	EcoRI/NotI

pBABED-Flag-Orai1-Y300F (#FJMR-257)	Flag-Orai1-Y300F	<i>Homo sapiens</i>	NM_032790.3	pBABED-Hygro (Addgene #37127)	EcoRI/NotI
pBABED-Flag-Orai1-Y300E (#FJMR-256)	Flag-Orai1-Y300E	<i>Homo sapiens</i>	NM_032790.3	pBABED-Hygro (Addgene #37127)	EcoRI/NotI
pcDNA5FRT/TO-Flag-Orai1 (#FJMR-024)	Flag-Orai1-WT	<i>Homo sapiens</i>	NM_032790.3	pcDNA5FRT/TO	
pCMV-Flag-Orai1-V102C (#FJMR-047)	Flag-Orai1-V102C	<i>Homo sapiens</i>	NM_032790.3	pCMV	
pCMV-Flag-Orai1-E106A (#FJMR048)	Flag-Orai1-E106A	<i>Homo sapiens</i>	NM_032790.3	pCMV	