UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

TESIS DOCTORAL

MODULACIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN CELULAR POR FOSFORILACIÓN DE STIM1: IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS

VANESSA CASAS RUA

Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética

Conformidad de los Directores:

Fdo.: Dr. Francisco Javier Martín Romero

Fdo.: Dra. Eulalia Pozo Guisado

Fdo.: Dr. Ignacio Santiago Álvarez Miguel

2016

Departamento de Bioquímica
Biología Molecular y Genética
Área de Bioquímica
Facultad de Ciencias
06006 BADAJOZ

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

CERTIFICAN que:

La presente Tesis Doctoral, titulada**: "Modulación de la señalización celular por fosforilación de STIM1: Implicaciones fisiológicas"** presentado por **Doña Vanessa Casas Rua,** ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética de la Universidad de Extremadura.

Y para que así conste, expedimos y firmamos la presente certificación en Badajoz, a 23 de mayo de 2016.

Fdo.: Dr. Francisco Javier Martín Romero Fdo.: Dra. Eulalia Pozo Guisado

Fdo.: Dr. Ignacio Santiago Álvarez Miguel

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

- Pozo-Guisado, E; **Casas-Rua, V**; Tomas-Martin, P; Lopez-Guerrero, AM; Alvarez-Barrientos, A; Martin-Romero, FJ. **PHOSPHORYLATION OF STIM1 AT ERK1/2 TARGET SITES REGULATES INTERACTION WITH THE MICROTUBULE PLUS-END BINDING PROTEIN EB1.** J Cell Sci 2013; 126 (14): 3170-3180.

- **Casas-Rua, V**; Alvarez, IS; Pozo-Guisado, E; Martin-Romero, FJ. **INHIBITION OF STIM1 PHOSPHORYLATION UNDERLIES RESVERATROL-INDUCED INHIBITION OF STORE-OPERATED CALCIUM ENTRY.** Biochem Pharmacol 2013; 86 (11): 1555-1563.

- **Casas-Rua, V**; Tomas-Martin, P; Lopez-Guerrero AM; Alvarez, IS; Pozo-Guisado, E; Martin-Romero, FJ. **STIM1 PHOSPHORYLATION TRIGGERED BY EPIDERMAL GROWTH FACTOR MEDIATES CELL MIGRATION.** Biochim Biophys Acta – Mol. Cell Res. 2015; 1853 (1): 233-243.

Reuniones científicas nacionales:

- **Casas-Rua, V**; Pozo-Guisado, E; Martín-Romero, FJ. **RESVERATROL INHIBE LA FOSFORILACIÓN DE STIM1 EN Ser575, Ser608 Y Ser621 BLOQUEANDO SU DISOCIACIÓN DE EB1 E INHIBIENDO LA ENTRADA DE Ca^{2+} OPERADA POR DEPÓSITOS INTRACELULARES.** XXXVI Congreso Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Madrid 2013.

- **Casas-Rua, V**; Alvarez-Miguel, IS; Martin-Romero, FJ; Pozo-Guisado, E. **PAPEL CRÍTICO DE LA FOSFORILACIÓN DE STIM1 EN LA MIGRACIÓN INDUCIDA POR EGF EN CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA ENDOMETRIAL HUMANO.** XXXVI Congreso Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Madrid 2013.

- Pozo-Guisado, E; **Casas-Rua, V**; Tomas-Martin, P; Lopez-Guerrero, AM; Álvarez-Barrientos, A; Martin-Romero, FJ. **LA FOSFORILACIÓN DE STIM1 EN RESIDUOS DIANA DE ERK1/2 CONTROLA SU ASOCIACIÓN CON EL REGULADOR DE MICROTÚBULOS EB1.** XXXVI Congreso Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular Madrid 2013.

Reuniones científicas internacionales:

- **Casas-Rua, V**; Tomas-Martin, P; Martin-Romero, FJ; Pozo-Guisado, E. **MOLECULAR BASIS OF THE INHIBITION OF STORE-OPERATED CALCIUM ENTRY BY RESVERATROL.** 22nd IUBMB Congress & 37th FEBS Congress. Sevilla 2012.

- **Casas-Rua, V**; Pozo-Guisado, E; Martin-Romero, FJ. **STIM1 PHOSPHORYLATION TRIGGERED BY EPIDERMAL GROWTH FACTOR MEDIATES CELL MIGRATION.** Calcium signalling: Next Generation. Londres 2014.

Este trabajo ha sido financiado con los proyectos **PCJ1008**, **GR15077,** de la consejería de Economía, Comercio e Innovación (Junta de Extremadura), **PRIS11028** de Fundesalud, y proyectos **BFU2008-0104** y **BFU 2011-22798** del Ministerio de Economía y Competitividad.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecer a mis directores de tesis Dr. Francisco Javier Martín Romero, Dra. Eulalia Pozo Guisado y Dr. Ignacio Santiago Álvarez Miguel el apoyo mostrado para la realización de este trabajo.

Agradecer también a todos los compañeros del departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética, así como al departamento de Anatomía, Biología Celular y Zoología por todos esos ratos que pasamos juntos.

A mi familia, por apoyarme incluso cuando ni siquiera yo era capaz de creer en esto.

Y por último mi más sincero agradecimiento a los amigos que tuve la suerte de encontrar durante la realización de este trabajo, María Vázquez, Luis Sánchez Guardado y Patricia Tomás Martín, por todos esos momentos de escape que vivimos juntos y que seguiremos viviendo, gracias por estar ahí.

INDICE

ABREVIATURAS…….19

INTRODUCCIÓN…….23

1. Ca^{2+} LIBRE INTRACELULAR..... 25
   1.1 Ion calcio (Ca^{2+}) como mensajero intracelular..... 25
   1.2 Señalización intracelular mediada por Ca^{2+}. 27
2. ENTRADA DE Ca^{2+} OPERADA POR DEPÓSITOS (SOCE). 28
   2.1 STIM1. 30
      2.1.1 Estructura. 30
      2.1.2 Activación de STIM1. 31
   2.2 ORAI1. 34
   2.3 STIM1 es una fosfoproteína. 36
3. RUTA DE SEÑALIZACIÓN CELULAR RAS-RAF-MEK1/2-ERK1/2..... 38
   3.1 RAS. 39
   3.2 RAF. 40
   3.3 MEK1/2. 42
   3.4 ERK1/2. 44
4. FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGF). 45
   4.1 Receptor de EGF (EGFR). 46
5. RESVERATROL. 48
6. PROTEÍNA *END-BINDING* 1 (EB1). 50
   6.1 Estructura de microtúbulos..... 50
   6.2 Proteínas plus-end tracking (+TIPs). 51
   6.3 STIM1 como proteína +TIPs..... 53
7. TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA (TEM)..... 54
   7.1 Características y diferencias entre células epiteliales y mesenquimales. 54
   7.2 Definición de TEM..... 55

OBJETIVOS…….……..……..57

RESULTADOS…….……..……...61

1. EL VACIADO DE LOS DEPOSITOS INTRACELULARES DE Ca^{2+} INDUCE LA FOSFORILACIÓN DE STIM1. 63
2. MULTIMERIZACIÓN DE STIM1-GFP..... 66
3. FOSFORILACIÓN DE STIM1 Y UNIÓN A EB1. 67
4. ACTIVACIÓN DE ERK1/2 MEDIADA POR EGF..... 72
5. EGF PROMUEVE LA FOSFORILACIÓN DE STIM1..... 76
6. EGF PROMUEVE LA DISOCIACIÓN DE STIM1-EB1. 79
7. EGF ACTIVA EL INFLUJO DE Ca^{2+} EN CÉLULAS ISHIKAWA. 81
8. LA FOSFORILACIÓN DE STIM1 ES NECESARIA PARA LA MIGRACIÓN CELULAR……84
9. STIM1 MEDIA LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA ESTIMULADA POR EGF……..88

10. RESVERATROL INHIBE SOCE EN CÉLULAS HEK293. 91
11. RESVERATROL INHIBE LA ACTIVACIÓN DE ERK1/2 Y LA FOSFORILACIÓN DE STIM. 94
12. RESVERATROL INTERFIERE LA DISOCIACIÓN DE STIM1-EB1. 97
13. RESVERATROL INHIBE LA MULTIMERIZACIÓN DE STIM1 EN CÉLULAS HEK293..... 99
14. RESVERATROL INHIBE LA UNIÓN DE STIM1 A ORAI1 EN CÉLULAS HEK293…..... 101

DISCUSIÓN…….…….……..…….105

CONCLUSIONES……..…….117

MATERIALES Y MÉTODOS……...…….……..…….121

1. CULTIVOS CELULARES 123
1.1 Cultivo de las líneas celulares. 123
1.2 Tratamientos de las líneas celulares. 123
1.3 Expresión de STIM1 en líneas celulares de HEK293 de modo estable e inducible. …….……..124
1.4 Transfección transitoria de las líneas celulares. 126
2. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES Y WESTERN BLOT. 127
2.1 Preparación de extractos celulares. 127
2.2 Medida de concentración de proteína..... 127
2.3 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes y transferencia a membranas de nitrocelulosa. 127
2.4 Inmunodetección. 128
3. PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS..... 129
3.1 Precipitación de proteínas que presentan el tag GFP. 129
3.2 Co-inmunoprecipitación de EB1-STIM1. 130
3.2.1 Unión covalente del anticuerpo a la resina de proteína G-sefarosa..... 130
4. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO LIBRE INTRACELULAR ……131
4.1 Carga con fura 2-AM en cultivos celulares..... 132
4.2 Medida de los valores de fluorescencia..... 132
4.3 Calibración de la medida..... 132
4.4 Activación de la entrada de Ca^{2+} mediante canales SOC. 133
5. ANÁLISIS DE LA MULTIMERIZACIÓN DE STIM1..... 133
6. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR..... 133
7. INMUNOLOCALIZACIÓN..... 134
7.1 Inmunolocalización. 134
7.2 Tinción de la cromatina nuclear con Hoechst 33342. 1355
8. ENSAYO DE CIERRE DE HERIDA EN PLACA. 135

BIBLIOGRAFÍA…….137

ANEXOS…….151

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1: Sistemas de transporte de Ca^{2+} en células eucariotas. 27
Figura 2: Señalización celular mediada por Ca^{2} 28
Figura 3: Esquema de la entrada operada por depósitos (SOCE). 29
Figura 4: Dominios moleculares de STIM1. 30
Figura 5: Estructura de dímero de STIM1 en reposo. 32
Figura 6: Activación y multimerización de STIM1. 34
Figura 7: Estructura de ORAI1. 35
Figura 8: Estructura del tetrámero que forma el canal de ORAI1. 35
Figura 9: Activación de canales SOC mediada por STIM1. 36
Figura 10: Esquema de la ruta de señalización RAS-RAF-MEK1/2-ERK1/2. 39
Figura 11: Activación de RAS. 39
Figura 12: Activación de RAF por RAS. 42
Figura 13: Modelo para la activación de MEK. 43
Figura 14: Estructura de ERK1/2. 44
Figura 15: Esquema de las rutas de señalización en las que está implicado EGF. 46
Figura 16: Dimerización de EGFR. 47
Figura 17: Estructura química de trans-resveratrol y cis-resveratrol. 48
Figura 18: Dianas moleculares de RES. 50
Figura 19: Estructura de los microtúbulos. 51
Figura 20: Asociación de proteínas +TIPs a microtúbulos. 52
Figura 21: Estructura de EB1 e interacciones. 53
Figura 22: Modelo de mecanismo entre EB1 y APC. 54
Figura 23: Modificaciones celulares asociadas a la transición epitelio-mesenquima (TEM). 56
Figura 24: Fosforilación in vivo de STIM1 en las Ser575, Ser608 y Ser621. 64
Figura 25: Inhibición de la fosforilación de STIM1 en las Ser575, Ser608 y Ser621. 65
Figura 26: Multimerización de STIM-WT-GFP tras el vaciado de depósitos intracelulares de Ca^{2+}. 66
Figura 27: Esquema de STIM1. 68
Figura 28: La fosforilación de STIM1 en las Ser575, Ser608 y Ser621 regula la unión a EB1. 69
Figura 29: Colocalización de STIM1-EB1 en células HEK293. 71
Figura 30: Optimización del medio de cultivo que mantenga una baja actividad de ERK1/2. 73
Figura 31: Activación de ERK1/2 por EGF. 73
Figura 32: Cinética de activación de ERK1/2 por EGF. 74
Figura 33: Comparación de la activación de ERK1/2 tras el tratamiento con EGF o Tg . 75
Figura 34: Inhibición de ERK1/2 con PD0325901. 75
Figura 35: Fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2 mediada por EGF. 77
Figura 36: Fosforilación de STIM1 en células que sobreexpresan un mutante activo de HRas (HRas-G12V). 78
Figura 37: EGF induce la disociación del complejo EB1-STIM1. 79
Figura 38: Disociación de EB1 y STIM1 endógeno mediada por EGF. 81
Figura 39: Entrada de Ca^{2+} operada por depósitos intracelulares (SOCE) en células Ishikawa. ..... **¡Error! Marcador no definido.**
Figura 40: Movilización de Ca^{2+} mediada por EGF. 83
Figura 41: La fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2 modula la migración celular inducida por EGF en células Ishikawa. 85
Figura 42: Distribución de ciclo de células Ishikawa tratadas com SKF96365. 85

Figura 43: Sobreexpresión de STIM1 en células Ishikawa en el ensayo de cierre de herida en placa. 86
Figura 44: Ensayo de proliferación celular tras la sobre-expresión de STIM1. 87
Figura 45: Distribución de ciclo de células Ishikawa que sobreexpresan distintos mutantes de STIM1. 88
Figura 46: EGF estimula la transición epitelio-mesénquima en células Ishikawa. 89
Figura 47: La fosforilación de STIM1 media la transición epitelio-mesénquima en células Ishikawa. 90
Figura 48: Inhibición de SOCE por RES en células HEK293. 92
Figura 49: Vaciado de depósitos inducida por Tg. 92
Figura 50: El efecto inhibidor de RES no esta relacionado con un bloqueo directo de los canales SOC. 93
Figura 51: Inhibición de ERK1/2 por RES. 95
Figura 52: Inhibición de la fosforilación de STIM1 por RES. 96
Figura 53: Inhibición de la disociación de STIM1 y EB1 por RES. 98
Figura 54: RES inhibe la multimerización de STIM1 en células HEK293. 100
Figura 55: RES impide la unión de STIM1-ORAI1 bajo condiciones de vaciado de depósitos. 102
Figura 56: SOCE no se inhibe por RES en células que expresan STIM1-S575E/S608E/S621E o STIM1-I644N/P645N. 104
Figura 57: Obtención de las líneas Flp-In T-REx. 125
Figura 58: Expresión del gen de interés por adición de doxiciclina. 126
Figura 59: Espectro de excitación del fura 2-AM 131

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

BSA: albúmina de suero bovino

CIRC: liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+}

DAG: diacilglicerol

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

DMSO: dimetil-sulfóxido

EDTA: ácido etilen-diamino-tetraacético

EGF: factor de crecimiento epidérmico

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

G418: análogo de la neomicina

GFP: proteína verde fluorescente

HBSS: *Hank's Balanced Salt Solution*

InsP3: inositol-1,4,5-trisfosfato

PBS: tampón fosfato salino

PEI: polietilenimina

PIP2: fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato

PLC: fosfolipasa-C

PMCA: Ca^{2+}-ATPasa de membrana plasmática

PMSF: fluoruro de fenil metil sulfonilo

SDS: dodecil sulfato sódico

SERCA: Ca^{2+}-ATPasa de retículo sarcoendoplasmático

SOC: canales de Ca^{2+} operados por depósitos intracelulares

SOCE: entrada de Ca^{2+} operada por depósitos intracelulares

TEMED: N,N,N',N'-tetrametil etilendiamino

Tris: tris(hidroximetil)aminometano

INTRODUCCIÓN

1. Ca^{2+} LIBRE INTRACELULAR.

1.1 Ion calcio (Ca^{2+}) como mensajero intracelular.

Cuando un señalizador extracelular se une específicamente a su receptor de membrana plasmática se da inicio a una cadena de eventos que conlleva a la transducción de dicha señal en el interior de la célula receptora. Esta señalización celular es llevada a cabo por numerosos mensajeros intracelulares que descodifican y transmiten estas señales, lo que da lugar a una respuesta fisiológica por parte de la célula. En células eucariotas existen numerosas moléculas que actúan como mensajeros intracelulares, tales como el 3',5'-AMP cíclico (AMPc), 1,2-diacilglicerol (DAG), inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3) o el ión calcio (Ca^{2+}).

Las variaciones en la concentración citosólica de Ca^{2+} libre ($[Ca^{2+}]_i$) están implicadas en el control del ciclo celular y la señalización celular durante el proceso de proliferación y muerte celular (Berridge et al., 2003; Berridge et al., 2000). Además, $[Ca^{2+}]_i$ es también un mediador de la señalización celular durante la contracción muscular, transmisión del impulso nervioso e incluso tiene un papel crucial durante el proceso de fecundación oocitaria, por señalar sólo algunos ejemplos (Berridge et al., 2003; Berridge et al., 2000). Debido a la importancia de estas funciones celulares en las que está implicado el ion Ca^{2+}, el estudio de las variaciones en la $[Ca^{2+}]_i$, así como las rutas en las que están implicadas estas oscilaciones, han suscitado gran interés desde que se conoce su función como segundo mensajero.

La $[Ca^{2+}]_i$ se sitúa en el intervalo 80-120 nM en células en reposo. La variación de esta concentración es crítica, ya que un pequeño cambio en la $[Ca^{2+}]_i$ es suficiente para disparar numerosos eventos celulares. De este modo, el transporte de Ca^{2+} a través de canales y bombas específicas se encuentra altamente regulado para asegurar un control espacio-temporal de pequeñas variaciones de este segundo mensajero. Para incrementar la $[Ca^{2+}]_i$ existen dos fuentes principales de Ca^{2+}: (1) el medio extracelular, en el que la concentración de Ca^{2+} se encuentra en el intervalo 1-2 mM; y (2) los depósitos intracelulares de Ca^{2+}, principalmente el retículo endoplasmático (RE), en el que la concentración de Ca^{2+} alcanza niveles micromolares, aunque también las vesículas de Golgi y las mitocondrias son importantes reservorios de Ca^{2+} (Bootman et al., 2001).

Por tanto, la entrada de Ca^{2+} al citosol se puede llevar a cabo por una serie de canales localizados en la membrana plasmática o en el RE (**Figura 1**). Así, podemos encontrar los siguientes transportadores en ambas membranas:

1. Canales situados en la membrana plasmática implicados en la entrada de Ca^{2+} al interior celular.
    a. VOC (*voltage-operated calcium channels*): canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje, que se activan por despolarización de la membrana (Catterall, 1998). Dentro de este grupo se diferencian distintos tipos entre los que destacamos los canales de tipo L, N, P/Q (Antkiewicz-Michaluk, 1999).
    b. ROC (*receptor-operated calcium channels*): canales que se activan por la unión de un agonista al dominio extracelular del canal. Los ROCs más conocidos son los activados por unión a glutamato, ATP, serotonina y acetilcolina (Cavero and Spedding, 1983).
    c. SOC (*store-operated calcium channel*): canales de Ca^{2+} activados por el vaciado de depósitos intracelulares (Putney, 2001).
2. Canales situados en la membrana del RE implicados en la entrada de Ca^{2+}:
    a. IP_3R (*Inositol trisphosphate receptor*): canales en los que se induce la apertura mediante el segundo mensajero IP_3 (Berridge et al., 2000).
    b. RyR (*Ryanodine receptor*): en el caso de células musculares constituyen un sistema muy especializado responsable del vaciado de depósitos intracelulares de Ca^{2+} implicados en los ciclos de contracción-relajación muscular (Meissner, 1994). En el caso de células no musculares, se ha descrito la apertura de estos canales tras la estimulación con ADP ribosa cíclica (Berridge, 1998; Clapper et al., 1987).

Puesto que los niveles que alcanza la $[Ca^{2+}]_i$ durante los procesos de señalización celular podrían llegar a ser tóxicos para la célula en el caso de mantenerse permanentemente elevados, nos encontramos con varios sistemas de extrusión de Ca^{2+} que participan directamente en el control de los niveles intracelulares de Ca^{2+}:

1. Transportadores situados en la membrana plasmática:
    a. PMCA (*plasma-membrane Ca^{2+}-ATPase*): bomba de Ca^{2+} situada en la membrana plasmática que bombea el Ca^{2+} del interior celular al exterior con gasto de ATP (Gill et al., 1984).

b. Intercambiador Na^+/Ca^{2+}: intercambiador iónico que extruye Ca^{2+} al medio extracelular utilizando el gradiente preexistente de Na^+.

2. Transportadores situados en la membrana del RE:
   a. SERCA (*sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase*): bomba de Ca^{2+} situada en la membrana del retículo endoplasmático que extruye Ca^{2+} del citoplasma al interior del RE (Ebashi et al., 1969; Hasselbach, 1964).

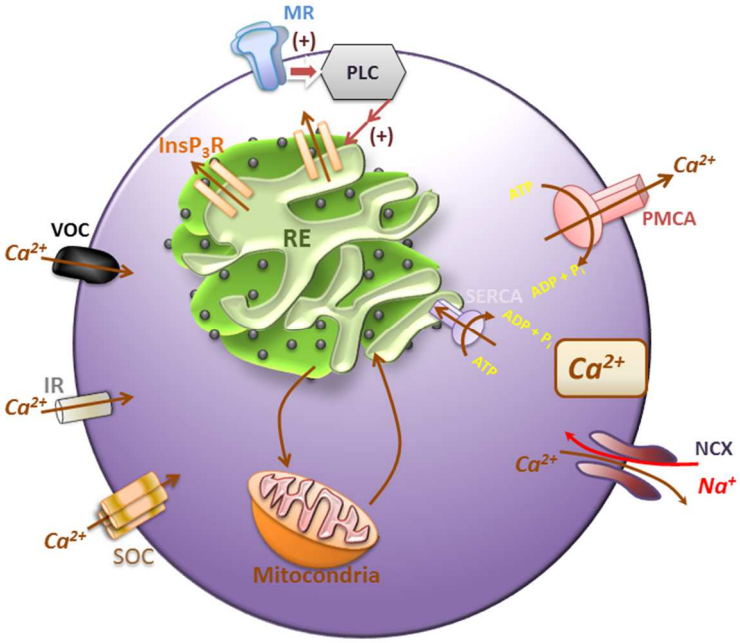

Figura 1: Sistemas de transporte de Ca^{2+} en células eucariotas. IP_3R: receptor de IP_3; IR: receptor ionotrópico; PLC: fosfolipasa C; PMCA: Ca^{2+}-ATPasa de membrana plasmática; SERCA: Ca^{2+}-ATPasa de retículo endoplasmático; SOC: canal de Ca^{2+} operado por depósitos intracelulares.

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

En numerosas ocasiones cuando un señalizador extracelular se une a su receptor específico activa la ruta de los fosfoinositoles, de modo que activa indirectamente alguna de las isoformas de la fosfolipasa C (PLC), que hidroliza fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) en inositol-1,4,5-trisfosfato (IP_3) y 1,2-diacilglicerol (DAG). El DAG es hidrofóbico y queda retenido en la membrana plasmática. Sin embargo, el IP_3, al ser soluble, difunde por el citosol hasta interaccionar con su receptor (IP_3R) localizado en el RE y liberar Ca^{2+} desde el lumen del RE hacia el citosol (Bootman et al., 2001). Además, otro activador de los IP_3R es el incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico, un proceso denominado "liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+}" o CICR (*calcium-induced calcium release*). Mediante este mecanismo el incremento del nivel de Ca^{2+} citosólico en las cercanías del receptor IP_3R provocan la activación del mismo, lo que permite la salida

de más Ca^{2+}, activando al mismo tiempo a receptores vecinos (**Figura 2**).

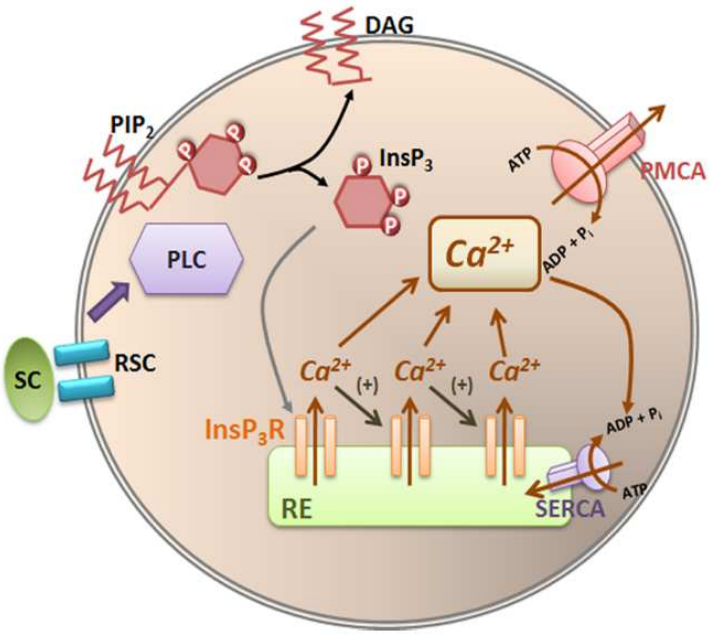

Figura 2: Señalización celular mediada por Ca^{2+}. DAG: 1,2-diacilglicerol; PIP_2: fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato; PLC: fosfolipasa C; SC: señalizador celular; RE: retículo endoplasmático; RSC: receptor específico de señalizador celular.

De este modo, el aumento de la concentración de Ca^{2+} citosólico induce una respuesta celular rápida en un espacio limitado de la célula. Este vaciado temporal de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} (fundamentalmente el RE) podría conducir a una depleción permanente cuando la señalización se prolonga en el tiempo. Para facilitar la extensión temporal de las respuestas celulares a una señalización repetitiva, o una señalización intensa, se activa otra ruta de entrada de Ca^{2+} denominada entrada de Ca^{2+} regulada (u operada) por depósitos intracelulares (*store-operated calcium entry*, SOCE), que permite el llenado de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} cuando existe una disminución significativa en los niveles de Ca^{2+} intraluminal (Lewis, 2007).

2. ENTRADA DE Ca^{2+} OPERADA POR DEPÓSITOS (SOCE).

En la membrana plasmática nos encontramos un sistema de canales de Ca^{2+} que permiten la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular al citosol, permitiendo así que la SERCA contribuya al llenado del lumen del RE. Estos canales se denominan canales operados por depósitos o canales SOCs, y la entrada de Ca^{2+} a través de estos canales se denomina entrada de Ca^{2+} operada por depósitos o SOCE, ruta que se definió por primera

vez en 1986 (Putney, 1986). Sin embargo, el mecanismo que regula este influjo ha permanecido sin esclarecer durante dos décadas.

Existe una proteína que se encarga de transmitir la señal de vaciado de depósitos en el RE, conocida como STIM1 (*stromal interation molecule 1*), que es considerada un sensor de los niveles de Ca^{2+} intraluminales del RE. Tras el vaciado del RE, STIM1 se activa, oligomeriza y se transloca hacia las cercanías de la membrana plasmática interaccionando con los canales SOCs para su activación, siendo éste el paso desencadenante del influjo de Ca^{2+} inducido por el vaciado del RE (**Figura 3**).

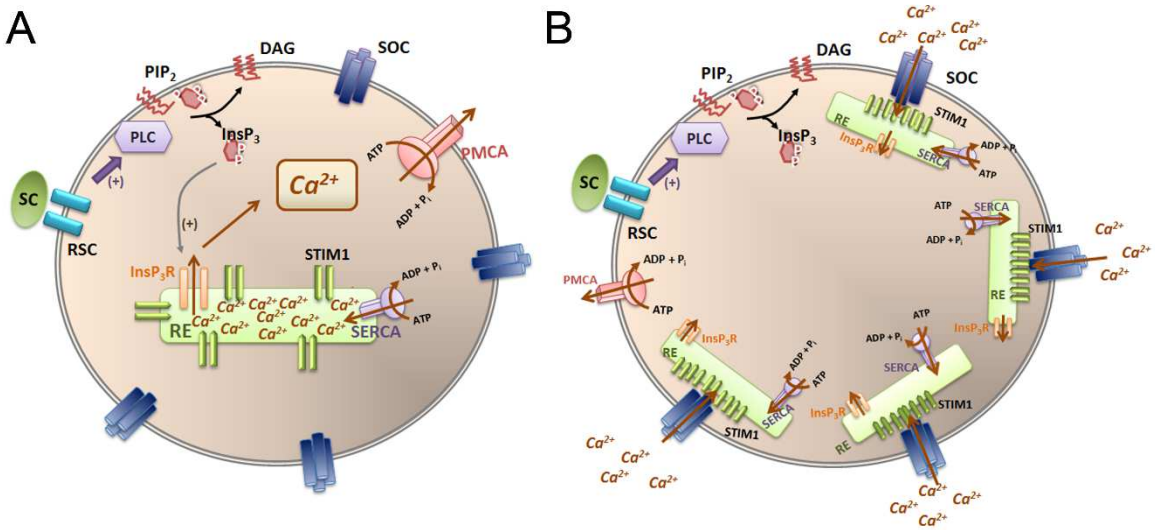

Figura 3: Esquema de la entrada operada por depósitos (SOCE). La activación de los IP_3R, debido al incremento de la generación de IP_3 por la PLC, conduce a una primera salida de Ca^{2+} desde el RE. Esta salida está acompañada de la relocalización de STIM1 que se aproxima a la membrana plasmática donde activa los canales SOC para estimular la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular y facilitar así el incremento de la concentración de Ca^{2+} citosólico necesario para la generación de las ondas de Ca^{2+}, y también para permitir el llenado del RE con objeto de que mantenga su funcionalidad durante el tiempo que permanezca activa esta señalización.

Mediante diversos estudios se determinó que las proteínas STIM1 y ORAI1 son los principales componentes moleculares de la entrada de Ca^{2+} regulada por depósitos intracelulares (Feske et al., 2006; Liou et al., 2005; Roos et al., 2005; Zhang et al., 2006b; Zhou et al., 2010).

2.1 STIM1.

2.1.1 Estructura.

STIM1 es una proteína de 685 aminoácidos formada por varios dominios claramente diferenciados (**Figura 4**), destacando un dominio intraluminal, una única región transmembranal y un dominio citosólico.

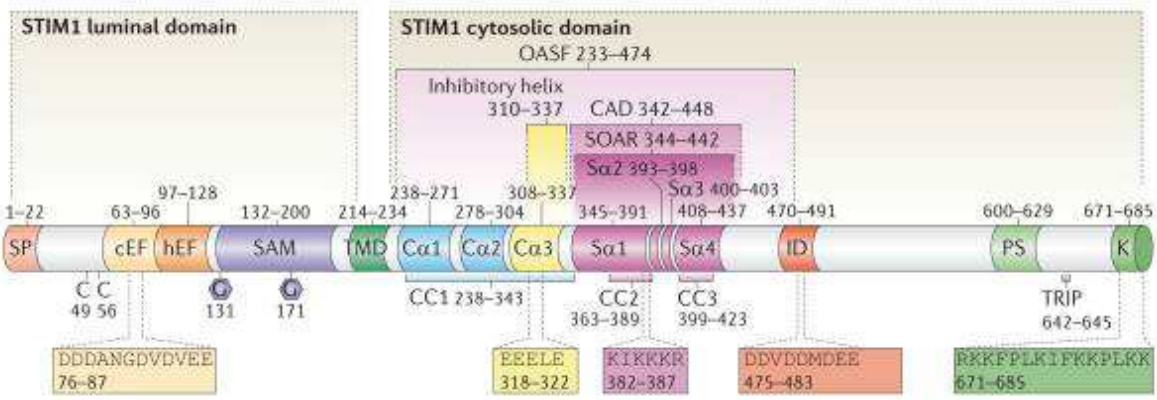

Figura 4: Dominios moleculares de STIM1. El extremo N-terminal de la proteína se encuentra dentro del lumen del RE, mientras que el extremo C-terminal está orientado hacia el citosol. SP: péptido señal; cEF: manos EF canónico; hEF: manos EF oculto; SAM: dominio *sterile α-motif*; TMD: dominio transmembrana; CC: tres regiones coliled-coil (CC1, CC2, CC3), CC1 está formado por tres α-hélices (Cα1, Cα2 y Cα3); SOAR: región activadora de ORAI1, formada por 4 α-hélices (Sα1, Sα2, Sα3 y Sα4); CAD y OASF: son regiones de mayor amplitud que SOAR y que la contienen; PS: dominio rico en serinas y prolinas; TRIP: dominio de interacción a microtúbulos; K: dominio rico en lisinas, que tiene función de unión a fosfolípidos de membrana. *(Soboloff et al. 2012, Nat Rev Mol Cell Biol 13(9):549-65).*

1) El <u>dominio intraluminal</u> se corresponde con el extremo N-terminal y en él podemos encontrar las siguientes regiones:

- Dominio de manos EF de unión a Ca^{2+} (cEF)
- Dominio de manos EF que no se une a Ca^{2+} (hEF) (Stathopulos et al., 2008).
- Dominio SAM o dominio α-sterile motif, que posee dos residuos de Asn susceptibles de glicosilación (Williams et al., 2002).

2) <u>Dominio transmembrana</u>.

3) En el <u>dominio citosólico</u> podemos diferenciar las siguientes regiones:

- Dominios coiled-coil: incluye tres regiones llamadas CC1, CC2 y CC3. La región CC1 se divide en tres α-hélices, Cα1, Cα2 y Cα3 (Cole et al., 2008; Muik et al., 2011; Yang et al., 2012).
- Dominio SOAR o región activadora de STIM1-ORAI1. Esta región de STIM1 fue descrita por Yuan y cols. en 2009 y se corresponde con la mínima secuencia

necesaria para la activación de ORAI1 (Yuan et al., 2009). Comprende desde el residuo 344 al 442, y contiene 4 α-hélices, llamadas Sα1, Sα2, Sα3 y Sα4 (Yang et al., 2009).

- El anterior dominio también es conocido como segmento CAD (CRAC activation domain). Comprende desde el residuo 342 al 448 (Park et al., 2009).
- Segmento OASF (ORAI-activating small fragment). Comprende desde el residuo 233 al 450 (Muik et al., 2009).
- Dominio rico en serinas y prolinas. Comprende desde el residuo 600 al 629.
- Dominio de interacción a microtúbulos, que comprende la secuencia TRIP (residuos Thr-Arg-Ile-Pro, desde el residuo 642 al 645) (Honnappa et al., 2009).
- Dominio rico en lisinas. Comprende desde el residuo 671 al 685 (Liou et al., 2007).

2.1.2 Activación de STIM1.

Los dominios EF-SAM son las regiones necesarias para detectar los niveles de Ca^{2+} dentro del lumen del RE. En células en reposo las dos manos EF de STIM1 forman un complejo estable junto con el dominio SAM (**Figura 5**). En células en reposo nos encontramos unos niveles de Ca^{2+} en torno a 400 μM dentro del RE. Con estos niveles de Ca^{2+}, las manos cEF de STIM1 se unen a iones Ca^{2+} formando así un complejo estable entre cEF-hEF y el dominio SAM. Cuando la concentración de Ca^{2+} intraluminal disminuye, Ca^{2+} se disocia del dominio cEF, lo que lleva a un cambio conformacional de la proteína, la cual adquiere una forma desplegada, en la que quedan expuestos residuos hidrofóbicos tanto de las regiones manos EF como de la región SAM (Stathopulos et al., 2008). Esta desestabilización de la proteína mediante la exposición de residuos hidrofóbicos conlleva a la activación de STIM1 y posterior formación de oligómeros de la proteína. Esta situación es reversible de modo que cuando los niveles de Ca^{2+} se restauran dentro del lumen del RE, STIM1 vuelve al estado plegado o de reposo. Además, se ha comprobado que ciertas deleciones en el dominio SAM provocan la pérdida de capacidad para la formación de multímeros, demostrándose así que esta región es vital para la oligomerización de STIM1 (Baba et al., 2006).

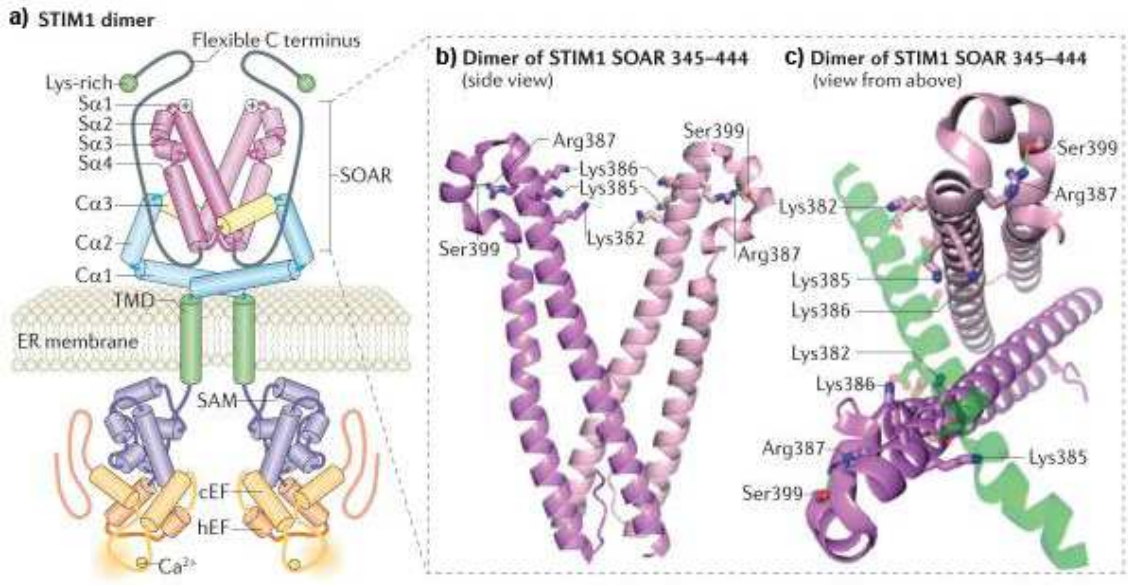

Figura 5: Estructura de dímero de STIM1 en reposo. Estructura empaquetada de STIM1 en reposo. El dímero de STIM1 se mantiene unido mediante interacciones entre los dominios SOAR de ambas moléculas. *(Soboloff et al. 2012. Nat Rev Mol Cell Biol 13(9):549-65).*

Por otro lado, la porción citosólica de STIM1 contiene tres dominios coiled-coil (CC) muy conservados y situados inmediatamente después de la región transmembrana. Estos dominios CC están formados por tres regiones, CC1, CC2 y CC3, encargadas de la oligomerización de STIM1, es decir de las uniones entre distintas moléculas de STIM1. En células en reposo los dominios de manos cEF de STIM1 se encuentran unidos al ión Ca^{2+} formando el complejo manos EF-SAM, mientras que la proteína STIM1 se encuentra agrupada en dímeros (Covington et al., 2010; Muik et al., 2009; Penna et al., 2008; Yang et al., 2012). Estos dímeros de STIM1 se mantienen a través de la interacción entre las regiones CC (en particular la región CC1) y los dominios SOAR del par de moléculas de STIM1 (Covington et al., 2010). Estas regiones CC comprenden un amplio segmento de STIM1 (desde los aa 238-423) (Covington et al., 2010; Yang et al., 2012).

Análisis de la proteína STIM1 llevados a cabo mediante cristalografía revelan que el dominio SOAR de STIM1 está compuesto por 4 α-hélices (345-444), dos hélices largas (Sα1, Sα4) y dos hélices pequeñas (Sα2 y Sα3). La estructura molecular de STIM1 nos revela que la región Sα1 (347-354) de una molécula de STIM1 interacciona con residuos del segmento Sα4 (429-436) de la otra molécula en un dímero de STIM1 (Yang et al., 2012).

Por otro lado, cuando se expresa STIM1 con el extremo C-terminal delecionado se observan uniones inestables entre moléculas de STIM1 tras el vaciado de depósitos, lo

que sugiere que estas regiones son necesarias para formar multímeros estables de STIM1, aunque no es la única región que participa en la interacción entre moléculas (Covington et al., 2010). Así, se concluyó que las interacciones de STIM1 a través del extremo N-terminal se estabilizan con las interacciones entre los dominios del extremo C-terminal. Por tanto, aunque la region SAM participa en la multimerización de STIM1 inducida por el vaciado de depósitos, los dominios coiled-coil y SOAR permiten una robusta multimerización de STIM1, permitiendo que se formen multímeros estables.

Los residuos ácidos de STIM1 localizados en la región Cα3 del CC1 (318-322, EEELE) presentan una estructura muy parecida al extremo C-terminal de ORAI1 que se une a STIM1. En este sentido se ha mostrado que esta región de STIM1 (318-322, EEELE) actúa como región inhibidora de la región SOAR. Estudios en los que se sustituyeron los cuatro glutamatos por alaninas (AAALA), mostraron la unión constitutiva entre ORAI1 y STIM1, y se observó una activación constitutiva de ORAI1, incluso cuando el RE presentaba niveles altos de Ca^{2+} (Korzeniowski et al., 2010). Esta región inhibitoria puede unirse directamente con la región básica de STIM1 (aminoácidos 382-387, KIKKKKR), que se encuentra en la región Sα1 del dominio SOAR, bloqueando la interacción electrostática entre STIM1 y ORAI1.

El dominio CAD de STIM1 también se une al extremo C-terminal de otros canales diferentes a ORAI, como el canal $Ca_v1.2$. Sin embargo, en este caso se ha comprobado que STIM1 inactiva estos canales $Ca_v1.2$ mediante dos mecanismos: por un lado mediante interacción física y por otro, más lenta, estimulando la internalización del canal y su degradación (Park et al., 2010; Wang et al., 2010).

En resumen, en estado de reposo encontramos dímeros de STIM1, que se mantienen unidos mediante interacciones entre las regiones CC1 y SOAR. Para la activación de STIM1 tras el vaciado de depósitos, las regiones del extremo N-terminal interaccionan de un modo inestable y estas uniones se estabilizan tras la interación de las regiones del extremo C-terminal, lo que conduce a una forma desplegada de la proteína (**Figura 6**). Por tanto, la región SOAR de STIM1 tiene un doble papel, por un lado media la transición de STIM1 en su conformación en oligomeros activos, y por otro lado se une

directamente con ORAI1, activando así a dichos canales (Park et al., 2009; Yuan et al., 2009).

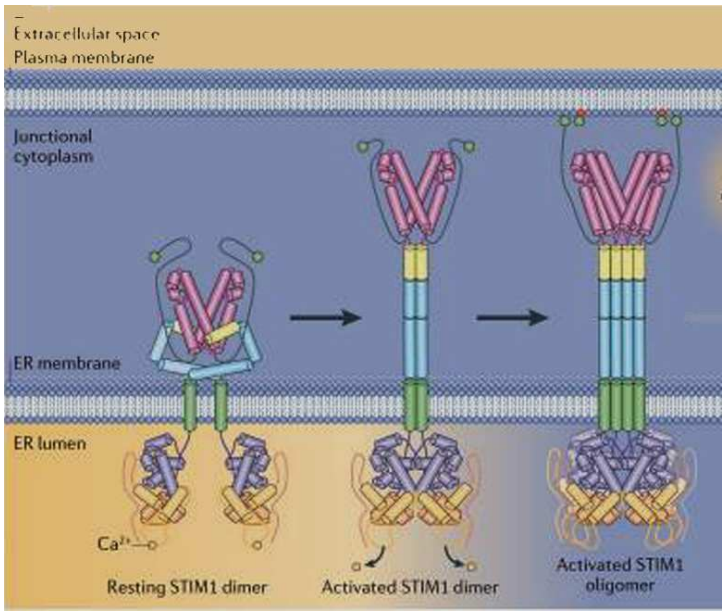

Figura 6: Activación y multimerización de STIM1. Dímero en estado de reposo de la proteína STIM1, formado por una estructura plegada, que tras detectar bajos niveles de Ca^{2+} dentro del lumen del RE adquiere una forma desplegada. La forma activa (dímero) interaccionará posteriormente con otras moléculas de STIM1 formando multímeros activos. *(Soboloff et al. 2012. Nat Rev Mol Cell Biol 13(9):549-65).*

2.2 ORAI1.

ORAI1 (*Calcium release-activated calcium channel protein 1*) es una proteína transmembranal que forma un canal selectivo de Ca^{2+} y que se activa tras el vaciado de depósitos intracelulares tras la interacción con STIM1. En este sentido trabajos iniciales permitieron determinar que la mutación R91W en ORAI1 causa inmunodeficiencia severa por la pérdida del influjo de Ca^{2+} en células T, y por su consiguiente incapacidad para ser activados (Feske et al., 2006), lo que permitió establecer su papel como mediador en SOCE y la generación de la corriente CRAC.

ORAI1 contiene 4 dominios transmembrana con el extremo C-terminal y N-terminal intracelular dirigidos hacia el citosol. La región C-terminal de ORAI1 (**Figura 7**) está formada por una región coiled-coil pequeña que es la responsable de la unión a STIM1, ya que la deleción de esta región lleva a la inhibición de la apertura de los canales SOC mediada por STIM1 (Muik et al., 2008). Además, se ha identificado un grupo de residuos ácidos dentro de este segmento coiled-coil de ORAI1 (272-291; ELNELAEFARLQDQLDHRGD) como la región que está implicada en la unión a STIM1 y activación de canales SOCs. Estos residuos ácidos Glu272, Glu275, Glu278, Asp284, Asp287 y Asp291 del extremo C-terminal de ORAI1, deben interaccionar

electrostáticamente con la región coiled-coil de STIM1, de naturaleza básica, dentro de la región SOAR (382-387; KIKKKR) (Calloway et al., 2010; Korzeniowski et al., 2010).

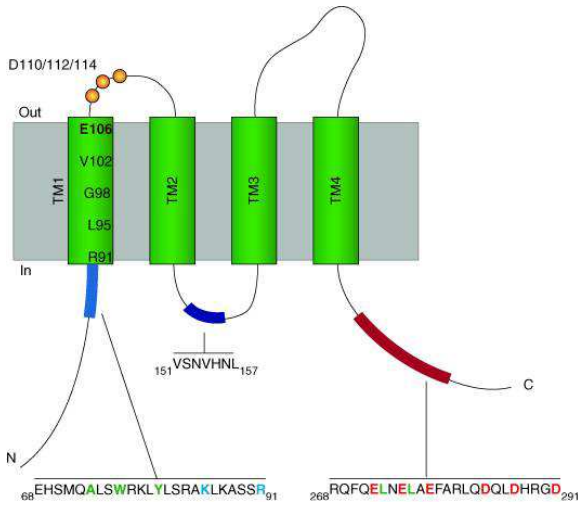

Figura 7: Estructura de ORAI1. El esquema nos muestra la proteína ORAI1 incluido sus 4 dominios transmembrana (TM1-TM4), 3 α-hélices que unen dichos dominios transmembranas y el extremo C-terminal y N-terminal, ambos orientados hacia el citoplasma celular. (*Lewis, RS, 2011. Cold Spring Harb Perspect Biol. 1;3(12)).*

ORAI1 forma un canal funcional mediante un tetrámero (Penna et al., 2008) (**Figura 8**). 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+}. En este sentido, se ha demostrado que 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 selectividad por Ca^{2+}, ya mutaciones en estos residuos provocan un aumento en la permeabilidad a Ca^{2+} (Prakriya et al., 2006; Vig et al., 2006; Yeromin et al., 2006).

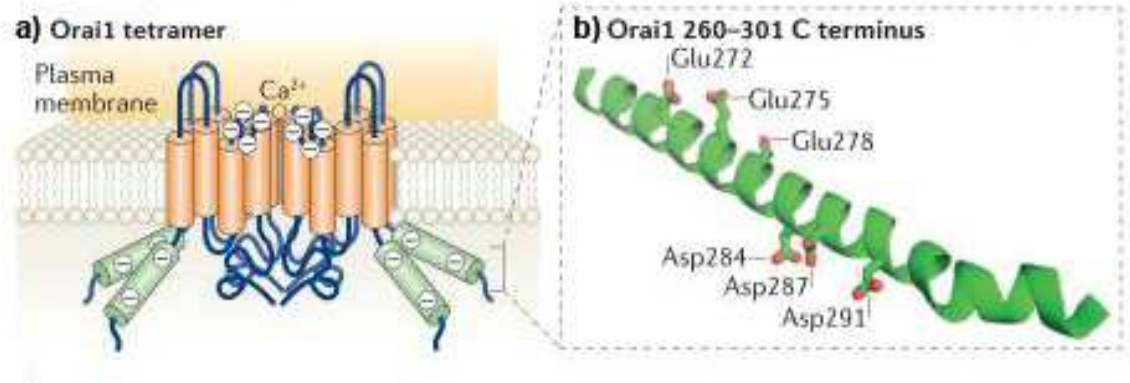

Figura 8: Estructura del tetrámero que forma el canal de ORAI1. (A) El esquema nos muestra los residuos transmembrana (naranja), secuencias extracelular e intracelular (azul) y extremo C-terminal (verde). Los residuos con carga negativa responsables de la unión a STIM1 aparecen en el extremo C-terminal, así como en la parte del interior del poro encargada de seleccionar el paso de Ca^{2+}. **(B)** Estructura de la α-hélice del extremo C-terminal. Se muestran los residuos ácidos (Glu272, Glu275, Glu278, Asp284, Asp287 y Asp291) que deben unirse a los residuos básicos del dominio SOAR de STIM1. (*Soboloff et al. 2012. Nat Rev Mol Cell Biol 13(9):549-65).*

El vaciado de Ca^{2+} en el RE activa SOCE mediante una reorganización de la distribución de STIM1 y ORAI1 en las células. En células en reposo los niveles de Ca^{2+} en el RE se sitúan en torno a 400-500 μM, y en este estado tanto STIM1 como ORAI1 se encuentran localizados de modo difuso en la membrana del RE y la membrana plasmática respectivamente. Cuando se vacían los depósitos intracelulares se produce un cambio conformacional de STIM1 que estabiliza a la molécula y lleva a la oligomerización de STIM1 y translocación a las cercanías de la membrana plasmática (MP) mediante yuxtaposiciones MP-RE. El vaciado de depósitos estimula la interacción ORAI1-STIM1 que permite la activación del canal (**Figura 9**).

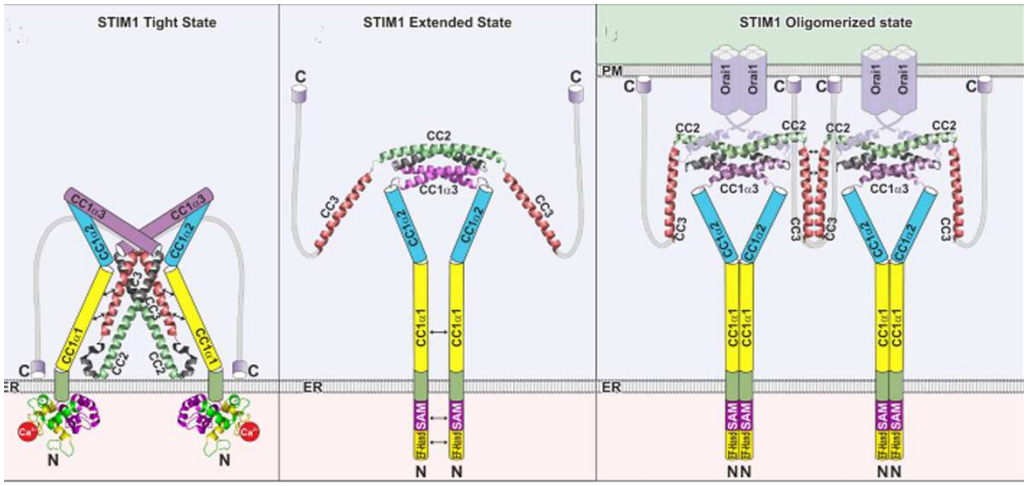

Figura 9: Activación de canales SOC mediada por STIM1. Se muestra el modelo para la activación de canales SOC, comenzando con la activación de STIM1 tras el vaciado de depósitos, adquiriendo una estructura desplegada que posteriormente oligomeriza, alcanza las proximidades de la MP, interaccionando con los canales SOCs formados por tetrámeros de ORAI1 que se activan, permitiendo la entrada del Ca^{2+} al interior celular. (*Fahrner et al. 2014- J. Biol Chem. 289(48):33231-33244).*

Estas zonas de unión RE-MP son regiones estrechas en las que ambas membranas se aproximan unos 20 nm (Giordano et al., 2013; Orci et al., 2009; Shen et al., 2011). El dominio citosólico de STIM1 abarca el espacio entre el RE y la MP, de modo que la cola polibásica de STIM1 rica en lisinas es la responsable de unión a fosfolípidos de membrana como fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) y fosfatidilinositol 3,4,5-trisfofato (PIP_3) (Bhardwaj et al., 2013; Ercan et al., 2009).

2.3 STIM1 es una fosfoproteína.

Manji y cols. describieron en el año 2000 que STIM1 es una fosfoproteína, destacando que la fosforilación de la misma estaba presente principalmente en residuos de serina (Manji et al., 2000). Mediante ensayos de proteómica a gran escala y análisis de

espectrometría de masas, Olsen y cols. comprobaron la existencia de numerosos residuos de serina fosforilados en STIM1 tras tratar las células HeLa con EGF (Olsen et al., 2006), sin embargo no han existido trabajos detallados para comprobar la naturaleza de los residuos fosforilados hasta 2009-2010.

SOCE no es una ruta activa durante la mitosis y meiosis (Machaca and Haun, 2000; Preston et al., 1991). Por ello, Smyth y cols. estudiaron los residuos de STIM1 suceptibles de ser fosforilados durante la mitosis de células HeLa y células HEK293, para compararlos con los determinados en cultivos asincrónicos. Así se demostró que las serinas 602 y 608 aparecian desfosforiladas durante la mitosis, mientras que las serinas 486 y 668 se encontraban fosforiladas (Smyth et al., 2009). En este mismo trabajo, se pudo comprobar que la doble sustitución de serinas por alaninas en los residuos 468 y 668 (S468A/S668A) restauraba SOCE en mitosis, lo que confirmó la implicación de la fosforilación de STIM1 en las Ser468 y Ser668 en mitosis para inactivar SOCE (Smyth et al., 2009). También en 2009 Yu y cols. estudiaron la fosforilación de STIM1 durante la meiosis en oocitos, y utilizando mutantes de STIM1 que mimetizaban la desfosforilación constitutiva (sustitución S/A), estos autores determinaron que la fosforilación de los residuos de Ser no modulaba la multimerización de STIM1 en meiosis, por lo que concluyeron que este proceso no se encontraba implicado en la inhibición de SOCE durante la meiosis (Yu et al., 2009).

En 2010 Pozo-Guisado y cols. mostraron que ERK1/2 fosforilaba las Ser575, Ser608 y Ser621 de STIM1 *in vitro*, y demostraron además que la fosforilación de STIM1 era necesaria para la activación de SOCE *in vivo*, afirmación que se reforzó con la sustitución de las Ser575, Ser608 y Ser621 por alanina, mimetizando así una defosforilación constitutiva, en una versión mutada de STIM1 que veía disminuida la entrada de Ca^{2+} mediante SOCE (Pozo-Guisado et al., 2010).

Posteriormente Lopez y cols. mostraron que STIM1 también podía ser fosforilado en residuos de tirosinas en plaquetas humanas. Esta fosforilación tenía lugar poco tiempo después de la adición de Tg, de tal modo que ocurría antes de la multimerización de STIM1. También pusieron de manifiesto la implicación de esta fosforilación de STIM1 en residuos de tirosinas para la asociación de STIM1 con los canales de ORAI1 presentes en la membrana plasmática y la consecuente activación de SOCE (Lopez et al., 2012).

En conclusión, la fosforilación de STIM1 parece tener una papel regulador de la activación de SOCE en células en interfase, aunque parece ser un regulador negativo durante la mitosis. Por ello, y dado que STIM1 en un sustrato de las quinasas ERK1/2, es conveniente destacar aquí algunos aspectos de la señalización mediada por ERK1/2.

3. RUTA DE SEÑALIZACIÓN CELULAR RAS-RAF-MEK1/2-ERK1/2.

La ruta de señalización celular RAS-RAF-MEK1/2-ERK1/2 es una ruta de señalización que forma parte de la ruta de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAP quinasas – *Mitogen activited protein kinases)*. Esta ruta de señalización está compuesta por una cascada de serina/treonina quinasas que transforman estímulos extracelulares en respuestas celulares. Los factores que activan la ruta son principalmente factores de crecimiento, entre los que se incluyen el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento nervioso (NGF) o el factor de crecimiento plaquetario (PDGF). Además esta ruta es activada por ligandos de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), y en respuesta a insulina (Boulton et al., 1990), citoquinas, estrés osmótico y desorganización de microtúbulos. Las respuestas celulares a esta activación son muy variadas y abarcan procesos como proliferación celular, mitosis, expresión génica, supervivencia, apoptosis y diferenciación celular. La activación del receptor mediante la unión de un ligando (factor de crecimiento o citoquina) provoca que se active la actividad tirosina quinasa del receptor, uniéndose así a la proteína GRB2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*) que activa a la proteína G monomérica RAS, y que a su vez activa a RAF y finalmente a las serinas/treoninas quinasas MEK1/2, que son activadoras de ERK1/2 (**Figura 10**).

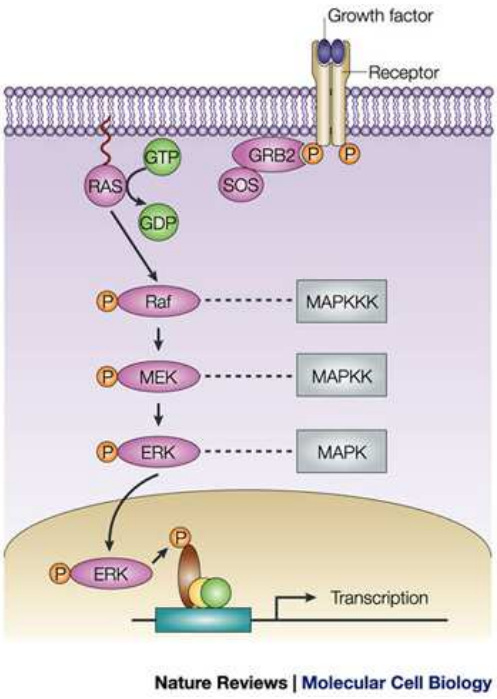

Figura 10: Esquema de la ruta de señalización RAS-RAF-MEK1/2-ERK1/2. Esquema de la ruta que se inicia con la unión del factor de crecimiento a su receptor de membrana específico, y continúa con la ruta de señalización mediante fosforilación y por tanto activación de las MAP quinasas implicadas. *(Kin HJ. 2004. Nature Reviews in Molecular Cell Biology 5, 441-450).*

3.1 RAS.

La proteína RAS es una proteína G monomérica, con actividad GTPasa, que actúa como interruptor molecular. Se han descrito 4 isoformas de la proteína RAS: H-RAS, K-RAS4A, K-RAS4B y N-RAS, que se expresan de forma genérica en todos los tejidos y tipos celulares estudiados. La proteína RAS presenta dos conformaciones estructurales, por un lado RAS unido a guanosina difosfato (GDP), siendo ésta la forma inactiva de RAS, y por otro lado RAS unida a guanosina trifosfato (GTP), la forma activa de la proteína (**Figura 11**).

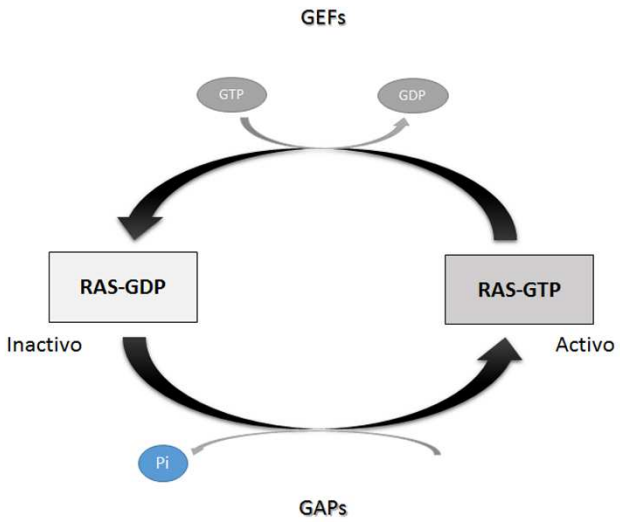

Figura 11: Activación de RAS. Esquema de la activación de RAS. GAPs: proteínas de activación de GTPasas. GDP: guanosina difosfato. GEFs: factores de intercambio GDP-GTP; GTP: guanosina trifosfato. Pi: grupo fosfato.

La activación de RAS se lleva a cabo en la membrana plasmática mediante la implicación de SOS, un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) que cataliza el intercambio de GDP a GTP (Niault and Baccarini, 2010). En este proceso de activación también está implicada la proteína GRB2 que forma un complejo con SOS, complejo que hace de puente entre el receptor tirosina-quinasa activado por su ligando y la proteína RAS. La proteína GRB2 consta de un dominio SH2, a través del cual se une al residuo fosforilado del receptor tirosina-quinasa. Este dominio SH2 de GRB2 está flanqueado por dos dominios SH3, que se unen especificamente a secuencias ricas en prolinas, siendo estos dominios los responsables de la unión al extremo C-terminal de la proteína SOS. De este modo, SOS es reclutada del citosol a la membrana plasmática como resultado de su interacción con GRB2, lo que estimula la función GEF de SOS y activa a RAS mediante el intercambio de GDP por GTP. GRB2, además de unirse directamente al receptor tirosina-quinasa, puede unirse a través de la proteína SHC que presenta un dominio PTB (de unión a tirosina fosforilada) en el extremo N-terminal (Vigil et al., 2010).

La proteína RAS se inactiva mediante proteínas activadoras de GTPasas (GAPs), las cuales potencian la actividad GTPasa de RAS, Las formas de RAS oncogénicas que presentan mutaciones en los residuos 12 o 61, tienen suprimida la sensibilidad a las GAPs, por lo tanto se mantienen constitutivamente unidas a GTP, es decir activas (Bos, 1989; Karnoub and Weinberg, 2008).

Las proteínas RAS modulan funciones celulares esenciales, y de entre sus efectores encontramos las proteínas RAF (Vojtek et al., 1993; Warne et al., 1993; Zhang et al., 1993).

3.2 RAF.

La familia RAF es un grupo de proteínas serina/treonina quinasas citosólicas que se activan tras la unión directa con la proteína RAS-GTP. En células de mamíferos se expresan tres isoformas de esta familia, A-RAF, B-RAF y C-RAF. Las diferentes isoformas de RAF presentan distinta afinidad por su activador así como por su diana, MEK1/2 (Leicht et al., 2007). B-RAF se considera la más activa (Hu et al., 2013). Se ha observado que aproximadamente el 7% de B-RAF está mutado en diferentes tipos de

cáncer, sin embargo mutaciones en A-RAF o C-RAF son menos abundantes (Davies et al., 2002; Mercer and Pritchard, 2003). La mutación más común en B-RAF es la que sustituye la valina 600 por glutamato e induce la activación constitutiva de B-RAF (Wan et al., 2004).

La activación de RAF requiere la translocación a la membrana y además la actividad se regula mediante fosforilación (Matallanas et al., 2011). Para la activación de RAF se requiere de la fosforilación en sitios distintos de la proteína:

1. Fosforilación de dos residuos del dominio de activación de la quinasa (Chang and McCubrey, 2001).
2. Fosforilación de una serina y una tirosina en la región cercana al extremo N-terminal que se denomina dominio N-terminal acídico (NtA). En este caso B-RAF tiene la serina fosforilada de modo constitutivo y la tirosina aparece sustituida por un residuo de Asp (Diaz et al., 1997; Marais et al., 1995; Mason et al., 1999).

La proteína RAF aparece en un conformación cerrada que le confiere un estado inactivo. El dominio N-terminal, que contiene el dominio regulatorio, se pliega ocultando así la región catalítica (Tran and Frost, 2003). Esta conformación inactiva de la proteína se estabiliza por la proteína 14-3-3, que se une a las serinas constitutivamente fosforiladas de RAF (S259 y S621 en C-RAF; S365 y S729 en B-RAF; S214 y S576 en A-RAF) (Matallanas et al., 2011). Por otro lado, la unión de B-RAF o C-RAF a RAS-GTP desplaza a la proteína 14-3-3 de la serina del extremo N-terminal dejando libre un extremo de la 14-3-3. En esta situación el extremo libre de la 14-3-3 se une a otra molécula de RAF formando así un dímero (homodímeros en el caso de C-RAF y heterodímeros en el caso de B-RAF que se une a otra molécula de C-RAF). El dímero se encuentra estabilizado por la proteína 14-3-3 que forma un puente entre los extremos C-terminal de cada monómero de RAF (**Figura 12**). Un vez formados los dímeros unidos a RAS, uno de los monómeros cede su grupo fosfato del NtA al dominio quinasa del otro monómero, por lo que activa este dominio quinasa que ya es capaz de unirse a su diana, MEK1/2 y activarla mediante fosforilación.

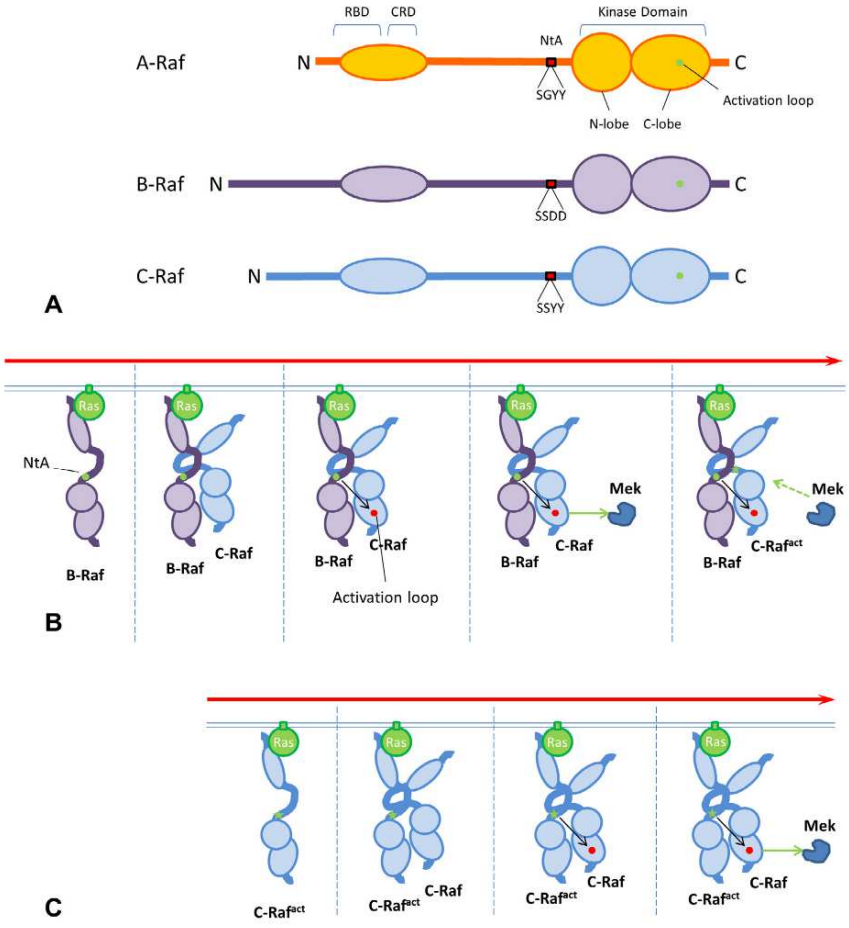

Figura 12: Activación de RAF por RAS. (A) todas las isoformas de RAF tienen un dominio de unión a RAS en el extremo N-terminal (RBD) y un dominio rico en cisteínas (CRD), ambos necesarios para el reclutamiento a la membrana. El dominio con actividad quinasa se encuentra en el extremo C-terminal con la región de activación (verde). Cerca del dominio quinasa en dirección al extremo N-terminal encontramos el dominio NtA (rojo). **(B)** RAS activado recluta B-RAF a la MP. RAS permite la unión de otra molécula de RAF. Ya en el dímero el NtA de B-RAF constitutivamente activo induce un cambio conformacional que permite la cis-fosforilación del monómero receptor, permitiendo la unión a MEK y su fosforilación. **(C)** C-RAF puede disociarse de B-RAF y dimerizar y activar a otra molécula de RAF, llevando a la amplificación de la señal. (*Cseh B et al 2014. FEBS letters 588: 2398-2406).*

3.3 MEK1/2.

La familia MEK (*mitogen extracellular signal-regulated kinase*), también llamada MAPKK, es una familia de quinasas que se activan por fosforilación. La proteína RAF, como hemos comentado en el apartado anterior, fosforila a MEK1 en las serinas 218 y 222 (Zheng and Guan, 1994) y en el caso de MEK2 en las serinas 222 y 226. MEK1/2 catalizan la fosforilación tanto de treoninas como tirosinas de sus proteínas diana.

La asociación de MEK con su activador (RAF) así como con su diana (ERK1/2) se lleva a cabo a través de la proteína KSR (Wortzel and Seger, 2011). La proteína KSR (*kinase supressor of Ras*) es un modulador positivo de esta vía (McKay et al., 2011) que actúa de andamiaje para unir a RAF, MEK y ERK. El extremo C-terminal de KSR posee ciertas características de proteína quinasa (Therrien et al., 1995), por lo que a este tipo de proteínas se les considera pseudoquinasas (Manning et al., 2002), ya que tienen mutados uno o varios residuos necesarios para desarrollar su actividad catalítica. KSR2 se une a MEK1 manteniendo su dominio catalítico inactivo, ya que los dominios de KSR2 y MEK1 están enfrentados (Brennan et al., 2011). En la **Figura 13** podemos ver un esquema que nos resume la activación de MEK. Cuando B-RAF se une a C-RAF y lo activa, el complejo KSR/MEK es reclutado hacia la membrana y de esta forma B-RAF se une de modo estable al complejo KSR/MEK, induciendo un cambio conformacional que expone el segmento de activación de MEK, permitiendo ser fosforilado por C-RAF.

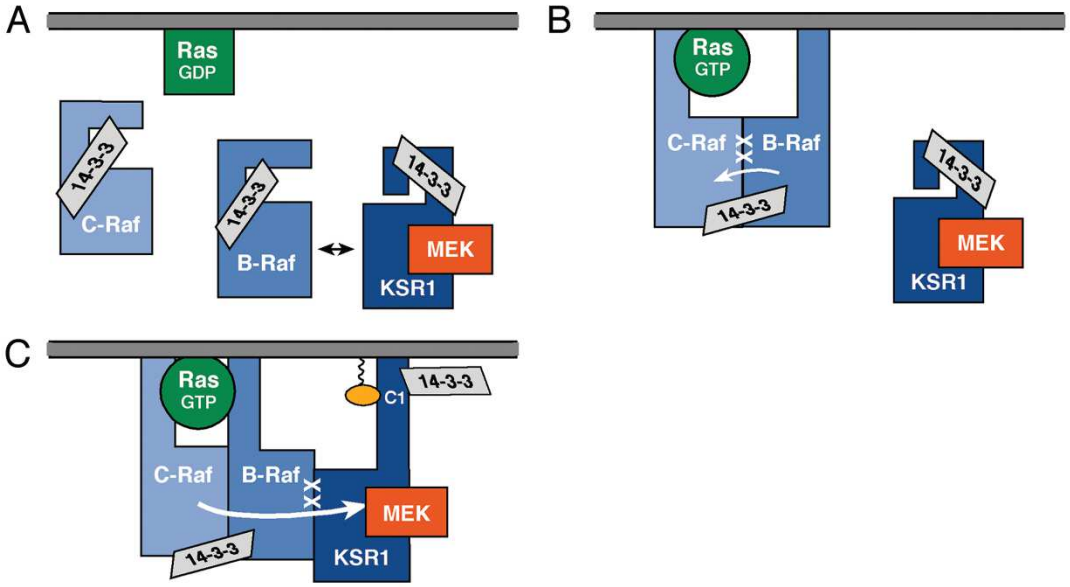

Figura 13: Modelo para la activación de MEK. (A) En células en reposo nos encontramos con B-RAF, C-RAF y el complejo KSR/MEK en el citosol. **(B)** RAS activado recluta a C-RAF a la membrana plasmática, acción en la que participa B-RAF. **(C)** El complejo KSR/MEK también se localiza en la membrana e interacciona con B-RAF, induciendo un cambio conformacional que expone el segmento de activación de MEK que puede así ser fosforilado por C-RAF. (*McKay MM et al, 2011, Small GTPases 2:5, 276-281).*

Debido a la importancia de esta ruta y su implicación en muchos tipos de cáncer, se han desarrollado varios inhibidores de estas kinasas MEK1/2. Entre éstos nos encontramos con PD0325901 y PD184352 (Davies et al., 2000; Rinehart et al., 2004). El

inhibidor CI-1040 o PD184352 fue el primer inhibidor de MEK que se utilizó para ensayos clínicos, pasando los ensayos en fase I, aunque los estudios en fase II se detuvieron puesto que los resultados fueron negativos. PD0325901, que es un derivado de CI-1040 con modificaciones en su estructura química, también ha sido utilizado para ensayos clínicos, tanto en fase I como en fase II (Sebolt-Leopold and Herrera, 2004).

3.4 ERK1/2.

ERK (*Extracellular-signal-regulated kinases*), es una familia de MAP quinasas que cuenta con dos isoformas, p44 ERK1 y p42 ERK2 (**Figura 14**) que comparten un 84% de homología además de compartir muchas de sus funciones (Lloyd, 2006).

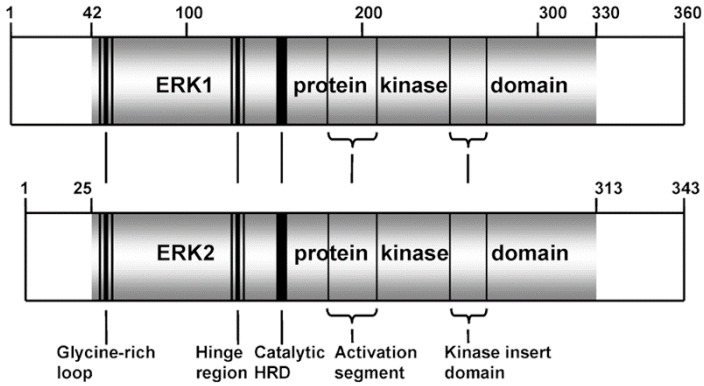

Figura 14: Estructura de ERK1/2. Esquema de la estructura de las quinasas citoplasmáticas ERK1 y ERK2 donde se observan los dominios catalíticos entre otros. (Robkoski JR, 2012, Pharmacological Research 66, 105-143).

MEK1/2 cataliza la fosforilación de la tirosina 204 y treonina 202 de ERK1 y la tirosina 187 y treonina 185 de ERK2, siendo la fosforilación de los dos residuos necesaria para la activación de la quinasa. En reposo, ERK1/2 se localiza principalmente en el citosol, donde se encuentra unido a MEK1/2 (Fukuda et al., 1997). Cuando ERK1/2 es fosforilado por MEK1/2, ERK1/2 dimeriza y se distribuye por toda la célula, translocándose también al núcleo (Zehorai et al., 2010).

Las quinasas ERK1/2 fosforilan proteínas que contienen la secuencia Pro-X-Ser/Thr-Pro, entre las que se han descritos las siguientes (Yoon et al., 2006):

- Factores de transcripción: NFAT, c-Myc, c-Fos, ELK1, STAT3
- Receptores y otras proteínas de membrana: EGFR, ENaC, SyK, GAB2
- Proteínas citoplasmáticas: RSK, STAT5, MEK, PLA2, COX2, SOS

- Componentes del citoesqueleto: MAPs, calponina
- Proteínas mitocondriales: Bcl-2

Por otro lado, nuestro grupo de trabajo ha descrito que STIM1 es otra de las proteínas diana de las quinasas ERK1/2 (Pozo-Guisado et al., 2010), al menos in vitro, y de hecho gran parte del trabajo que se describe en esta memoria está enfocado en analizar la regulación de STIM1 por la fosforilación de sitios dianas de ERK1/2 in vivo. Para llevar a cabo estos experimentos de análisis de la fosforilación de STIM1 por la ruta RAS-RAF-MEK1/2-ERK1/2 hemos empleado uno de los factores más ampliamente estudiados y empleados para estimular esta ruta de señalización, el factor de crecimiento epidérmico, EGF.

4. FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGF).

EGF es un factor de crecimiento que fue descubierto en la década de los 60 (Cohen, 1964) y que años más tarde ya se relacionó con la estimulación de células en cultivo (Cohen et al., 1975; Hollenberg and Cuatrecasas, 1973). EGF es una proteína de 6,4 kDa muy conservada en la evolución y pertenece a la familia de factores de crecimiento EGF I, que incluye otros factores como TGF-α (*Transforming growth factor*) o HB-EGF (*Heparin binding growth factor*) (Harris et al., 2003; Schneider and Wolf, 2009).

EGF se ha estudiado ampliamente desde su descubrimiento, pudiéndose demostrar su participación en proliferación y migración de queratinocitos, células endoteliales y fibroblastos, además de facilitar la regeneración dermal (Wenczak et al., 1992). EGF es clave en la señalización molecular de células epiteliales para la movilización celular, siendo un factor implicado en re-epitelación (Hardwicke et al., 2008). Se ha demostrado además que EGF es el mayor estímulo para la migración de fibroblastos así como para el cierre de heridas (Dogan et al., 2009; Fernandez-Montequin et al., 2009). Además, también es conocido que EGF está asociado al desarrollo y expansión de cáncer de mama (Kim and Muller, 1999), no sólo promocionando un efecto mitogénico, sino estimulando la migración e invasión de las células tumorales (Maheshwari et al., 1999; Ware et al., 1998; Wells et al., 2002) (**Figura 15**).

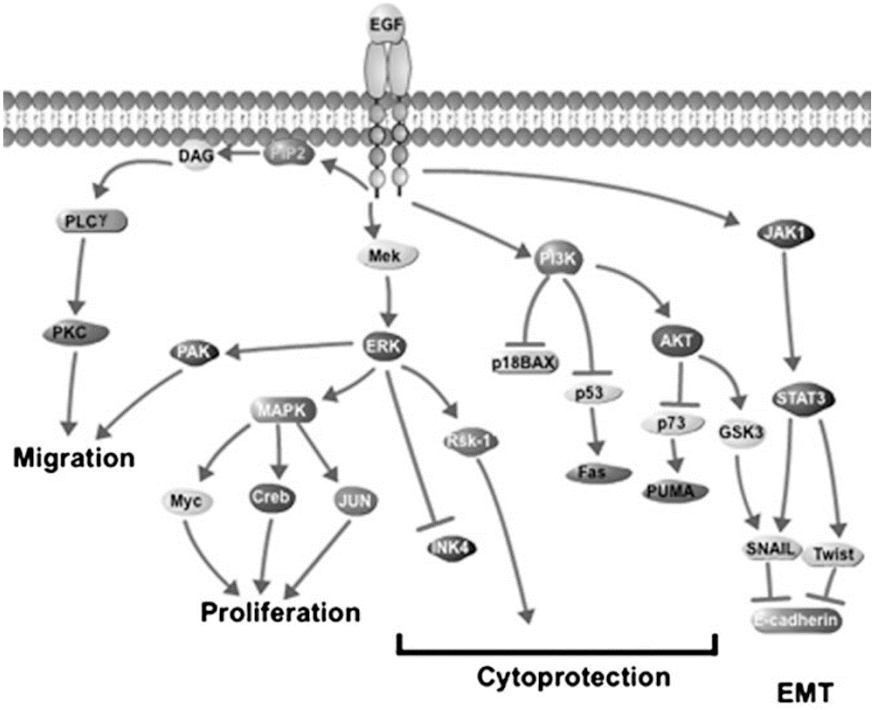

Figura 15: Esquema de las rutas de señalización en las que está implicado EGF. La figura nos muestra las distintas rutas de señalización en las que está implicado EGF, con el fin de desencadenar una serie de procesos celulares como son proliferación, migración, citoprotección o transición epitelio-mesénquima, que se muestra en el esquema con las siglas EMT. (*Bodnar RJ, 2011. Advanc Wound Care. Vol 2:1).*

4.1 Receptor de EGF (EGFR).

El receptor de EGF pertenece a una familia de receptores tirosina-quinasas (RTK), formada por cuatro isoformas, EGFR (ErbB1), HER2/c-neu (ErbB2), HER3 (ErbB3) y

HER4 (ErbB4). Las isoformas EGFR y HER4 son formas completamente funcionales del receptor, mientras que ErbB2 no tiene ligando propio, por tanto sólo es capaz de activarse cuando se asocia a otra isoforma formando un heterodímero activo o en ocasiones homodímero pero inactivo. La isoforma ErbB3 no posee dominio quinasa funcional. Existen numerosos estudios en los que se ha podido demostrar como la sobreexpresión o la hiperactivación de estos receptores de EGF son responsables del desarrollo de gran variedad de tipos de cáncer (Hutchinson et al., 2015; Rowinsky et al., 2004; Rush and Ceresa, 2013; Tomas et al., 2014).

El receptor de EGF se encuentra en la membrana plasmática y cuando su ligando específico se une al dominio extracelular del receptor estabiliza al mismo mediante un cambio conformacional que permite la dimerización del receptor, lo cual a su vez permite su activación (Burgess et al., 2003; Ogiso et al., 2002). El dominio interno del receptor (extremo C-terminal de la proteína) posee una serie de residuos de tirosina suceptibles de ser fosforilados (Y992, Y1045, Y1068, Y1148 y Y1173) (Schulze et al., 2005; Ullrich et al., 1984) (**Figura 16**). Además este dominio interno tiene actividad tirosina-quinasa, de tal manera que cuando el receptor dimeriza, se produce una trans-autofosforilación, añadiéndose grupos fosfato a los residuos de tirosinas del monómero vecino. Esta trans-autofosforilación es el evento necesario para la activación del receptor (Nolen et al., 2004; Zhang et al., 2006a). Estos dominios fosforilados del receptor se unen a proteínas dianas del interior celular que poseen dominios SH2 o dominios PTB, responsables de transmitir la señal.

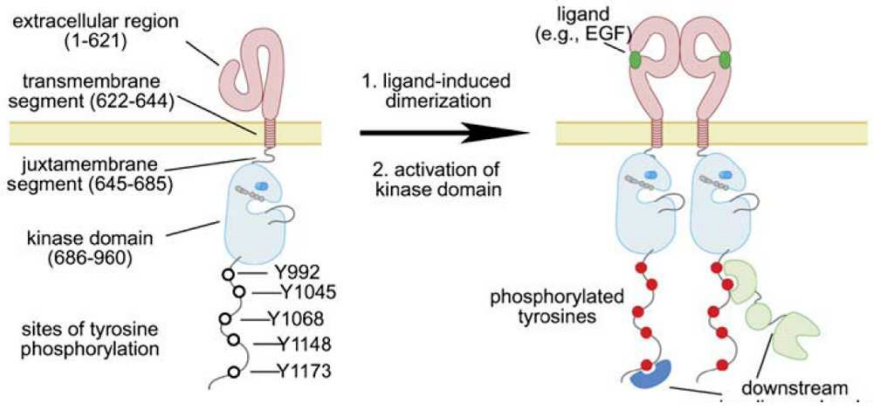

Figura 16: Dimerización de EGFR. En el esquema podemos ver como el receptor de EGF aparece en la membrana plasmática en forma de monómero y tras unirse a su ligando (EGF) se produce un cambio conformacional en el dominio extracelular del receptor lo que permite la dimerización del mismo. (*Endres NF et al, 2014. Trends Biochem Sci. 39: 10).*

5. RESVERATROL.

El resveratrol [3,5,4'-trihidroxiestilbeno] (RES) es una fitoalexina natural que se encuentra enriquecida en la piel de la uva y como consecuencia en el vino tinto y cuyo consumo se ha relacionado con numerosos efectos beneficiosos para la salud (Baur and Sinclair, 2006; Mukherjee et al., 2010). RES fue identificado por primera vez como un componente activo en raíces de *Polygonum cuspidatum* y presenta una estructura química muy similar a la de algunas hormonas esteroideas (**Figura 17**). De hecho, numerosos trabajos han mostrado que RES actúa como un fitoestrógeno capaz de interaccionar con el receptor de estrógenos e inducir una actividad agonista o antagonista sobre dicho receptor. Esta respuesta celular puede ser muy variable dependiendo del tipo celular y de la concentración de RES utilizada (Bowers et al., 2000; Schmitt et al., 2002).

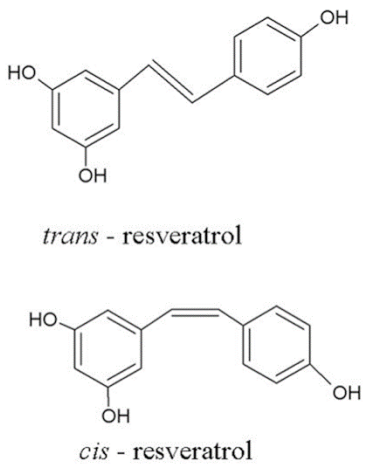

Figura 17: Estructura química de trans-resveratrol y cis-resveratrol.

Numerosos estudios han puesto de manifiesto el potencial efecto terapéutico de RES en el tratamiento y prevención de diversas enfermedades. Así, se ha observado que RES es un compuesto quimiopreventivo y quimioterapéutico capaz de inhibir el proceso de carcinogénesis en diferentes estadios (Jang et al., 1997). Por otro lado, el consumo de vino tinto y extractos de uva con alto contenido en RES se ha relacionado con un potencial efecto cardioprotector. En este sentido, numerosos estudios han puesto de manifiesto que RES inhibe la función de leucocitos polimorfonucleares en enfermedades de corazón (Rotondo et al., 1998), disminuye la agregación plaquetaria (Chen and Pace-Asciak, 1996; Demrow et al., 1995; Orsini et al., 1997)(Karlsson et al., 2000) promueve vasorelajación (Lekakis et al., 2005), suprimen la arteriosclerosis (Wang et al., 2005), reduce la peroxidación de lípidos (Fuhrman et al., 1995) y regula las concentraciones séricas de colesterol y triglicéridos (Frankel et al., 1993; Zern et al., 2003). Además,

debido a su capacidad antioxidante (Karlsson et al., 2000; Wang et al., 1999), el RES se ha relacionado con una alta actividad anti-inflamatoria, proceso íntimamente relacionado con enfermedades cardiovasculares, cáncer y otras dolencias como son la artritis, enfermedad de Crohn o psoriasis.

El RES inhibe la proliferación de diversas líneas células tumorales, induciendo muerte celular apoptótica de manera selectiva en células que responden a hormonas esteroideas (Benitez et al., 2007a; Benitez et al., 2007b; Pozo-Guisado et al., 2002; Pozo-Guisado et al., 2004). A lo largo de los últimos 15 años se ha evidenciado el efecto de RES como agente antitumoral, no solamente a nivel de alteración de la supervivencia celular y aumento de la apoptosis sino también en niveles más avanzados de la enfermedad, inhibiendo la invasión del tumor y la angiogénesis, así como la inhibición de procesos antiinflamatorios, evitando así la migración y la consiguiente metástasis que pueden provocar dichas células cancerígenas (Athar et al., 2009; Baur and Sinclair, 2006; Cucciolla et al., 2007; Jang et al., 1997; Mukherjee et al., 2010).

Numerosos estudios muestran un amplio espectro de dianas para el RES (**Figura 18**) incluyendo reguladores de ciclo celular, factores de transcripción y reguladores de las vías de apoptosis y supervivencia celular (Athar et al., 2009; Baur and Sinclair, 2006; Cucciolla et al., 2007; Mukherjee et al., 2010). RES tiene un rango de acción en el intervalo micromolar y su actividad biológica depende de la actividad simultánea en múltiples dianas moleculares. Enzimas relacionadas con la síntesis de mediadores proinflamatorios a partir del ácido araquidónico, como son la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa (COX y LOX) están inhibidas por RES (Subbaramaiah and Dannenberg, 2003), siendo este efecto muy importante en el tratamiento del cáncer debido a la íntima relación que existe entre el desarrollo del cáncer e inflamación.

Numerosas quinasas están moduladas por RES, tanto tirosina-quinasas como serina-treonina quinasas (Jayatilake et al., 1993). La inhibición de PKC por RES se ha relacionado con la inhibición del crecimiento celular y la inducción de apoptosis en varios tipos de tumores (Atten et al., 2005; Stewart and O'Brian, 2004). Otra familia de quinasas dianas del RES son las MAPK, en las que se incluye ERK1/2, JNK1/2 y p38 MAPK, presentando RES un papel quimiopreventivo en el desarrollo de cáncer, incluidos células de cáncer de mama (Pozo-Guisado et al., 2002) o células de cáncer de próstata (Benitez et al., 2007a). Se conoce bien que RES modula la vía de señalización de fosfoinositol-3-quinasa (PI3K), es decir, PI3K-PKB/AKT-GSK3 (Benitez et al., 2007b; Pozo-Guisado et

al., 2004). Sin embargo, el mecanismo molecular del efecto regulador de los estilbenos sobre la homeostasis de la $[Ca^{2+}]_i$ no está claro, del mismo modo que no se conocen sus

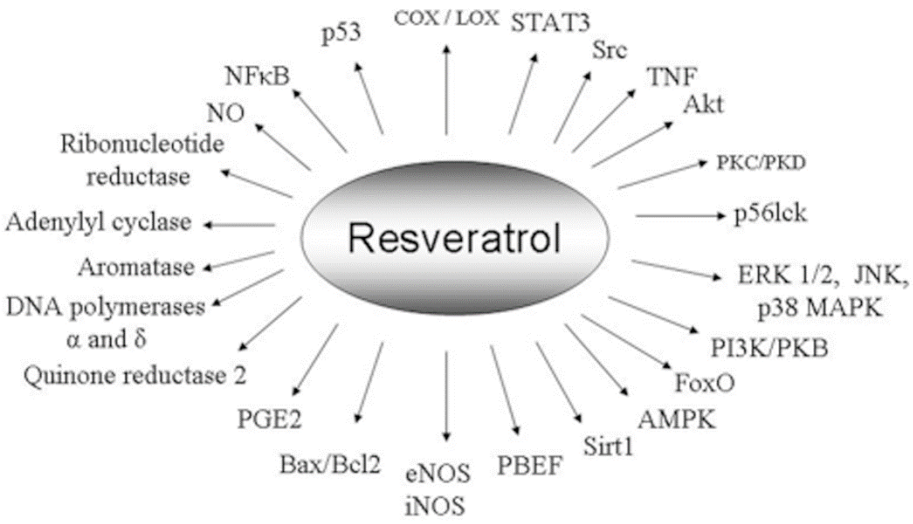

Figura 18: Dianas moleculares de RES. Esquema que nos muestra un gran espectro de moléculas dianas conocidas de resveratrol. (*Mukherjee S et al., 2010. Dose-Response. 8:478-500).*

dianas moleculares (Zakharov et al., 2004), por lo que se ha empleado RES en este trabajo para determinar el mecanismo molecular de su modulación sobre la $[Ca^{2+}]_i$, una vez conocido que altera diferentes actividades quinasa relevantes para la activación de SOCE, como ERK1/2.

6. PROTEÍNA *END-BINDING* 1 (EB1).

6.1 Estructura de microtúbulos.

Los microtúbulos son dímeros de α y β-tubulina que forman una estructura dinámica tubular claramente polarizada, pudiéndose distinguir dos extremos diferenciados conocidos como plus-end (+) y minus-end (-). Esta polaridad intrínseca de los microtúbulos se ve claramente en el proceso de ensamblaje, que sigue una dirección cabeza-cola y que es dependiente de la hidrólisis de GTP (**Figura 19**). El extremo positivo (plus-end) es el extremo de crecimiento más rápido *in vitro* y el único en crecimiento *in vivo*, mientras que el extremo negativo es el extremo de los microtúbulos que crece más lentamente *in vitro* y en células *in vivo* funciona como estabilizador, además de ser el sitio de desensamblaje. Ambos extremos pueden unirse a distintos factores que (1) controlan

su estado dinámico, (2) determinan su localización celular, y (3) permiten la adhesión a estructuras celulares. Los microtúbulos también sirven para desarrollar vías que favorecen el transporte de para los que necesitan la asistencia de determinadas proteínas motor de microtúbulos (Jiang and Akhmanova, 2011).

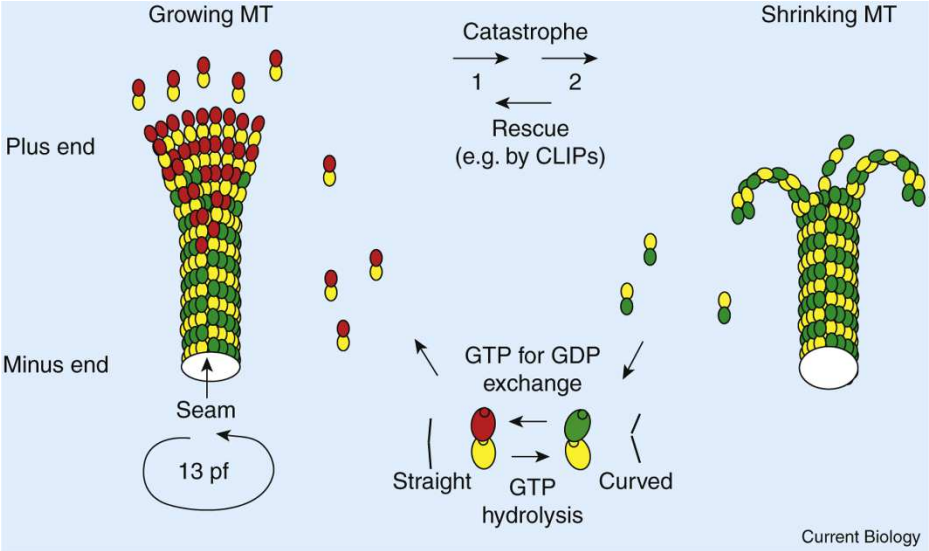

Figura 19: Estructura de los microtúbulos. Los microtúbulos están compuestos por 13 protofilamentos (13 pf) de α y β-tubulina, que precisan de la hidrólisis de GTP para el ensamblaje. Los microtúbulos están polarizados siguiendo un crecimiento desde el extremo minus-end hacia el extremo plus-end. (*Galjart N, 2010. Curr Biol 20: 528-537).*

Las proteínas que se asocian a los microtúbulos se conocen como MAPs (proteínas asociadas a microtúbulos). Dentro de estas proteínas existe un subgrupo de proteínas conocidas como +TIPs (proteínas plus-end tracking), que se acumulan en el final de los microtúbulos en crecimiento, es decir en el extremo plus-end (Schuyler and Pellman, 2001). Estas proteínas viajan por el citoplasma junto con los microtúbulos y regulan la interacción entre microtúbulos y otras estructuras intracelulares (Akhmanova and Steinmetz, 2008).

6.2 Proteínas plus-end tracking (+TIPs).

Las proteínas plus-end tracking (+TIPs) están implicadas en numerosas actividades celulares como la segregación de cromosomas, polarización celular, migración, señalización intracelular y arquitectura celular (Akhmanova and Steinmetz, 2008; Carvalho et al., 2003; Galjart and Perez, 2003). Dentro del subgrupo de proteínas +TIPs nos encontramos con la proteína EB1 (*end-binding protein 1*). EB1 es uno de los tres miembros de la familía EB (EB1, EB2 y EB3) (Su and Qi, 2001) y se descubrío por primera vez como proteína que interaccionaba con el extremo C-terminal de la proteína

APC (*adenomatous polyposis* coli), un supresor tumoral (Su et al., 1995). La proteína EB1 se encarga de guiar al extremo positivo (plus-end) en crecimiento de los microtúbulos además de reclutar a otras proteínas +TIPs (Honnappa et al., 2009) (**Figura 20**). EB1 en su extremo N-terminal tiene un dominio CH (calponin homology) responsable de la interacción con microtúbulos, suficiente y necesario para el reconocimiento y crecimiento del extremo positivo del microtúbulo (Hayashi and Ikura, 2003; Komarova et al., 2009). En el extremo C-terminal de EB1 encontramos un dominio coiled-coil responsable de la formación de homo- y heterodímeros. Este extremo C-terminal también contiene el dominio EBH (EB homology domain) responsable de la interacción con otras proteínas +TIPs (Honnappa et al., 2009). El dominio coiled-coil de EB1 y el dominio EBH son capaces de reconocer e interaccionar con dominios presentes en otras proteínas +TIPs como son la secuencia de aminoácidos SxIP o el dominio CAP-Gly (**Figura 21**). Por todo ello, podemos afirmar que la proteína EB1 es un regulador del crecimiento de los microtúbulos.

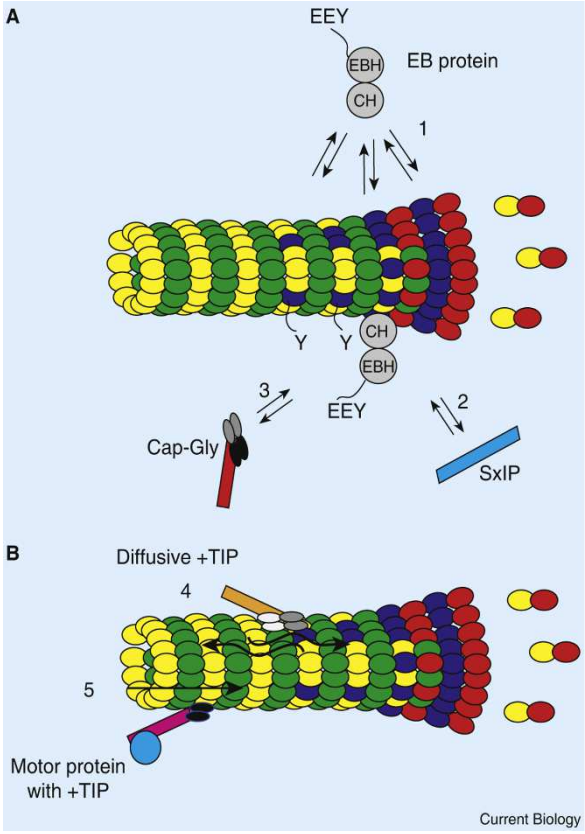

Figura 20: Asociación de proteínas +TIPs a microtúbulos. (A) La proteína EB1 se une al microtúbulo utilizando su dominio de homología a calponina (CH). Otras proteínas +TIPs se unen al dominio EBH de EB1 mediante dominios SxIP o dominios Cap-Gly. **(B)** Transporte de proteínas a través de microtúbulos utilizando proteínas +TIPs. (*Galjart N, 2010. Curr Biol 20: 528-537).*

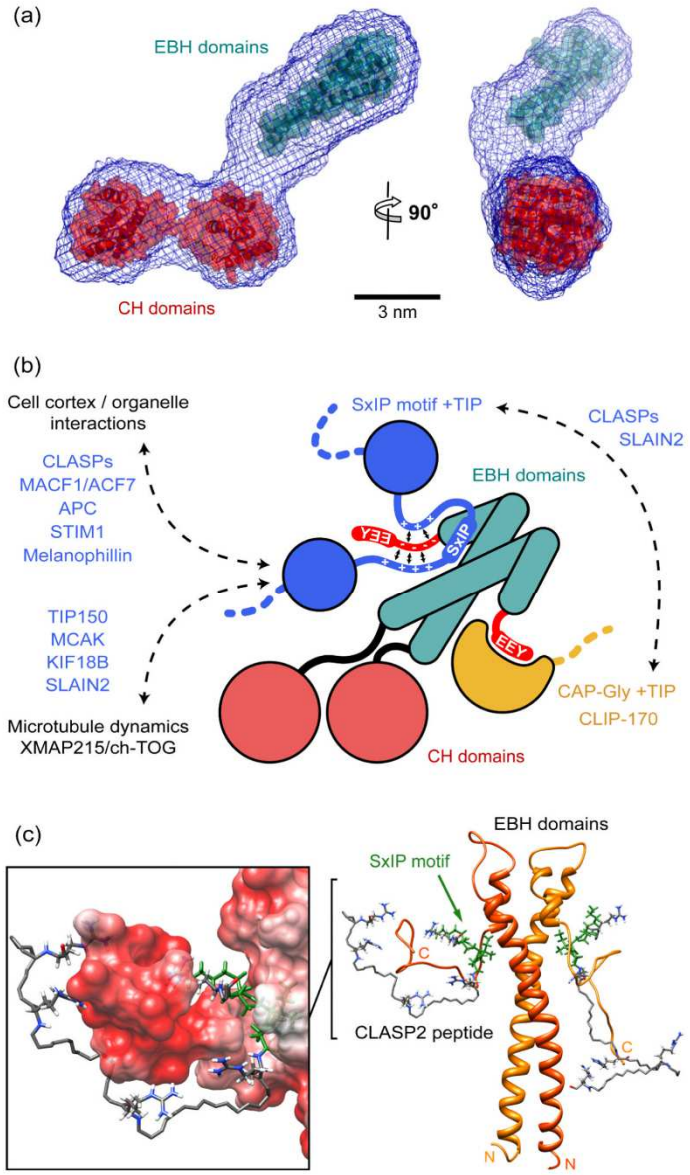

Figura 21: Estructura de EB1 e interacciones. (A) Estructura de EB1 donde se muestra el dominio CH y el dominio EBH. **(B)** Diagrama de la interacción entre EB1 y proteínas +TIPs que contienen las secuencias SxIP o CAP-Gly. **(C)** Interacción del dominio EBH con la secuencia SxIP de los peptidos CLASP2. *Kumar P & Wittman T, 2012. Trends Cell Biol. 8: 418-428.*

6.3 STIM1 como proteína +TIP.

Algunos estudios han puesto de manifiesto la importancia de los microtúbulos en la activación de SOCE y en las funciones en las que está implicado STIM1 dentro del RE (Honnappa et al., 2009; Smyth et al., 2007). STIM1 de hecho es una proteína perteneciente al subgrupo de proteínas +TIPs (Grigoriev et al., 2008). STIM1, presente en el membrana del RE, se une directamente a EB1 cuando los niveles de Ca^{2+} en el lumen del mismo son elevados (Grigoriev et al., 2008; Vaca, 2010). Tras el vaciado de depósitos, STIM1 se disocia de EB1 y se mueve a zonas de unión de la membrana plasmática y el

RE, donde se une directamente a los canales SOC (Sampieri et al., 2009). Más recientemente Asanov y cols. describieron que STIM1 se une a APC mediante una secuencia específica de STIM1 (residuos 680-685), y que esta unión es necesaria para poder anclar a STIM1 en la membrana plasmática y poder activar a ORAI1. Debido a que esta secuencia 680-685 también es la secuencia de unión a EB1, los autores concluyeron que STIM1 debe disociarse de EB1 para asociarse a APC (**Figura 22**) (Asanov et al., 2013).

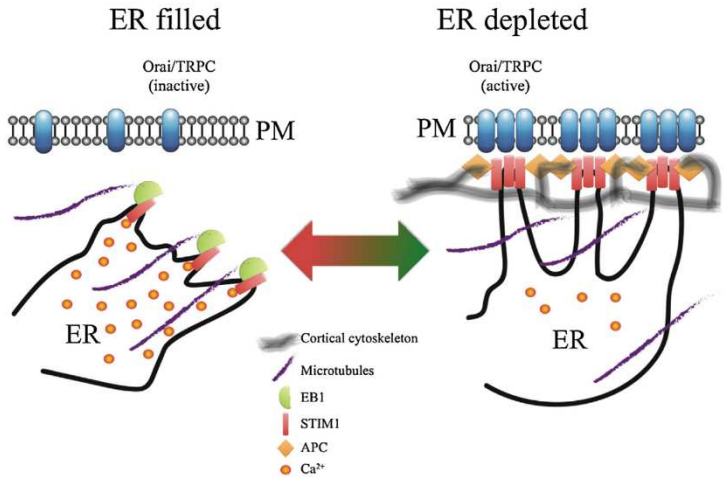

Figura 22: Modelo de mecanismo de interacción entre STIM1, EB1 y APC. Modelo propuesto por Asanov et al. que nos muestra como STIM1 se une a EB1 cuando los depósitos intracelulares están saturados de Ca^{2+}. Tras el vaciado de depósitos, EB1 se disocia de STIM1 y éste se une a APC anclándose a la MP. (*Asanov et al. 2013. Cell Calcium 54: 246-256).*

7. TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA (TEM).

7.1 Características y diferencias entre células epiteliales y mesenquimales.

Las células epiteliales presentan las siguientes características (Larue and Bellacosa, 2005):

- Células planas con forma cuboidal.
- Existe una interacción cohesiva entre células, lo que permite el desarrollo de una capa de células continuas.
- En las células epiteliales se distinguen tres dominios de membrana: apical, basal y lateral.

- Existe una polarización ápico-basal, que es evidenciada por la distribución de los distintos orgánulos y de componentes del citoesqueleto.
- Pérdida de movilidad individual de las células epiteliales con respecto al medio extracelular.

Las células mesenquimales presentan las siguientes características:

- Células con morfología fusiforme, completamente irregular sin uniformidad ni en la composición ni en la densidad.
- Pérdida de la interacción entre células.
- No hay una clara diferencia entre la membrana apical y lateral.
- No aparece polarización ápico-basal de orgánulos y componentes del citoesqueleto.
- Las células mesenquimales tienen una gran movilidad pudiendo incluso tener propiedades invasivas.

7.2 Definición de TEM.

Durante el desarrollo embrionario y también durante la progresión ttumoral ciertas células pueden cambiar de fenotipo epitelial a mesenquimal mediante un evento estrechamente regulado y definido conocido como transición epitelio-mesénquima (TEM) (Radisky and Bissell, 2006). La TEM es un mecanismo celular muy importante durante el desarrollo embrionario. En mamíferos este proceso ocurre en fases muy tempranas del desarrollo, observándose por primera vez durante la pre-implantación con la formación del trofoectodermo y posteriormente en la gastrulación con la formación del mesodermo. La TEM también ocurre durante la formación de la cresta neural, remodelación de tejidos y el desarrollo de órganos (Thiery, 2002; Zeisberg et al., 2005).

Durante la TEM se observan alteraciones morfológicas y cambios en la adhesión y capacidad de migración celular. Una caracteristica molecular crítica de la TEM es la regulación negativa de E-cadherina, una glicoproteína transmembranal implicada en uniones célula a célula (Gumbiner, 2005), con la consiguiente inducción de la expresión de N-cadherina (Lee et al., 2006). Por ello E-cadherina es un buen marcador de células epiteliales, mientras que las células mesenquimales se identifican con la utilización de algunos marcadores moleculares entre los que destacan N-cadherina, vimentina, localización nuclear de β-catenina y aumento de la producción de factores de crecimiento como Snail1, Snail2, Twist, EF1/ZEB1, SIP1/ZEB2 que inhiben la producción de E-cadherina (**Figura 23**). Los marcadores fenotípicos de TEM incluyen tanto el aumento en

la capacidad de migración como incremento de la capacidad de invasión en matrices extracelulares tridimensionales. La regulación negativa de E-cadherina se ha considerado un paso desencadente en este proceso. Esta regulación negativa puede venir mediada a nivel de RNAm o a nivel de proteína, es decir, mediante cambios en la distribución subcelular, translocación y degradación. Snail es uno de los responsables de la TEM mediante la represión de marcadores epiteliales, como E-cadherina y la indución de la expresión de otros marcadores mesenquimales (Cano et al., 2000).

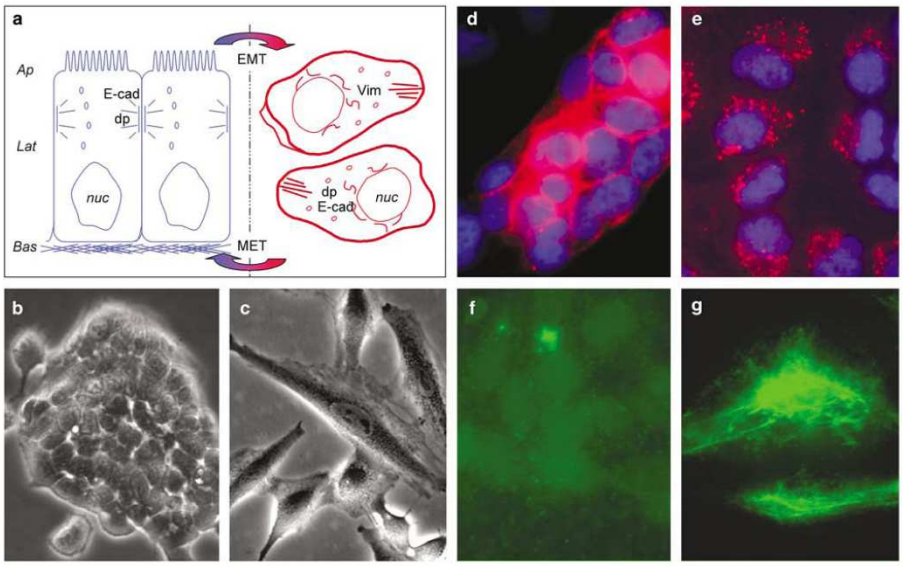

Figura 23: Modificaciones celulares asociadas a la transición epitelio-mesénquima (TEM). (A) Esquema de la TEM en el que las células epiteliales (en azul) se unen unas a otras mediante uniones adherentes usando E-cadherina (E-cad) y desmosomas constituidos por varias proteínas como desmoplaquina (dp). Células mesenquimales (en rojo) muestran E-cadherina en vesículas perinucleares y la desmoplaquina es internalizada. En estas células es observable la vimentina como componente del citoesqueleto (vim). **(B-G)** Línea celular SCC15 tras tratamiento con AKT (c, e y g) para inducir TEM. (rojo: E-cadherina; verde: vimentina). (*Larue L. & Bellacosa A. 2005. Oncogene 24:7443-7454).*

Varios factores de crecimiento inducen TEM mediante su unión a receptores tirosina quinasas. Entre estos factores de crecimiento implicados en TEM tenemos el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y TGFα/β (Lee et al., 2006; Lee et al., 2008; Savagner, 2001). Finalmente, y de interés en lo que respecta a este trabajo, otro de estos factores es EGF (Lee et al., 2008).

OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo han sido:

1.- Evaluación del estado de fosforilación in vivo de la proteína STIM1 en los residuos Ser575, Ser608 y Ser621.

2.- Análisis de la activación de STIM1 tras la fosforilación de los residuos diana de ERK1/2, en distintos tipos celulares y tras el tratamiento con tapsigargina o con el factor de crecimiento epidérmico (EGF).

3.- Implicación de la fosforilación de STIM1 en la migración de células de adenocarcinoma endometrial, así como en el proceso de transformación de fenotipo epitelio-mesénquima.

4.- Estudio del efecto del resveratrol sobre la fosforilación de STIM1 en los residuos Ser575, Ser608 y Ser621 así como su implicación en la movilización de Ca^{2+} intracelular.

RESULTADOS

1. EL VACIADO DE LOS DEPÓSITOS INTRACELULARES DE Ca^{2+} INDUCE LA FOSFORILACIÓN DE STIM1.

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que STIM1 es fosforilado *in vitro* por las quinasas ERK1/2 (Pozo-Guisado et al., 2010). Este estudio puso de manifiesto que la fosforilación de STIM1 en los sitios diana de ERK1/2 (Ser575, Ser608 y Ser621) es necesaria para una completa activación de SOCE. Así, la sobreexpresión del mutante de STIM1 en el que se sustituye estas serinas por alaninas (FLAG-STIM1-S575A/S608A/S621A) provoca una inhibición de SOCE en células HEK293. El siguiente paso en nuestra investigación ha sido llevar a cabo un estudio de la fosforilación de STIM1 *in vivo* durante la activación de SOCE. Para ello se han desarrollado anticuerpos fosfoespecíficos para STIM1 frente los residuos fosforilados Ser575, Ser608 y Ser621, en colaboración con la *Division of Signal Transduction and Therapy (DSTT)* de la Universidad de Dundee. Para estudiar la fosforilación de STIM1 *in vivo* se utilizó la línea celular HEK293 Flp-In T-REx transfectadas de modo estable para la expresión inducible de STIM1. La fosforilación de STIM1 fue analizada en células en reposo y en células tratadas con el inhibidor de la SERCA tapsigargina (Tg), que induce el vaciado de los depósitos intracelulares de Ca^{2+}. En la **Figura 24** podemos observar que el vaciado de depósitos inducido por Tg provoca un aumento significativo de fosforilación de STIM1 en las Ser575, Ser608 y Ser621. Para confirmar la especificidad de los anticuerpos fosfo-específicos se utilizaron lisados de células HEK293 que sobreexpresan una versión de STIM1 mutada en la que se sustituyen las serinas de estos residuos por alaninas (FLAG-STIM1-S575A/S608A/S621A), observándose la ausencia de señal frente a los anticuerpos fosfo-específicos. Para demostrar que la expresión de STIM1 total era igual en todas las condiciones ensayadas se analizó el nivel de expresión de esta proteína utilizando un anticuerpo anti-STIM1.

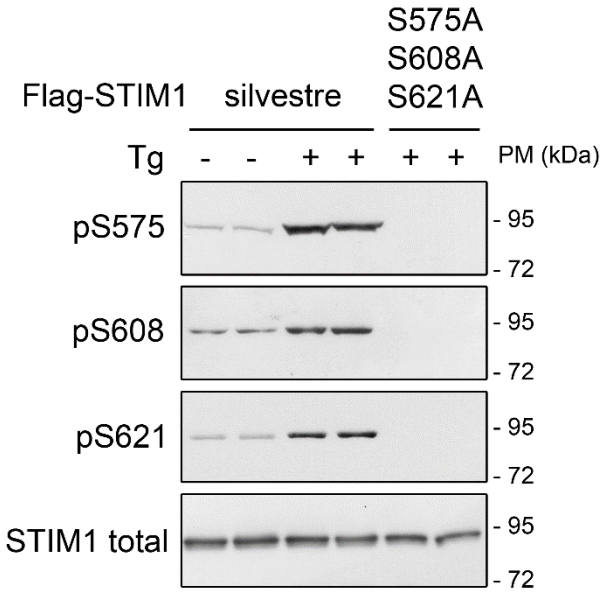

Figura 24: Fosforilación *in vivo* de STIM1 en las Ser575, Ser608 y Ser621. Las células HEK293 Flp-In-T-REx transfectadas de modo estable e inducible para la expresión de STIM1-wild type o STIM1-S575A/S608A/S621A, se mantuvieron 8 h en medio de cultivo libre de FBS y se trataron con Tg 1 µM en HBSS libre de Ca^{2+} durante 10 min. Los lisados totales se utilizaron para determinar por inmunoblot la fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2 (pS575, pS608 y pS621). Como control de carga se analizó la expresión de STIM1 total con un anticuerpo comercial anti-STIM1.

Por otro lado se estudió el efecto de los inhibidores PD0325901 y PD184352, inhibidores específicos de MEK1/2, ya que estas quinasas son responsables de la activación de ERK1/2 por fosforilación (Bain et al., 2007). En la **Figura 25** se observa que al inhibir las quinasas ERK1/2 disminuye el nivel de fosforilación de STIM1 en los residuos Ser575, Ser608 y Ser621. Este resultado nos permite concluir que el vaciado de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} induce la fosforilación de STIM1 en las Ser575, Ser608 y Ser621 *in vivo* y que las quinasas responsables de dicha fosforilación son las quinasas ERK1/2.

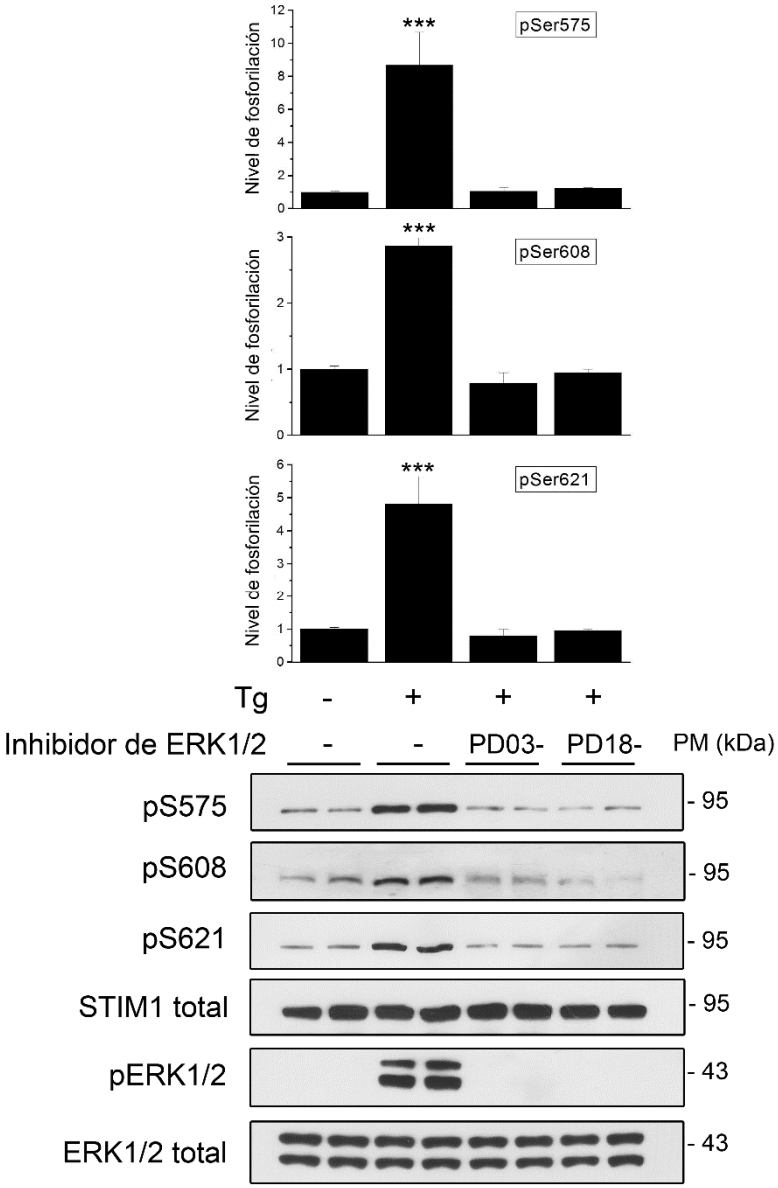

Figura 25: Inhibición de la fosforilación de STIM1 en las Ser575, Ser608 y Ser621. Las células HEK293 Flp-In-T-REx transfectadas de modo estable e inducible para la expresión de STIM1 (wt), tras 8 h en medio de cultivo libre de FBS, se trataron con Tg 1 μM en HBSS libre de Ca^{2+} durante 10 min. Para inhibir ERK1/2 las células se preincubaron con PD0325901 0,1 μM o PD184352 2 μM durante 10 minutos antes del tratamiento con Tg 1 μM. La activación de ERK1/2 se determinó con un anticuerpo específico anti-pThr202/pTyr204 ERK1/2 (marcado como pERK1/2). Como control de carga se utilizó un anticuerpo anti-ERK1/2 total. Los lisados totales se utilizaron para determinar por inmunoblot la fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2 (pS575, pS608 y pS621). La cuantificación de los niveles de fosforilación se llevó a cabo por densiometría de la películas fotográficas usando para ello el software ImageJ. ***p<0,001.

2. MULTIMERIZACIÓN DE STIM1-GFP.

Otro evento importante para la activación de SOCE es la multimerización de STIM1. En células en reposo STIM1 presenta una localización reticular debido a su distribuición homogénea por las cisternas del retítulo endoplasmático (RE). Sin embargo, cuando disminuyen los niveles de Ca^{2+} en el RE STIM1 se activa y oligomeriza formando agregados y favoreciendo la relocalización de STIM1 en zonas de la membrana plasmática dónde activa canales SOCs. Para estudiar la activación de STIM1 en nuestro sistema de trabajo decidimos analizar la multimerización de STIM1-GFP tras el vaciado de depósitos intracelulares de Ca^{2+} inducido por Tg. Para ello utilizamos células HEK293 transfectadas de modo estable para la expresión de STIM1-WT-GFP, y se trataron con Tg (1 μM) en HBSS libre de Ca^{2+} durante 3 minutos. En la **Figura 26** podemos observar como STIM1-GFP multimeriza tras el vaciado de depósitos en un 50-60% de las células. De este modo, podemos concluir que en la línea celular de estudio, STIM1 sobreexpresado con el tag GFP responde al vaciado de depósitos y que por tanto es completamente funcional.

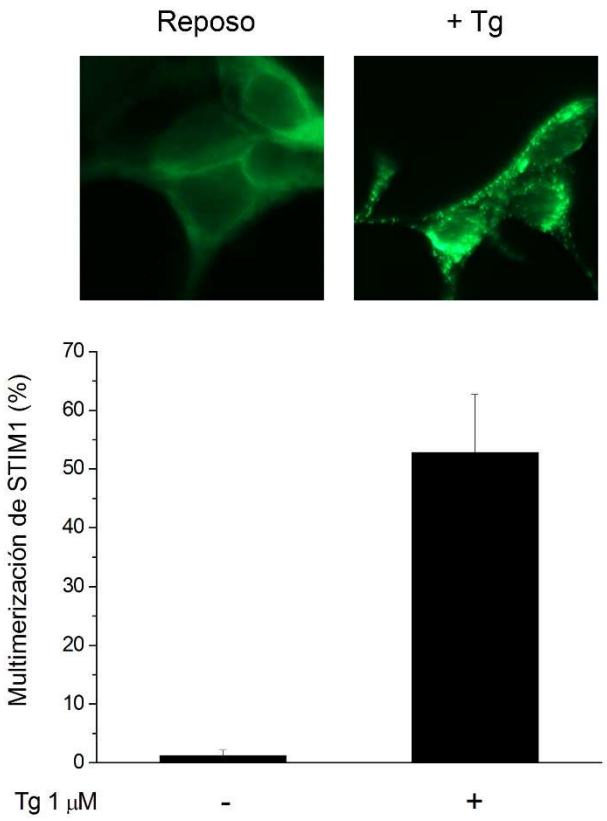

Figura 26: Multimerización de STIM-WT-GFP tras el vaciado de depósitos intracelulares de Ca^{2+}. Células HEK293 transfectadas de modo estable con STIM1-GFP, se tratataron con Tg 1 μM en HBSS libre de Ca^{2+} durante 3 minutos a 37ºC y se fijaron con paraformaldehido al 4%. En las imágenes se muestra STIM1-GFP en reposo y multimerizado tras el tratamiento con Tg. El porcentaje de células que presentan una marcada multimerización de STIM1 (multímeros > 0,2 μm) se calculó con en un mínimo de 200 células a partir de 3 ensayos independientes.

Del mismo modo, otros experimentos desarrollados en nuestro laboratorio han puesto de manifiesto que la cinética de multimerización de STIM1 se ve afectada por la fosforilación de STIM1 en los sitios diana de las quinasas ERK1/2. En estos experimentos se utilizaron células HEK293 que sobreexpresaban STIM1, STIM1-S575A/S608A/S621A-GFP (simulando así una desfosforilación constitutiva) y STIM1-S575E/S608E/S621E-GFP (simulando una fosforilación constitutiva). Así se observó que en los mutantes Ser/Ala se ralentizaba la cinética de multimerización, mientras que en los mutantes Ser/Glu la multimerización ocurría con una cinética mucho más rápida (Pozo-Guisado et al., 2013). Estos resultados nos permitieron concluir que la fosforilación de STIM1 en los sitios diana de ERK1/2 modula la multimerización de STIM1 en respuesta al vaciado de depósitos.

3. FOSFORILACIÓN DE STIM1 Y UNIÓN A EB1.

Los aminoácidos Ser575, Ser608 y Ser621 están localizados en un dominio de STIM1 rico en serinas y prolinas, dominio con una función no descrita hasta la fecha. Además, estos residuos se encuentran cerca de la secuencia Thr-Arg-Ile-Pro (TRIP) (**Figura 27**), que incluye los aminoácidos 642-645, y que constituyen el dominio de unión al regulador de microtúbulos EB1. Se conoce que STIM1 es una proteína de unión a extremos crecientes de los microtúbulos (+TIP) y que al igual que otras proteínas de unión a microtúbulos, STIM1 se une directamente a EB1 a través de la secuencia TRIP, regulando así su localización celular (Grigoriev et al., 2008). Por otro lado se ha descrito que en otras proteínas +TIP se regula la unión a EB1 mediante fosforilación en sitios próximos a la secuencia S/TxIP, secuencia consenso de unión a EB1 (Tamura and Draviam, 2012; Watanabe et al., 2009; Zumbrunn et al., 2001). Por esta razón nos hemos planteado la hipótesis de que la fosforilación de STIM1 en los sitios diana de ERK1/2 podría estar regulando la interacción con EB1 debido a su proximidad a la secuencia TRIP.

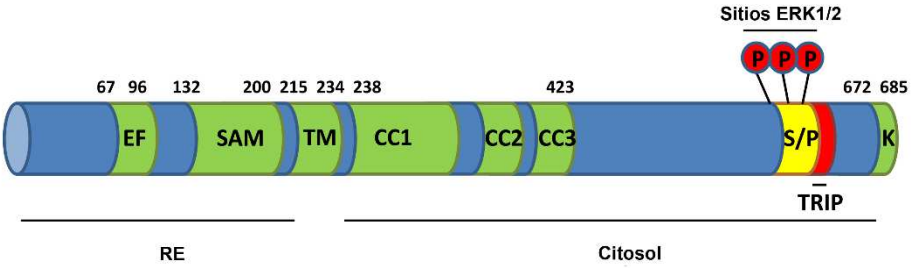

Figura 27: Esquema de STIM1. En este esquema se muestra el dominio S/P, dominios ricos en Ser/Pro que contiene los residuos Ser575, Ser608 y Ser621, y la secuencia TRIP de unión a EB1 (secuencia Thr642-Arg643-Ile644-Pro645), para mostrar la posición relativa de los sitios diana de ERK1/2 y la secuencia TRIP.

Para estudiar en profundidad la interacción de STIM1 y EB1 hemos transfectado EB1 marcado con HA (hemaglutinina) en células HEK293 que expresan de forma estable STIM1-GFP. A continuación hemos llevado a cabo un ensayo de precipitación de GFP para precipitar STIM1-GFP y analizar la cantidad de proteína HA-EB1 co-precipitada. De este modo se analizó la co-precipitación de STIM1 y EB1 en células en reposo o células tratadas con Tg en medio libre de Ca^{2+}, tal y como se ha descrito en apartados anteriores, para inducir el vaciado d elos depósitos intracelulares. Por otro lado se utilizaron tres líneas celulares diferentes transfectadas de forma estable con: (1) STIM1-GFP; (2) STIM1-S575A/S608A/S621A-GFP que contiene la mutación Ser/Ala simulando el estado desfosforilado de la proteína en estos residuos; y (3) STIM1-S575E/S608E/S621E-GFP que contiene la mutación Ser/Glu simulando una fosforilación constitutiva de la proteína en estos residuos. En paralelo se transfectaron células que expresan sólo la proteína GFP y HA-EB1 como control negativo de los ensayos de co-precipitación (**Figura 28 – panel A**). Cuando analizamos la co-precipitación de STIM1 y EB1 en la línea celular que expresa STIM1-wt se observó un descenso significativo de HA-EB1 coprecipitado en células tratadas con Tg con respecto a las células en reposo. Estos resultados concuerdan con los datos publicados en los que se demostraba la disociación de STIM1 y EB1 tras el vaciado de depósitos intracelulares (Sampieri et al., 2009). Por otro lado, cuando se analizó el nivel de HA-EB1 co-precipitado con STIM1-S575A/S608A/S621A-GFP no se observó ninguna diferencia entre células en reposo y células tratadas con Tg, y en ambos casos se observó un nivel co-precipitado similar al de las células que expresaban STIM1-wt en reposo. Estos datos sugieren que la desfosforilación de STIM1 en las serinas Ser575, Ser608 y Ser621 promueve la unión a EB1. Además estos resultados concuerdan con lo observado con STIM1-wt-GFP, en el

cual encontramos niveles elevados de STIM1-EB1 co-precipitado en células en reposo, es decir cuando STIM1 está mayoritariamente desfosforilado en los sitios diana de ERK1/2. Finalmente STIM1-S575E/S608E/S621E-GFP no se une a EB1 bajo ninguna condición experimental, lo que confirma que la fosforilación de STIM1 en los sitios diana de ERK1/2 induce la disociación de EB1, hecho observado durante el vaciado de depósitos intracelulares en células que expresan STIM1-wt. Como control de este experimento se muestran los paneles inferiores de la **Figura 28A**, en lo que se muestra que la expresión de HA-EB1 es homogénea en las distintas condiciones experimentales. Para comprobar la completa activación de STIM1 por fosforilación decidimos analizar también el nivel de fosforilación de STIM1 en la serina 575, comprobando así un aumento de fosforilación tras el tratamiento con Tg en los lisados totales.

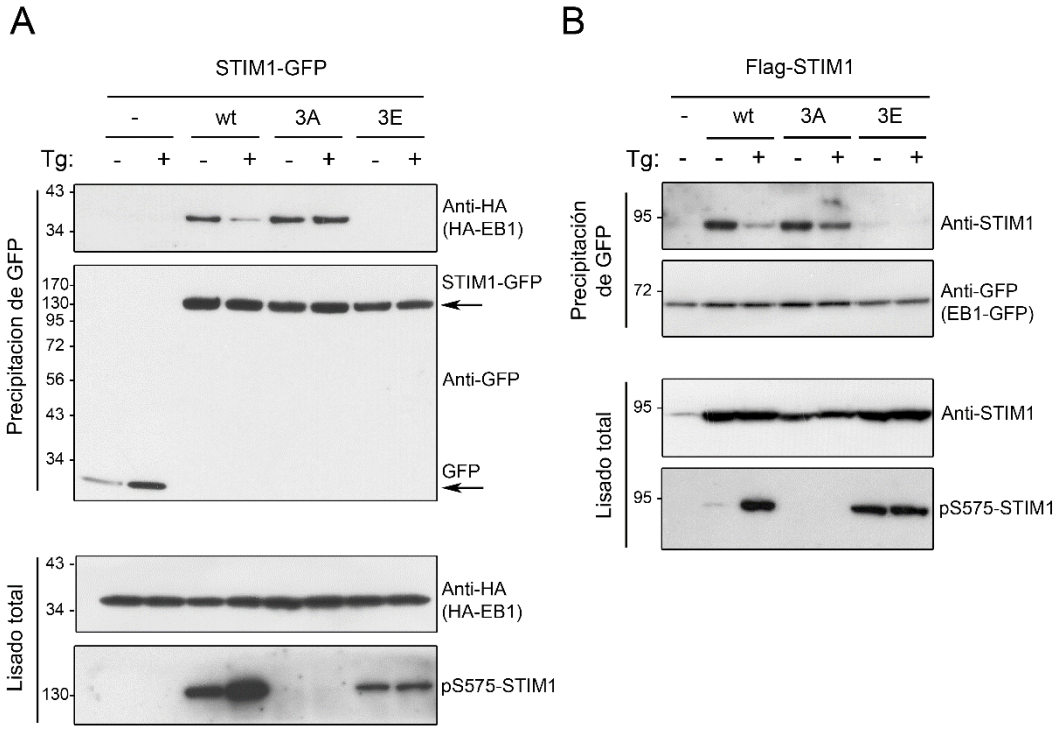

Figura 28: La fosforilación de STIM1 en las Ser575, Ser608 y Ser621 regula la unión a EB1. (A) Las células HEK293 que expresan STIM1-GFP (WT, S575A/S608A/S621A o S575E/S608E/S621E marcadas como WT, 3A y 3E respectivamente) se transfectaron de modo transitorio con HA-EB1 y se incubaron en HBSS con Ca^{2+} (- Tg) o en HBSS libre de Ca^{2+} con 1 μM de Tg durante 10 minutos (+ Tg). Para estudiar la unión de EB1 a STIM1 se precipitó STIM1-GFP utilizando resinas de GFP-Trap y se analizaron los niveles de HA-EB1 co-precipitado por inmunoblot con un anticuerpo anti-HA. Los niveles de STIM1-GFP precipitados se evaluaron con un anticuerpo anti-GFP. Como control negativo se utilizaron células que sobreexpresaban la proteína GFP. Para determinar la cantidad total de HA-EB1 expresada en cada condición se utilizaron lisados totales. Finalmente para determinar la activación de STIM1 mediante el vaciado de depósitos hemos evaluado el nivel de fosforilación de STIM1 en el residuo Ser575, utilizando un anticuerpo especifico anti-fosfoSer575-STIM1. **(B)** Las células HEK293 que expresan FLAG-STIM1 (wt, 3A o 3E) se transfectaron para la expresión transitoria de EB1-GFP. Como en el panel A, se utilizaron células en reposo (- Tg) o tratadas con Tg (+ Tg). EB1-GFP se precipitó y se evaluaron los niveles de STIM1 co-precipitado con un anticuerpo anti STIM1. El nivel de EB1-GFP co-precipitado se analizó con un anticuerpo anti-GFP. Como control negativo utilizamos células que sobreexpresaban el péptido FLAG. Al igual que en el panel A hemos evaluado el nivel de fosforilación de STIM1 en el residuo Ser575 con un anticuerpo específico.

Para corroborar nuestras conclusiones decidimos seguir una estrategia alternativa en siguientes experimentos. Para ello se transfectaron con EB1-GFP las líneas célulares HEK293 que expresaban: (1) FLAG-STIM1-wt, (2) FLAG-STIM1-S575A/S608A/S621A y (3) FLAG-STIM1-S575E/S608E/S621E (**Figura 28 – panel B**). A continuación se llevó a cabo un ensayo de precipitación de GFP para precipitar EB1-GFP y analizar la cantidad de proteína FLAG-STIM1 co-precipitada. De este modo se analizó la co-precipitación de STIM1 y EB1 en células tratadas con Tg en medio libre de Ca^{2+} y se comparó con células en reposo (incubadas con HBSS en presencia de Ca^{2+}). Como control del experimento utilizamos células en reposo que no expresaban FLAG-STIM1 y se transfectaron para la expresión de EB1-GFP. En los paneles inferiores podemos observar cómo la expresión de STIM1 en lisados totales era homogénea en todos los grupos de estudio y además podemos corroborar la activación de STIM1 tras el tratamiento con Tg, mediante el nivel de fosforilación de la Ser575. Finalmente con este nuevo diseño experimental pudimos corroborar los resultados observados en la estrategia anterior, mostrada en el **panel A** de la **Figura 28**. Así, el nivel de co-precipitación de Flag-STIM1 con EB1 bajaba tras el tratamiento con Tg. En células que expresaban Flag-STIM1-3A esta disminución era menor y por otro lado, Flag-STIM1-3E prácticamente no co-precipitaba con EB1 en ninguna de las dos condiciones experimentales (reposo y Tg).

Para complementar este estudio se procedió a la inmunolocalización de EB1 endógeno en células que expresaban STIM1-GFP y mediante microscopía confocal se analizó la co-localización de ambas proteínas. Para ello se utilizaron líneas célulares HEK293 que expresaban: (1) STIM1-GFP, (2) STIM1-S575A/S608A/S621A-GFP y (3) STIM1-S575E/S608E/S621E, en reposo o tratadas con Tg y fijadas con paraformaldehido al 4%. A continuación se procedió a la inmunodetección de EB1 endógeno, utilizando un anticuerpo secundario unido al fluoróforo Alexa-Fluor 633 (rojo). STIM1 se detectó gracias a GFP (verde) y la tinción nuclear se llevó a cabo con Hoechst 33342 (azul). Para analizar la colocalización de las dos proteínas se trazó una línea a lo largo de la imagen y se escaneó la intensidad de fluorescencia emitida por los dos fluoróforos **panel A** de la **Figura 29**. A continuación se analizó el solapamiento de ambos fluoróforos, obteniendo de este modo las gráficas que se observan a la derecha del panel A, en las que se muestra la intensidad de fluorescencia frente a la distancia relativa. En el **panel B** de la **Figura 29** se muestra una gráfica con el resultado de la cuantificación de la co-localización de

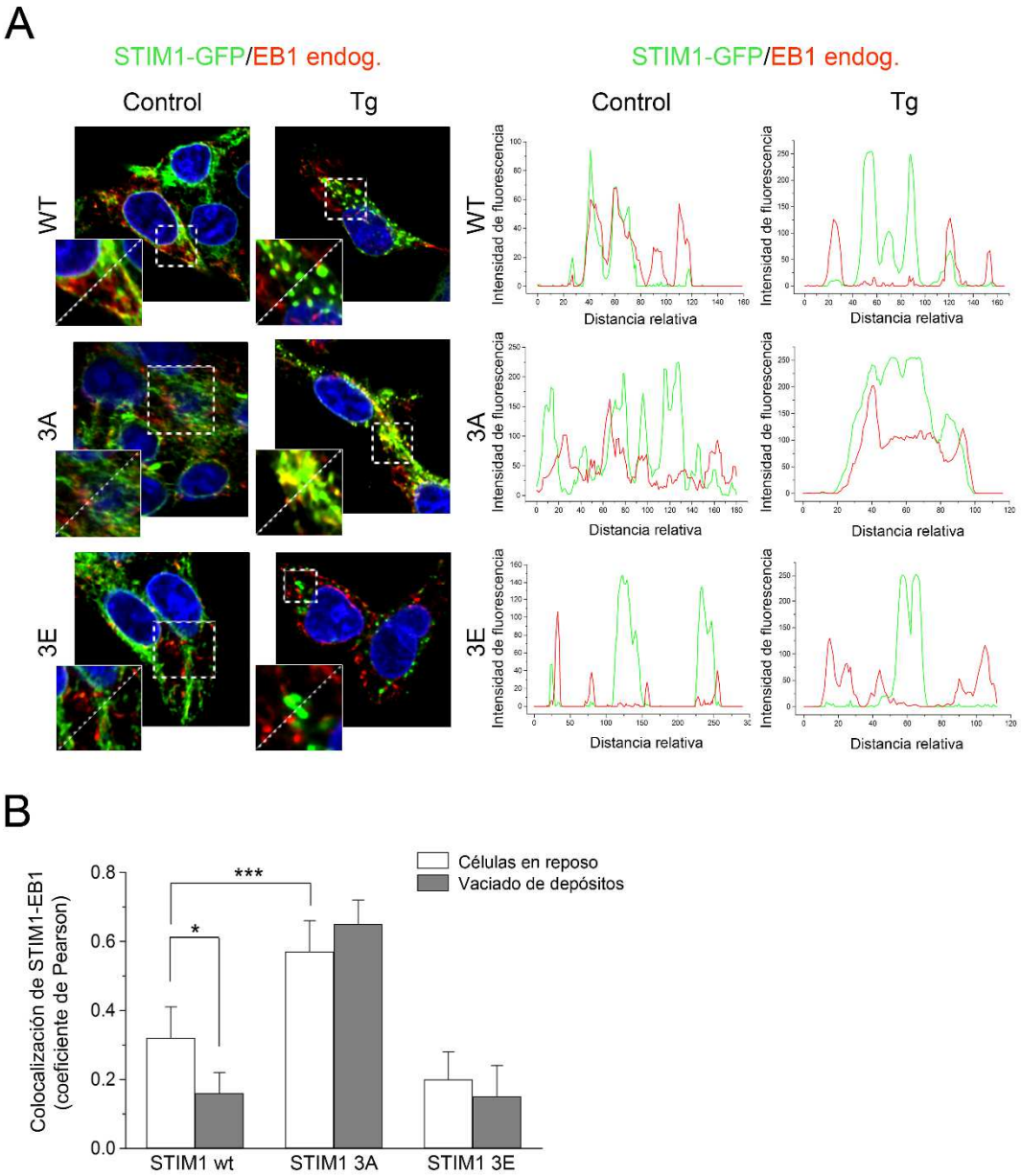

Figura 29: Colocalización de STIM1-EB1 en células HEK293. (A) Izquierda: las células HEK293 que expresan STIM1-GFP (WT, S575A/S608A/S621A o S575E/S608E/S621E marcadas como WT, 3A y 3E respectivamente) se incubaron en HBSS con Ca^{2+} (control) o en HBSS libre de Ca^{2+} con Tg 1 µM durante 10 minutos (+ Tg). Tras la fijación se inmunolocalizó EB1 con un anticuerpo monoclonal anti-EB1 y un secundario marcado con el fluoróforo Alexa-Fluor 633. Se utilizó Hoechst 33342 como tinción nuclear. Derecha: Se muestran los perfiles de intensidad de fluorescencia tras el scan de un trazo lineal de la imagen. **(B)** Se evaluó la colocalización de STIM1-EB1 mediante la utilización del coeficiente de Pearson usando un mínimo de 12 imágenes por condición experimental. *p<0,005, ***p<0,001.

STIM1-EB1. Los resultados de este experimento revelan que la co-localización de STIM1-EB1 fue relativamente elevada hasta que se produce el vaciado de depósitos por Tg, momento en el que deja de observarse una colocalización significativa, lo que

corrobora los resultados observados por co-inmunoprecipitación. Por otro lado, la disociación de STIM1-EB1 tras el vaciado de depósitos intracelulares no fue evidente para el mutante S/A (STIM1-S575A/S608A/S621A-GFP), mientras que la co-localización de STIM1-EB1 en células que expresan STIM1-S575E/S608E/S621E-GFP fue muy baja tanto en células en reposo como en células tratadas con tapsigargina.

4. ACTIVACIÓN DE ERK1/2 MEDIADA POR EGF.

Hasta ahora hemos observado que STIM1 es fosforilado por las quinasas ERK1/2 en las serinas 575, 608 y 621 tras el vaciado de depósitos intracelulares inducido por Tg, que es un inhibidor de la SERCA que impide el rellenado de depósitos de Ca^{2+} de forma irreversible. El siguiente paso en nuestra investigación fue buscar un estímulo más fisiológico capaz de activar las quinasas ERK1/2 y determinar si se estimula la fosforilación y activación de STIM1. El estímulo seleccionado fue el factor de crecimiento epidérmico (EGF), que está descrito que activa la ruta de señalización Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2. Para determinar el efecto de la activación de STIM1 por EGF se eligió la línea celular Ishikawa, una línea celular de adenocarcinoma endometrial humano.

Para comenzar con este nuevo objetivo buscamos unas condiciones de cultivo que nos permitieran estudiar la fosforilación de STIM1 en ausencia de actividad ERK1/2 o tras su activación con EGF. Para ello se ensayaron diferentes condiciones de cultivo y se analizó la fosforilación de ERK1/2 utilizando un anticuerpo fosfo-específico. En la **Figura 30** podemos observar que ERK1/2 se encuentra fosforilado en el medio habitual de cultivo para estas células (DMEM suplementado con 5% de suero) así que se analizó el nivel de fosforilación de ERK1/2 en (1) RPMI1640 libre de rojo fenol sin suero, (2) DMEM sin suero, (3) RPMI1640 libre de rojo fenol suplementado con suero libre de hormonas. Los resultados muestran que las células Ishikawa deprivadas de suero durante 12 horas en medio DMEM presentan un nivel basal de activación de ERK1/2. Lo mismo ocurrió con aquellas células cultivadas en RPMI1640 suplementado con FBS que había sido tratado con carbón activo para eliminar hormonas presentes en el suero. Sin embargo, las células Ishikawa cultivadas 12 horas en RPMI1640 libre de rojo fenol, tienen inactivadas las quinasas ERK1/2. Para determinar si la incubación de las células con los diferentes medios de cultivo afectaba al nivel total de ERK1/2 se utilizó un anticuerpo

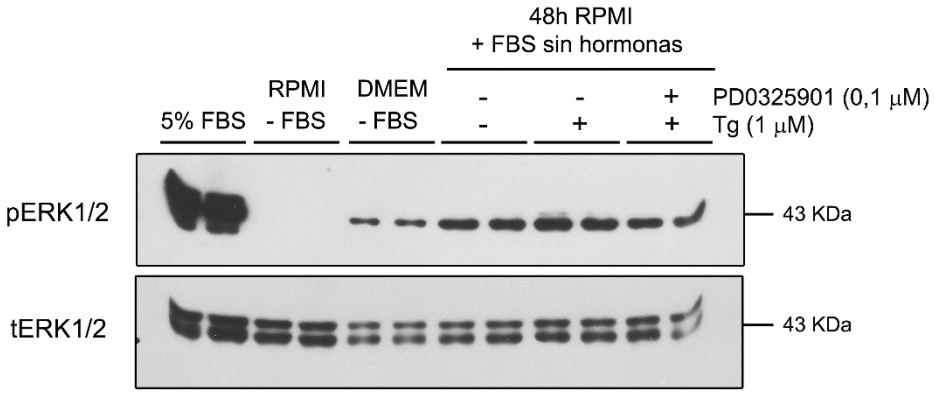

Figura 30: Optimización del medio de cultivo que mantenga una baja actividad de ERK1/2. Las células Ishikawa se cultivaron en DMEM suplementado con 5% de FBS (primer par de calles), despúes se cambio a medio libre de FBS y libre de rojo fenol como es el medio RPMI1640 y se dejaron en cultivo durante 12 horas (segundo par de calles), medio libre de suero pero en presencia de rojo fenol (DMEM) durante 12 horas (tercer par de calles); y células Ishikawa cultivadas en medio RPMI1640 que contenía FBS tratado con carbón activo, y que además fueron tratadas con Tg 1 μM así como con el inhibidor de ERK1/2 PD0325901. Los lisados totales (20 μg de proteína) se sometieron a electroforesis y mediante inmunoblot se detectó anti-fosfo-Thr202/Tyr204-ERK1/2 (marcado como pERK1/2) y como control de carga se utilizó un anticuerpo específico anti-ERK1/2 total (marcado como tERK1/2).

específico que detecta ERK1/2 total, observándose el mismo nivel de proteína en todas las condiciones ensayadas. Por tanto, consideramos que la incubación de las células con RPMI1640 libre de rojo fenol y deprivadas de suero era la condición idónea para trabajar con ERK1/2 inactivo y poder así compararlo con ERK1/2 activo tras la estimulación de las células con EGF.

Una vez establecido el protocolo de cultivo de las células Ishikawa, estudiamos la activación de ERK1/2 mediada por el tratamiento de EGF. Para ello las células Ishikawa deprivadas de suero durante 12 horas en RPMI1640 se trataron con diferentes concentraciones de EGF (10, 50 y 100 ng/ml) en medio HBSS libre de Ca^{2+} (**Figura 31**), y mediante inmunoblot se detectó la activación de ERK1/2 mediante la monitorización de fosfo-ERK1/2. Así pudimos comprobar que el tratamiento con EGF activaba ERK1/2 y además el nivel de fosforilación era similar en todas las concentraciones de EGF

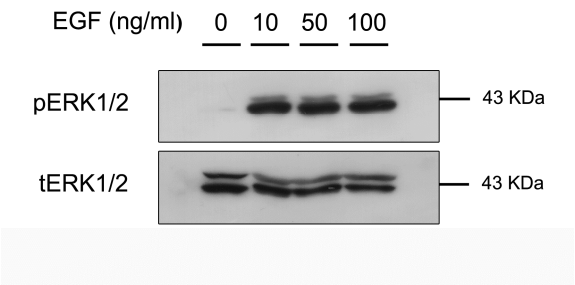

Figura 31: Activación de ERK1/2 por EGF. Células Ishikawa se trataron con EGF 10, 50 y 100 ng/ml en HBSS libre de Ca^{2+}, tras ser cultivadas en RPMI1640 libre de FBS durante 12 horas. Los lisados totales (20 μg de proteína) fueron sometidos a electroforesis e inmunoblot para la deteccion de fosfo-Thr202/Tyr204-ERK1/2 (marcado como pERK1/2). Como control de carga se utilizó un anticuerpo específico anti-ERK1/2 total (marcado como tERK1/2).

ensayadas, por lo que decidimos utilizar 10 ng/ml de EGF para la realización de este estudio.

Para determinar la cinética de activación de ERK1/2 mediada por EGF 10 ng/ml analizamos el nivel de fosfo-ERK1/2 a distintos tiempos de tratamiento (1, 3, 5 y 10 minutos) (**Figura 32**). Así pudimos ver como entre 5 y 10 minutos teniamos una buena respuesta de activación de ERK1/2, estableciendo así como protocolo habitual el tratamiento con 10 minutos de 10 ng/ml de EGF en HBSS libre de Ca^{2+}.

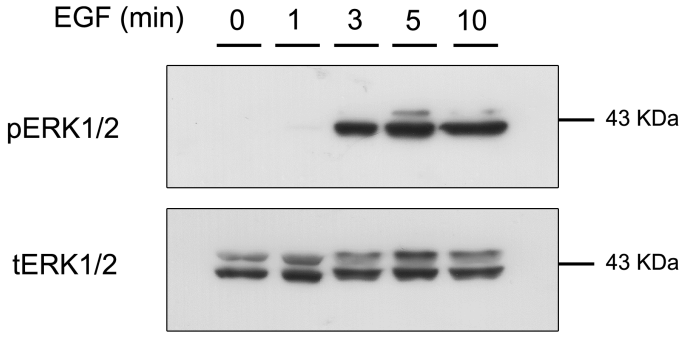

Figura 32: Cinética de activación de ERK1/2 por EGF. Las células Ishikawa se trataron con EGF 10 ng/ml en HBSS libre de Ca^{2+} durante distintos tiempos (entre 1-10 minutos) tras ser cultivadas en RPMI1640 libre de FBS durante 12 horas. Los lisados totales (20 µg de proteína) fueron sometidos a electroforesis e inmunoblot para la deteccion de fosfo-Thr202/Tyr204-ERK1/2 (marcado como pERK1/2). Como control de carga se utilizó un anticuerpo específico anti-ERK1/2 total (marcado como tERK1/2).

Posteriormente nos planteamos comparar el nivel de activación de ERK1/2 tras el tratamiento con Tg frente al tratamiento con EGF. Para ello, células Ishikawa deprivadas de FBS en RPMI1640 durante 12 horas se trataron con Tg (1 µM) o con EGF (10 ng/ml) durante 10 minutos a 37ºC en HBSS libre de Ca^{2+}. Los lisados totales se analizaron por inmunoblot mediante la utilización de un anticuerpo anti-fosfo-ERK1/2 (**Figura 33**). Así pudimos observar como la respuesta a EGF, un estímulo mucho más fisiológico, era incluso más intensa que aquella que podiamos observar con Tg.

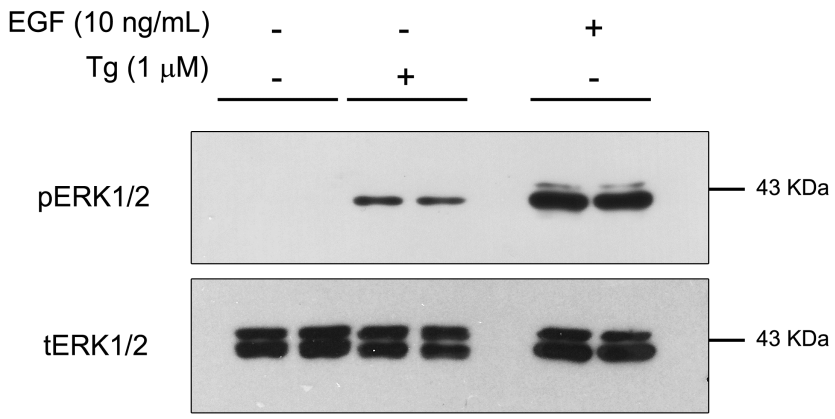

Figura 33: Comparación de la activación de ERK1/2 tras el tratamiento con EGF o Tg. Las células Ishikawa se trataron con Tg 1 μM o con EGF 10 ng/ml en HBSS libre de Ca^{2+} durante 10 minutos tras ser cultivadas en RPMI1640 libre de FBS durante 12 horas. Los lisados totales (20 μg de proteína) fueron sometidos a electroforesis e inmunoblot para la deteccion de fosfo-Thr202/Tyr204-ERK1/2 (marcado como pERK1/2). Como control de carga se utilizó un anticuerpo específico anti-ERK1/2 total (marcado como tERK1/2).

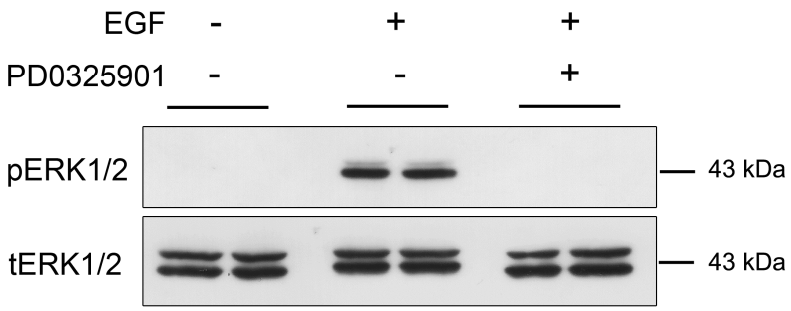

Figura 34: Inhibición de ERK1/2 con PD0325901. Células Ishikawa fueron tratadas con EGF 10 ng/ml en HBSS libre de Ca^{2+} durante 10 minutos. Las células que se trataron con PD0325901 0,5 μM fueron preincubadas con el inhibidor 10 minutos antes de su tratamiento con EGF. Se usaron los lisados totales para evaluar fosfo-ERK1/2 mediante inmunoblot (marcado como pERK1/2). Como control de carga se utilizó un anticuerpo anti-ERK1/2 total (marcado como tERK1/2).

Además, también hemos podido observar que la activación de ERK1/2 inducida por EGF era inhibida por PD0325901 (**Figura 34**). Para comprobar este dato se preincubaron las células durante 10 minutos con PD0325901 0,5 μM y a continuación se les añadió EGF. La fosforilación de ERK1/2 en las células tratadas con EGF en presencia o ausencia del inhibidor de ERK1/2 fue analizada mediante inmunoblot utilizando un anticuerpo anti-fosfo-ERK1/2. Además, utilizando un anticuerpo anti-ERK1/2 se pudo observar que la expresión de ERK1/2 no se vió afectada por dicho inhibidor.

5. EGF PROMUEVE LA FOSFORILACIÓN DE STIM1.

Tras comprobar que ERK1/2 se activa tras el tratamiento con EGF el siguiente paso en nuestro estudio fue analizar la fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2 en células Ishikawa estimuladas con EGF. Para ello hemos usado anticuerpos específicos frente a la fosforilación de los residuos Ser575, Ser608 y Ser621 de STIM1. Anteriormente habiamos demostrado la especificidad de dichos anticuerpos, así como la ausencia de reacción cruzada y la capacidad de no reconocer STIM1 desfosforilado (véase la **Figura 24**). Las células Ishikawa se transfectaron para la expresión transitoria de STIM1-GFP, se trataron con 10 ng/ml de EGF en HBSS libre de Ca^{2+} durante 10 minutos y se compararon con células control (sin EGF). Los lisados totales de estas células se usaron para precipitar GFP (STIM1-GFP) y valorar por inmunoblot el nivel de fosforilación de las Ser575, Ser608 y Ser621 (**Figura 35**). Nuestros resultados muestran un aumento significativo de la fosforilación de STIM1 en estos residuos diana de ERK1/2 tras el tratamiento con EGF, demostrando así que la fosforilación de STIM1 es simultánea a la activación de la ruta de señalización MEK-ERK mediada por EGF. Además esta activación se llevó a cabo en ausencia de Ca^{2+}, es decir, la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular no es necesaria para llevar a cabo la activación de ERK1/2 ni la fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2 bajo estimulación con EGF. Como control de carga se muestra la cantidad total de STIM1 precipitado, determinada mediante la detección del nivel de GFP. Del mismo modo en el panel se muestra también la activación de ERK1/2 utilizando lisados totales de los grupos experimentales. El tratamiento con PD0325901, inhibidor de la activación de ERK1/2, previene la fosforilación de STIM1, demostrando así el papel de ERK1/2 en la fosforilación de STIM1 en células Ishikawa estimuladas con EGF.

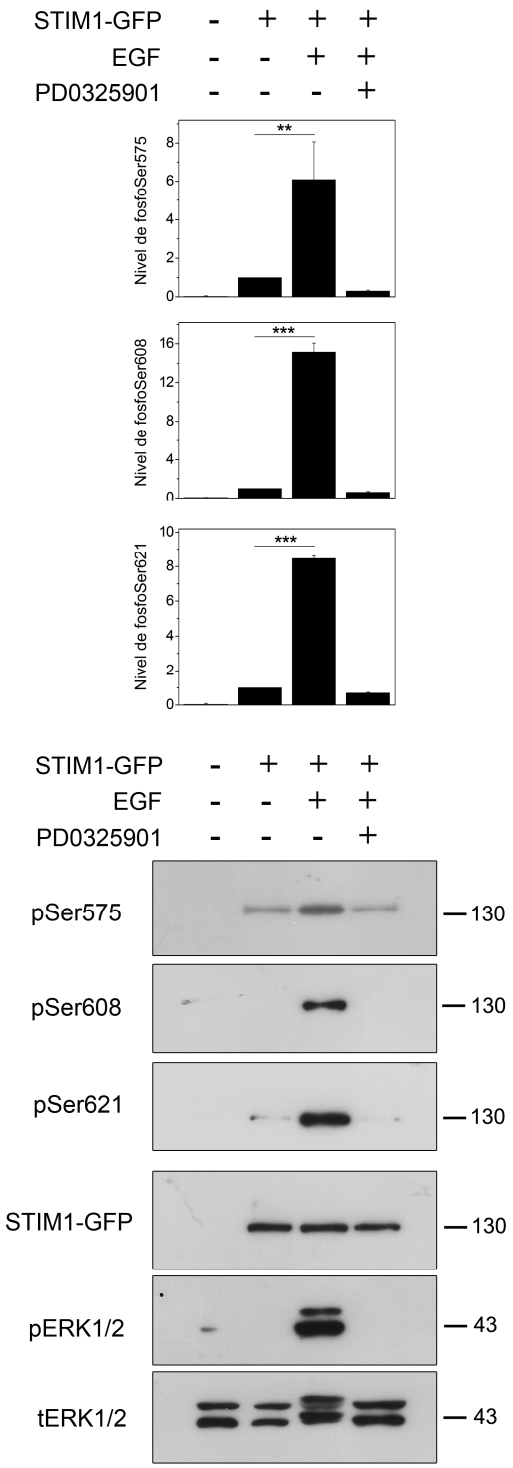

Figura 35: Fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2 mediada por EGF. Las células Ishikawa transfectadas para la expresión transitoria de STIM1-GFP se trataron con EGF 10 ng/ml durante 10 minutos en HBSS libre de Ca^{2+}. Los lisados totales de estas células se utilizaron para precipitar GFP y poder así determinar el nivel de fosforilación de las serinas 575, 608 y 621 de STIM1 mediante inmunoblot. El nivel total de GFP precipitado se evaluó mediante la utilización de un anticuerpo específico anti-GFP. La incubación con PD0325901 (0,5 µM) se llevó a cabo durante 20 minutos antes del lisado. En paralelo se utilizaron lisados totales para determinar el nivel de activación de ERK1/2 (marcado como pERK1/2) y como control de carga se determinó la cantidad total de ERK1/2 (marcada como tERK1/2). Las gráficas muestran la cuantificación de la fosforilación de STIM1 en dichos residuos, cuantificación que se llevó a cabo por densiometria utilizando el software *ImageJ*. **p<0,01; ***p<0,001.

Este resultado fue corroborado activando la ruta Ras-Raf-MEK-ERK por un mecanismo independiente de la estimulación de EGF. Para ello nos planteamos transfectar células Ishikawa para la expresión transitoria de la proteína H-Ras(G12V), un mutante activo de modo constitutivo de H-Ras, que es un mediador esencial de la activación de esta ruta mediada por EGF (Minden et al., 1994). Los lisados totales se utilizaron para precipitar GFP (STIM1-GFP) y poder analizar la fosforilación de las Ser575, Ser608 y Ser621 de STIM1 utilizando anticuerpos fosfo-específicos. En la **Figura 36** podemos observar cómo aumenta la fosforilación de STIM1 en las serinas diana de ERK1/2 en aquellas células que expresan H-Ras(G12V) frente a las células control que no expresan esta proteína. Como control de carga se muestra la cantidad de STIM1 precipitado mediante la utilización de un anticuerpo específico anti-GFP. En este panel podemos observar también la activación de ERK1/2. Además, la fosforilacion de STIM1 por H-Ras(G12V) fue ampliamente atenuada por PD0325901, confirmando así el papel de ERK1/2 en la fosforilación de STIM1 cuando se activa la ruta Ras-Raf-MEK-ERK.

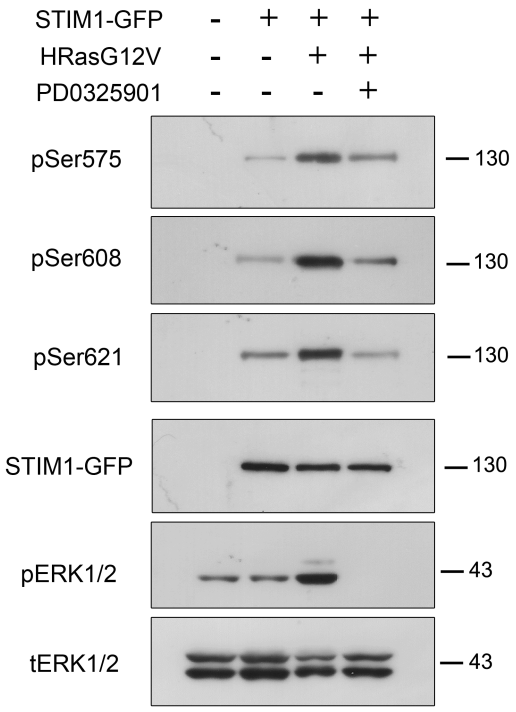

Figura 36: Fosforilación de STIM1 en células que sobreexpresan un mutante activo de HRas (HRas-G12V). Células Ishikawa se co-transfectaron para la expresión transitoria de STIM1-GFP y HRas-G12V. El nivel de fosforilación de STIM1 en los sitios diana de ERK1/2 (Ser575, Ser608 y Ser621) fue analizado por inmunoblot. La incubación con PD0325901 (0,5 μM) se llevó a cabo durante 20 minutos. El nivel total de GFP precipitado se evaluó con la utilización de un anticuerpo espécifico anti-GFP. Los niveles de activación de ERK1/2 (marcado como pERK1/2) así como el control de carga con ERK1/2 total (marcado como tERK1/2) se observan en la parte inferior del panel.

6. EGF PROMUEVE LA DISOCIACIÓN DE STIM1-EB1.

Anteriormente y en este mismo trabajo hemos mostrado cómo la fosforilación de STIM1 en los residuos Ser575, Ser608 y Ser621 provoca la disociación de la proteína reguladora de unión a microtúbulos EB1 en células HEK293 tratadas con Tg 1 μM (véase **Figura 28** y **Figura 29**). Puesto que el tratamiento con EGF inducía un aumento de la fosforilación de STIM1 en estas serinas, nos planteamos estudiar la unión de STIM1 a EB1 en células Ishikawa tratadas con EGF. Para ello, las células Ishikawa fueron transfectadas para la expresión transitoria de EB1-GFP y FLAG-STIM1 que se trataron con EGF 10 ng/ml en HBSS libre de Ca^{2+} durante 10 minutos. Los lisados totales de estas células se utilizaron para precipitar EB1-GFP y se evaluó el nivel de co-precipitación de FLAG-STIM1 mediante inmunoblot. En la **Figura 37** podemos observar cómo la estimulación con EGF provoca la disociación de STIM1 y EB1. Se muestra también la

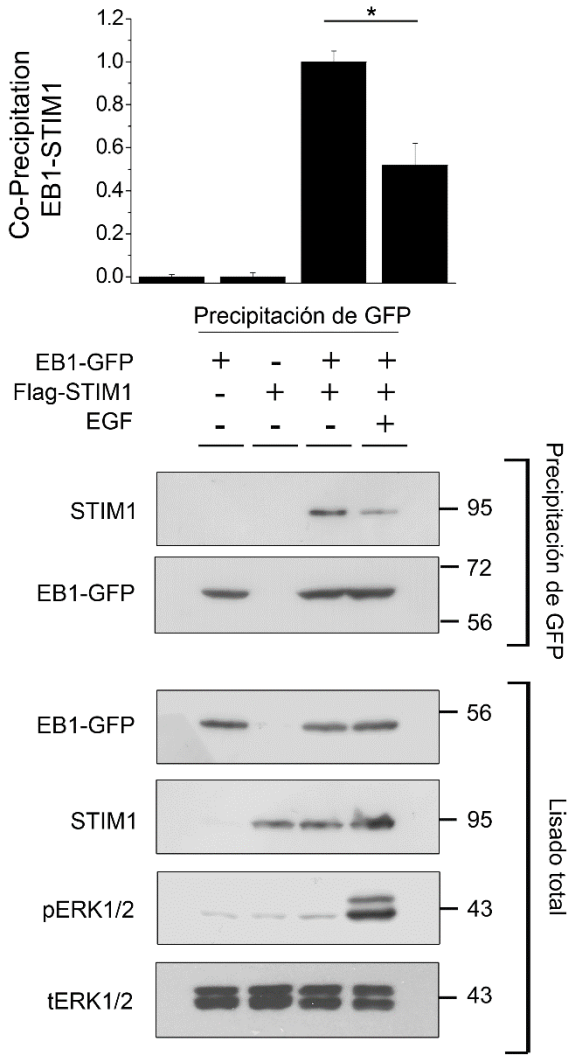

Figura 37: EGF induce la disociación del complejo EB1-STIM1. Las células Ishilkawa se transfectaron para la expresión transitoria de EB1-GFP y FLAG-STIM1. Tras 24 horas, las células se trataron con EGF 10 ng/ml en HBSS libre de Ca^{2+} durante 10 minutos. Se precipitó GFP (EB1-GFP) y el nivel de STIM1 unido a EB1 se evaluó por inmunoblot usando un anticuerpo específico anti-STIM1. El nivel de GFP precipitado se determinó con un anticuerpo anti-GFP. La cantidad total de EB1-GFP y FLAG-STIM1 se analizó por inmunoblot en los lisados totales. Finalmente para comprobar la activación de ERK1/2 se determinó el nivel de fosforilación de ERK1/2 (marcado como pERK1/2) así como la cantidad total de ERK1/2 (marcado como tERK1/2). La cuantificación de la unión de EB1 a STIM1 se llevó a cabo por densiometría utilizando el software *ImageJ*. *p<0,05.

cantidad total de EB1-GFP precipitada con un anticuerpo anti-GFP en cada una de las condiciones ensayadas. Como control negativo de la co-precipitación se utilizarón células que expresaban sólo EB1-GFP o FLAG-STIM1.

Puesto que estas proteínas (STIM1 y EB1) estaban sobreexpresadas en estas células, nos planteamos estudiar si STIM1 endógeno se unia a EB1 endógeno tras el tratamiento con EGF. Para ello, las células Ishikawa se trataron con EGF 10 ng/ml en HBSS libre de Ca^{2+} durante 10 minutos. Los lisados totales se utilizaron para inmunoprecipitar EB1 endógeno con la utilización de resinas de proteína G-sefarosa unidas de modo covalente al anticuerpo anti-EB1 y mediante inmunoblot se analizó la cantidad de STIM1 inmunoprecipitado junto a EB1. Como control de carga se determinó la cantidad de EB1 inmunoprecipitado por inmunoblot. Para comprobar que la expresión de STIM1 era homogénea en todos los grupos experimentales se utilizó un anticuerpo anti-STIM1. En la **Figura 38** podemos observar que el tratamiento con EGF induce una disminución de STIM1 endógeno inmunoprecipitado con EB1 endógeno, demostrándose así que el complejo STIM1-EB1 endógeno se disocia tras el tratamiento con EGF.

Por lo tanto, nuestros resultados evidencian que la ruta de señalización MEK-ERK-STIM1 se activa con EGF y esta activación conlleva a la disociación de STIM1 del extremo de los microtúbulos, un evento importante y necesario para la activación de SOCE (Pozo-Guisado et al., 2013). Es decir, los resultados aquí mostrados son la primera evidencia de la fosforilación de STIM1 por ERK1/2 y de la disociación de STIM1-EB1 bajo estímulos fisiológicos.

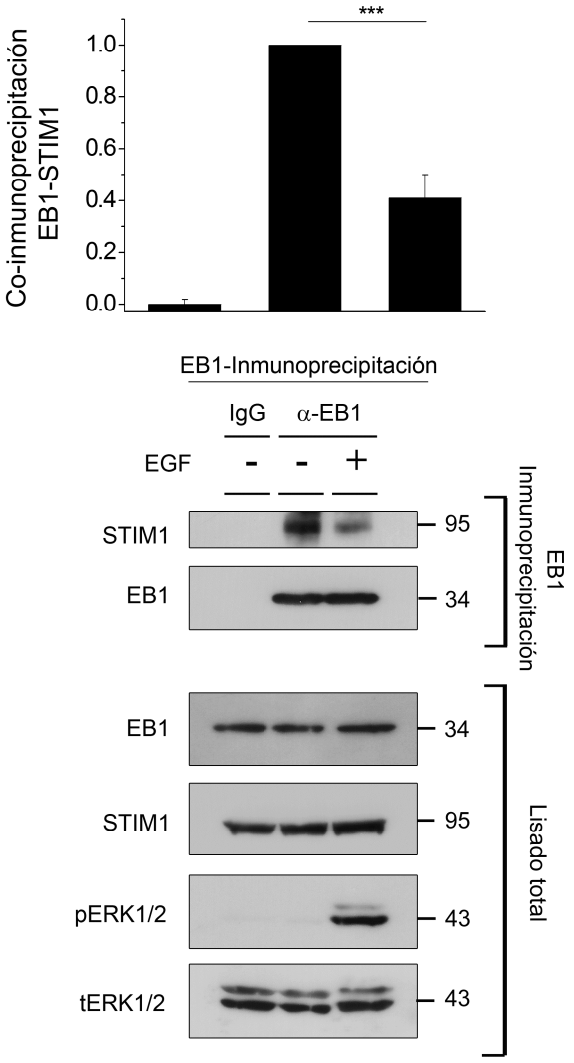

Figura 38: Disociación de EB1 y STIM1 endógeno mediada por EGF. Las células Ishikawa se trataron con EGF 10 ng/ml en HBSS libre de Ca^{2+} durante 10 minutos y se inmunoprecipitó EB1 endógeno a partir de estas células utilizando un anticuerpo específico anti-EB1 unido covalentemente a resinas de proteína G-sefarosa. El nivel de co-inmunoprecipitación de STIM1 se evaluó con un anticuerpo anti-STIM1. Como control negativo se incubaron los lisados con proteína G-sefarosa en ausencia del anticuerpo anti-EB1 (unidas a IgG). La cuantificación de la coinmunoprecipitación de STIM1-EB1 se llevó a cabo por densiometría utilizando el software *ImageJ*. ***p<0,001.

7. EGF ACTIVA EL INFLUJO DE Ca^{2+} EN CÉLULAS ISHIKAWA.

Siguiendo un protocolo de cultivo con deprivación de FBS en medio libre de rojo fenol (RPMI1640), hemos estudiado la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos (SOCE) tras inducir el vaciado de depósitos de Ca^{2+} con Tg (**Figura 39**). Las células Ishikawa cargadas con el la sonda fura-2 se trataton con Tg en medio libre de Ca^{2+} (minuto 2 de la gráfica), observándose un aumento del nivel de Ca^{2+} libre intracelular procedente del

retículo endoplasmático. Tras este vaciado del retículo endoplasmático se esperó a que el nivel de Ca^{2+} libre citosólico recuperara los niveles basales y a continuación se añadió Ca^{2+} al medio extracelular (minuto 8 de la gráfica). Tras la adición de Ca^{2+} extracelular, podemos observar un rápido influjo de Ca^{2+} al interior celular (línea negra). Por otro lado se inhibió la entrada de Ca^{2+} operada por el vaciado de los depósitos intracelulares con diferentes concentraciones de SKF96365, un bloqueante de los canales SOC (líneas azul, verde y roja). En la gráfica podemos observar que SKF963655 5-10 μM provocó una inhibición significativa de este influjo de Ca^{2+} .

Como se ha mencionado anteriormente, estudios previos de nuestro laboratorio han mostrado que la fosforilación de STIM1 por ERK1/2 regula la activación de la

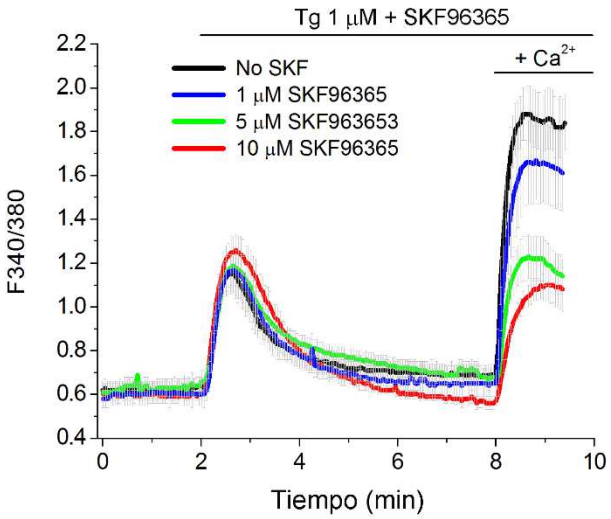

Figura 39: Entrada de Ca^{2+} operada por depósitos intracelulares en células Ishikawa. Se evaluó SOCE en células Ishikawa cargadas con la sonda fura-2 tras el tratamiento con Tg 1 μM en HBSS libre de Ca^{2+} seguida de la adición de $CaCl_2$ al medio de ensayo. El ratio F340/380 se monitorizó mediante epifluorescencia. Por otro lado se inhibió la entrada de Ca^{2+} añadiendo distintas concentraciones de SKF96365 junto a la adición de Tg.

entrada de Ca^{2+} en células HEK293 (Pozo-Guisado et al., 2010). Puesto que EGF activa la vía de señalización de ERK1/2, estimulando la fosforilación de STIM1 en los residuos Ser575, Ser608 y Ser621, hemos hipotetizado que la ruta de señalización de EGF que fosforila a STIM1 podría estar activando SOCE. Para valorar esta hipótesis hemos medido la concentración de Ca^{2+} intracelular en células Ishikawa cargadas con fura-2 y estimuladas con EGF (10 ng/ml) en medio libre de Ca^{2+}. En la **Figura 40 – panel A** se pueden observar los niveles de Ca^{2+} citosólico registrados para diferentes células en el mismo ensayo. En este experimento se añadió EGF en el minuto 2 y a partir de este

tratamiento se observaron picos transitorios de incremento de Ca^{2+} citosólico, liberado desde los depósitos intracelulares ya que el ensayo se llevó a cabo en ausencia de Ca^{2+} extracelular. Además, se observa que este vaciado de depósitos de Ca^{2+} tuvo lugar de manera asincrónica entre las diferentes células. Después de 6 minutos de estimulación con EGF añadimos Ca^{2+} al medio extracelular observando una entrada significativa de Ca^{2+} que además fue inhibida por SKF96365 10 µM (**Figura 40 – panel B**). En el panel C de la **Figura 40**, se muestra un diagrama de barras en el que podemos observar la cuantificación del incremento de la entrada de Ca^{2+} en las células tratadas con EGF y células tratadas con SKF96365, confirmando así la activación de entrada de Ca^{2+} mediada por EGF en células Ishikawa.

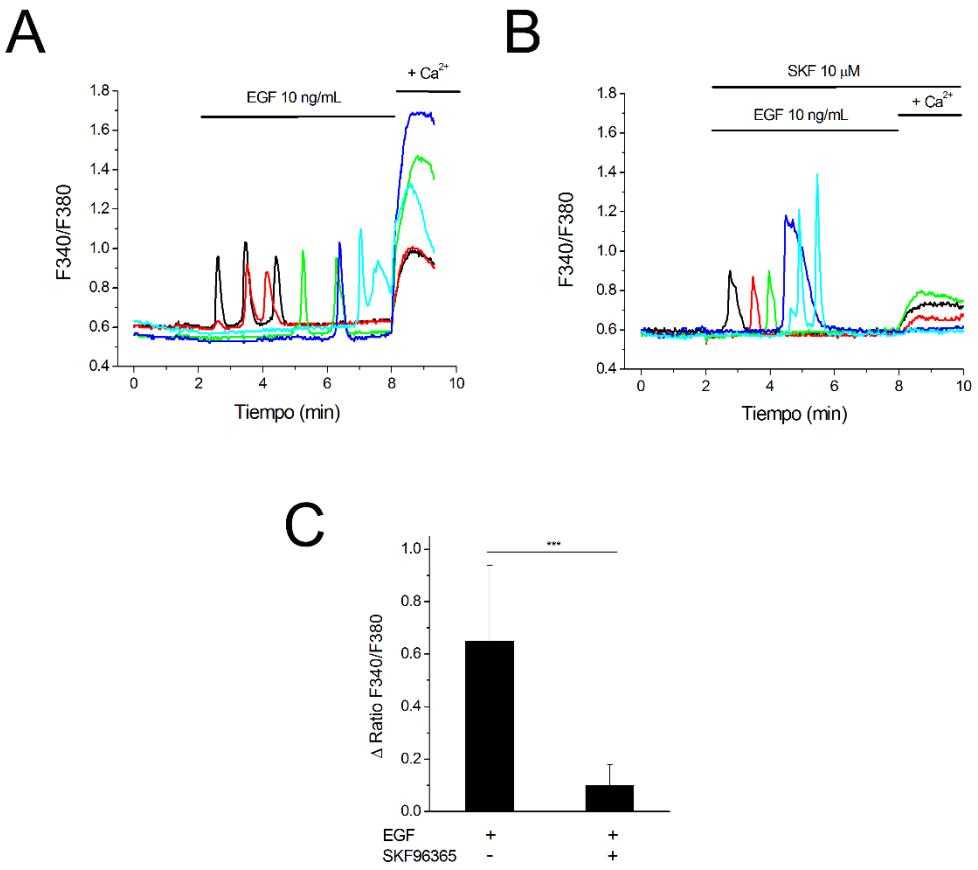

Figura 40: Movilización de Ca^{2+} mediada por EGF. (A) Se evaluó la movilización de Ca^{2+} intracelular en células Ishikawa cargadas con fura-2, tras el tratamiento con EGF 10 ng/ml en HBSS libre de Ca^{2+} seguida de la adición de $CaCl_2$ al medio de ensayo. Se monitorizó el ratio F340/380 mediante epifluorescencia. Los trazos muestran el registro de medida de fluorescencia de células individuales. **(B)** Se añadió SKF96365 10 µM junto con la adición de EGF. **(C)** Incremento en el ratio F340/F380 tras la adición de Ca^{2+} según los resultados obtenidos en los experimentos mostrados en el panel A-B. p***<0,001.

8. LA FOSFORILACIÓN DE STIM1 ES NECESARIA PARA LA MIGRACIÓN CELULAR.

Dado que EGF tiene una importante actividad como quimioatrayente en células epiteliales (Peplow and Chatterjee, 2013; Scherber et al., 2012; Shirakata et al., 2005) y ya que hemos demostrado que el tratamiento con EGF activa la fosforilación de STIM1 en las serinas 575, 608 y 621, así como la movilización de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares, nos propusimos investigar el papel de la entrada de Ca^{2+} y la fosforilación de STIM1 en la migración celular de células Ishikawa inducida por EGF.

Para estudiar esta hipótesis hemos transfectado células Ishikawa para la expresión transitoria de: (1) FLAG-STIM1-WT; (2) FLAG-STIM1-S575A/S608A/S621A, es decir, mutantes con la sustitución de Ser por Ala en los sitios diana de ERK1/2, con el objetivo de impedir la fosforilación en estos residuos; y (3) FLAG-STIM1-S575E/S608E/S621E, para simular una fosforilación constitutiva de STIM1. Tras 24 horas después de la transfección se evaluó la migración celular mediante ensayos de cierre de heridas en placa. En paralelo, las células Ishikawa que expresaban STIM1-wt se trataron con el inhibidor de ERK1/2 PD0325901, así como con el bloqueante de canales SOC, SKF96365. En la **Figura 41** podemos observar cómo la potenciación de la migración celular por EGF fue inhibida por SKF96365 (1 μM) en células Ishikawa que sobreexpresaban STIM1-wt, concentración a la cual el inhibidor bloquea parcialmente la entrada de Ca^{2+} pero no tiene ningún efecto negativo sobre la viabilidad celular. En la **Figura 42** podemos observar que el cultivo de células Ishikawa con SKF96365 1 μM durante 24 horas no provoca muerte celular, ni alteración en el ciclo celular (no tiene efectos citoestáticos o citotóxicos). Igualmente, PD0325901 también bloqueó de modo significativo la migración celular estimulada por EGF. Estos resultados junto con el hecho

de que EGF induce la fosforilación de STIM1, sugiere que la fosforilación de STIM1 tiene una función importante en el control de la migración celular.

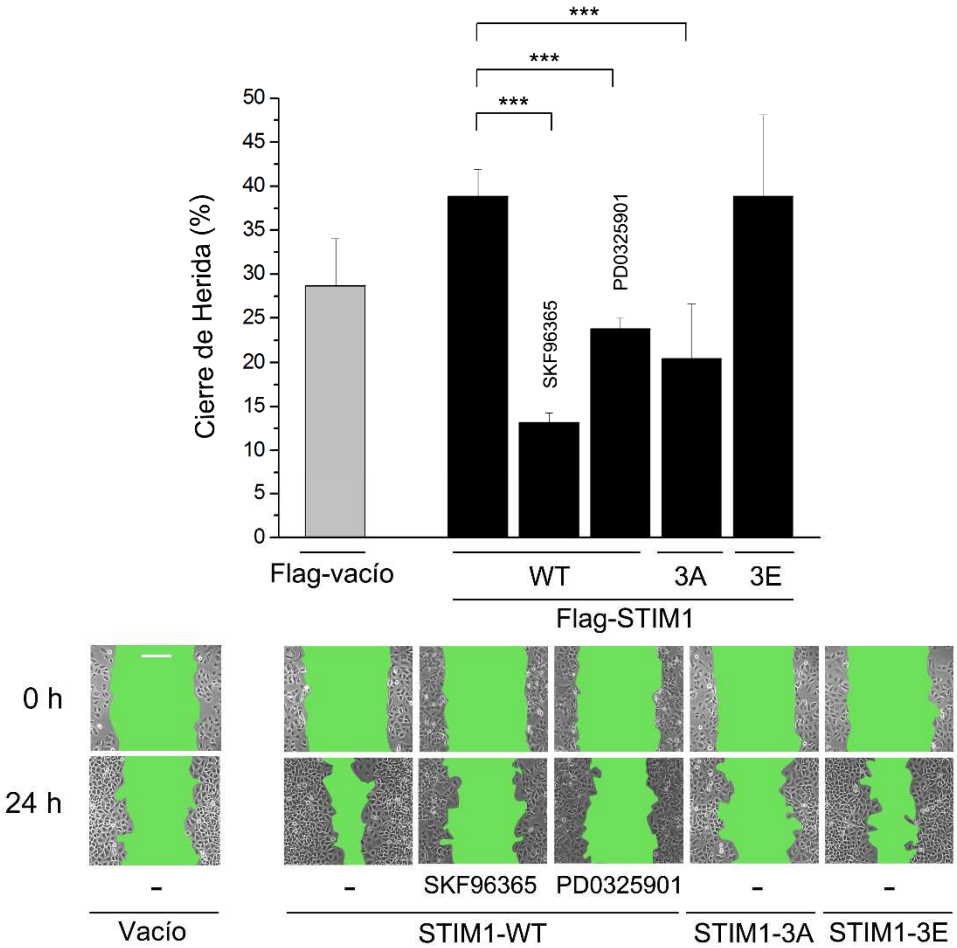

Figura 41: La fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2 modula la migración celular inducida por EGF en células Ishikawa. Las células Ishikawa se transfectaron para la expresión transitoria de FLAG-STIM1-wt, FLAG-STIM1-S575A/S608A/S621A o FLAG-STIM1-S575E/S608E/S621E. Como control negativo se utilizaron células que sobreexpresaban exclusivamente el péptido FLAG. Cuando las células alcanzaron el 80% de desidad celular, se realizó una herida en la monocapa celular con una punta de pipeta y se incubaron con EGF 10 ng/ml durante 24 horas. El tratamiento con SKF96365 (1 μM) o PD0325901 (0,5 μM) se añadió junto con EGF. Las células se fotografiaron en microscopio de contraste de fases en el momento de la herida (tiempo 0 horas) y tras 24 horas. La cuantificación del porcetaje de sellamiento se llevó a cabo con la utilización del software *ImageJ*. (Escala = 200 μm mostrada en la fotografía del vector vacío en tiempo igual a 0 horas). ***p<0,001.

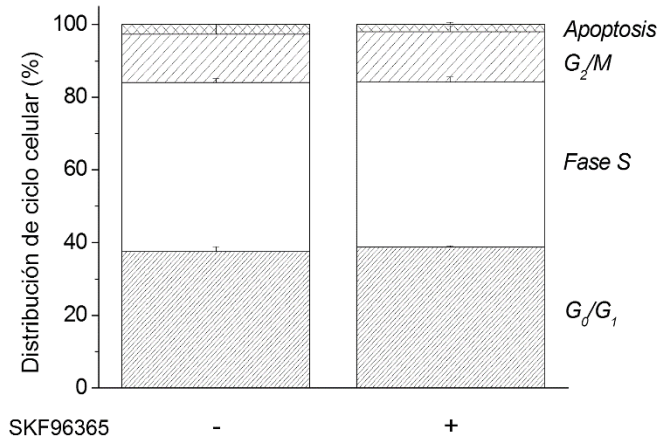

Figura 42: Distribución de ciclo celular en de células Ishikawa tratadas con SKF96365. Las células Ishikawa se cultivaron en presencia o ausencia de SKF96365 1 μM durante 24 horas. Se analizaron las distintas fases del ciclo celular así como el número de células apoptóticas mediante citometría de flujo.

Del mismo modo, en la **Figura 41** podemos ver que la sobreexpresión de STIM1-S575A/S608A/S621A inhibía de modo significativo la migración celular estimulada por EGF. Por el contrario, la sobreexpresión de STIM1-S575E/S608E/S621E normaliza la migración celular, monitorizada mediante los ensayos de cierre de herida en placa, confirmando de este modo que la fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2 regula la migración celular.

En paralelo analizamos los niveles de sobreexpresión de la proteína STIM1 en estos ensayos para asegurarnos que los resultados no estaban condicionados por posibles variaciones del nivel de expresión de las diferentes construcciones empleadas. Para ello, después de evaluar el sellamiento de herida en placa mediante microscopía en contraste de fases, las células se lisaron y los lisados totales se utilizarón para evaluar la sobreexpresión de FLAG-STIM1 mediante inmunoblot (**Figura 43**). Observamos con este resultado una expresión de STIM1 similar para todos los plámidos utilizados en este experimento, confirmando así que la desfosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2 afecta de una manera significativa a la migración celular.

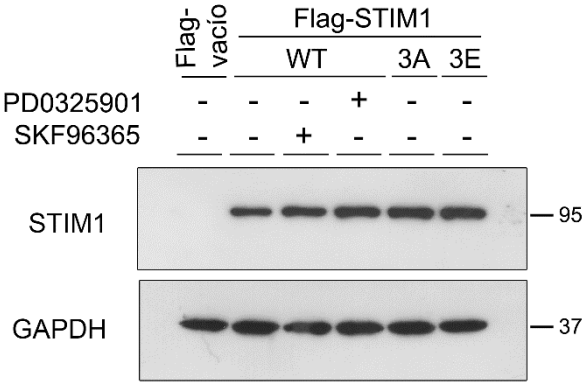

Figura 43: Sobreexpresión de STIM1 en células Ishikawa en el ensayo de cierre de heridas en placa. Después de realiz43r las fotografías para el ensayo de heridas (mostrado en la figura 41) se procedió al lisado total de estas élulas y se analizó mediante inmunoblot la expresión total de STIM1 utilizando un anticuerpo anti-STIM1 para descartar diferencias en la expresión de las distintos plasmidos. Como control de carga se utilizó un anticuerpo anti-GAPDH.

Para determinar si los distintos mutantes de STIM1 estaban afectando de algún modo a la proliferación celular, decidimos hacer un estudio de viabilidad celular. Para ello, las células Ishikawa se transfectaron para la expresión transitoria de FLAG-STIM1-wt, FLAG-STIM1-S575A/S608A/S621A o FLAG-STIM1-S575E/S608E/S621E y tras 24 horas de expresión del plásmido (marcado como tiempo 0) se cuantificó el número total de células vivas por placa. Así en la **Figura 44** podemos observar cómo el número

de células no varía entre las diferentes construcciones por lo que concluímos que la fosforilación o desfosforilación de STIM1 no afecta a la proliferación celular.

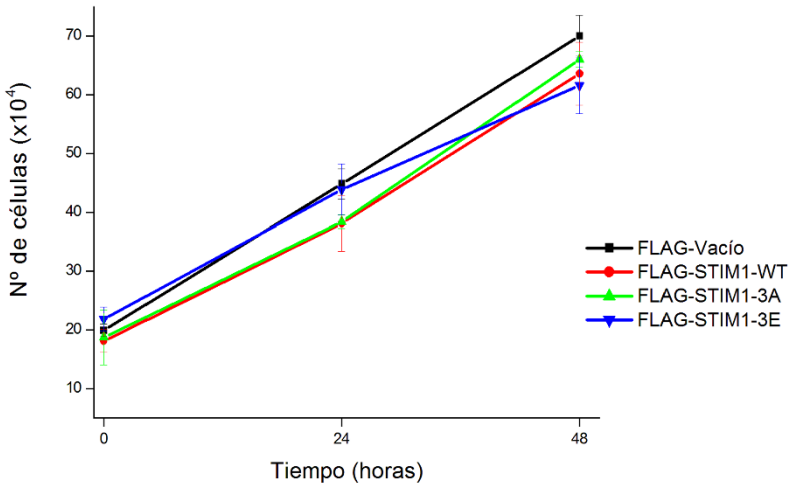

Figura 44: Ensayo de proliferación celular tras la sobre-expresión de STIM1. Las células Ishikawa se transfectaron para la expresión transitoria de FLAG-STIM1-wt (línea roja), FLAG-STIM1-S575A/S608A/S621A (línea verde) o FLAG-STIM1-S575E/S608E/S621E (línea azul). Como control se utilizaron células que habían sido transfectadas con el plásmido FLAG-vacío (línea negra). 24 horas tras la transfección se cuantificó el número total de células por placa.

Del mismo modo decidimos estudiar si estas modificaciones afectaban de algún modo a la distribución de las células Ishikawa en las distintas fases del ciclo celular. Para ello, las células Ishikawa se transfectaron para la expresión transitoria de FLAG-STIM1-wt, FLAG-STIM1-S575A/S608A/S621A o FLAG-STIM1-S575E/S608E/S621E y tras 24 horas de expresión del plásmido se analizó por citometría de flujo el porcentaje de células que se encontraban en las distintas fases del ciclo celular así como el nivel de apoptosis en cada condición ensayada (**Figura 45**). De este modo pudimos comprobar que no había diferencias en la distribución de células en el ciclo tras la expresión de los distintos mutantes de STIM1. Así, estos datos sugieren que la fosforilación de STIM1 en sitios dianas de ERK1/2 no afecta a la distribución del ciclo celular.

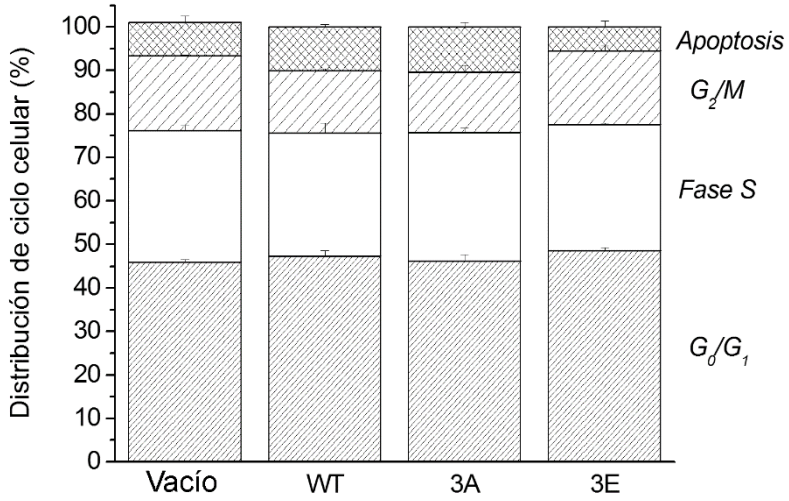

Figura 45: Distribución de ciclo de células Ishikawa que sobreexpresan distintos mutantes de STIM1. Las células Ishikawa se transfectaron para la expresión transitoria de FLAG-STIM1 (marcado como WT), FLAG-STIM1-S575A/S608A/S621A (marcado como 3A) o FLAG-STIM1-S575E/S608E/S621E (marcado como 3E). Como control se utilizaron células transfectadas para la expresión del plásmido FLAG (marcado como vacío). Se analizaron las distintas fases del ciclo celular así como el número de células apoptóticas mediante citometría de flujo 24 horas de cultivo tras la transfección.

9. STIM1 MEDIA LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA ESTIMULADA POR EGF.

Es conocido que EGF induce la transición epitelio-mesenquima en células Ishikawa, observándose un descenso de marcadores celulares de tipo epitelial, al tiempo que aumentan los marcadores de tipo mesenquimal (Yang et al., 2014). Como consecuencia, hemos hipotetizado que los resultados observados en la disminución de la migración celular en células que expresan STIM1-S575A/S608A/S621A podría estar relacionada con una disminución de la transición epitelio-mesenquima. Por ello estudiamos el perfil de expresión y localización de E-cadherina (marcador celular epitelial) y vimentina (marcador celular mesenquimal) en células Ishikawa tratadas con EGF 10 ng/ml. En la **Figura 46 – panel A** podemos observar que el tratamiento prolongado con EGF (durante 24 horas) en células Ishikawa provoca un cambio en la distribución celular de E-cadherina desde regiones próximas a la membrana plasmática (localización en uniones intercelulares en células sin tratar con EGF) a una localización más difusa en el citosol. Esta localización citosólica de E-cadherina ha sido descrita para otros tipos celulares, en los que aparece en vesículas perinucleares durante la transición epitelio-mesénquima (Larue et al., 2005). Del mismo modo, observamos como el tratamiento con EGF provoca un aumento en la expresión de vimetina (**Figura 46 – panel A**) mostrando una localización bien definida de filamentos intermedios del citoesqueleto,

en concordancia con el comportamiento descrito por otros tipos celulares epiteliales bajo estimulación con EGF (Lee et al., 2006; Larue et al., 2005). En el **panel B** de la **Figura 46** podemos comprobar dicho proceso mediante el análisis mediante inmunoblot de la expresión de las proteínas vimentina y E-cadherina en células Ishikawa tratadas del mismo modo con EGF durante 24 horas. Así pudimos ver como vimentina aumentaba su expresión, mientras que E-cadherina mantenía el nivel de expresión, aunque sufre una fuerte relocalización tras el tratamiento prolongado con EGF.

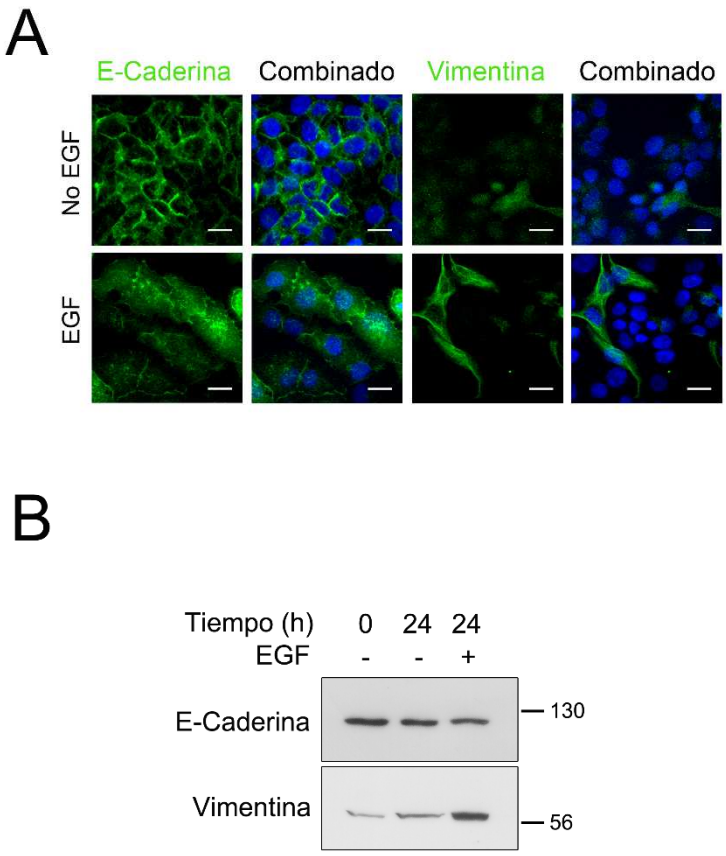

Figura 46: EGF estimula la transición epitelio-mesénquima en células Ishikawa. (A) Las células Ishikawa se cultivaron durante 24 horas en RPMI1640 con FBS 1% en presencia o ausencia de EGF 10 ng/ml. Mediante inmunofluorescencia se determinó la localización de E-cadherina (marcador de célula epitelial) y vimentina (marcador de célula mesenquimal). La tinción nuclear se llevó a cabo con Hoechst 33342. Escala = 20 µm. **(B)** Del mismo modo que en el panel A, las células Isikawa se trataron con o sin EGF 10 ng/ml durante 24 horas y los lisados totales se analizaron por inmunoblot para la expresión de E-cadherina y vimentina.

Para evaluar el papel de la fosforilación de STIM1 en este proceso estimulado por EGF hemos transfectado células Ishikawa para la expresión transitoria de STIM1-mCherry, STIM1-S575A/S608A/S621A-mCherry, o STIM1-S575E/S608E/S621E-mCherry. Tras 24 horas de tratamiento con EGF 10 ng/ml en RPMI1640 libre de rojo fenol suplementado con 1% de FBS, se llevó a cabo la inmunolocalización de E-cadherina

y vimentina. En la **Figura 47** podemos observar cómo las células que sobre-expresaban STIM1-mCherry muestran un aumento significativo en la expresión de vimentina, así como una relocalización de E-cadherina en el citosol. Sin embargo, células que sobreexpresaban STIM1-S575A/S608A/S621A-mCherry no mostraron aumento en la expresión de vimentina, manteniendo la localización de E-cadherina similar a la observada en células sin tratar, es decir en las cercanías de la membrana plasmática, en las uniones intercelulares. Por el contrario, para células que sobreexpresan la mutación

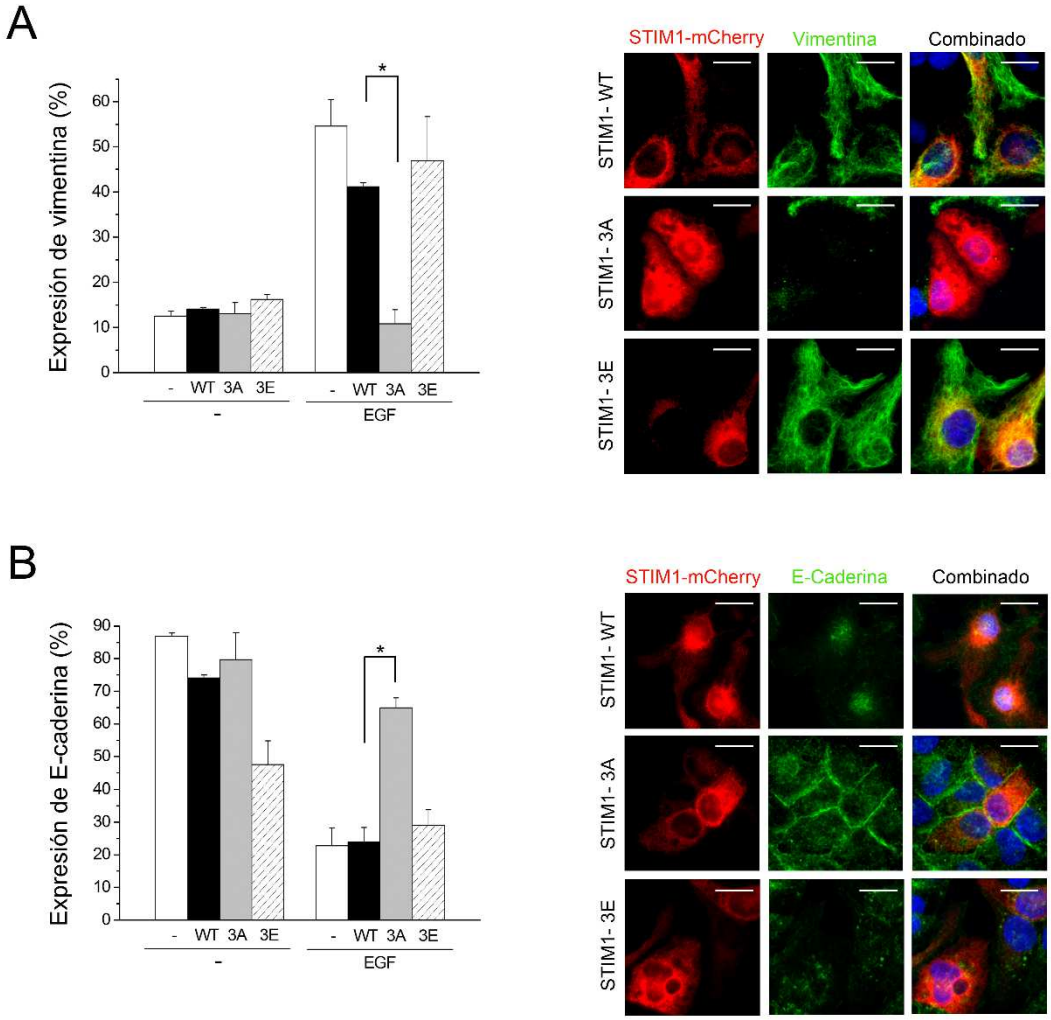

Figura 47: La fosforilación de STIM1 media la transición epitelio-mesénquima en células Ishikawa. (A) Ensayo de inmunofluorescencia de vimentina en células Ishikawa que sobreexpresaban de modo transitorio STIM1-mCherry, (barra negra), STIM1-S575A/S608A/S621A-mCherry (barra gris), STIM1-S575E/S608E/S621E (barra rayada) o células no transfectadas (barra blanca). Tras la estimulación de las células con EGF 10 ng/ml durante 24 horas en RPMI1640 con 1% de FBS, se cuantificó el número de células positivas para la expresión de vimentina entre las células transfectadas con STIM1-mCherry. Se analizaron varios campos al azar y se muestran imágenes representativas de células tratadas con EGF. **(B)** Al igual que en el panel A las células se trataron con EGF y se analizó por inmunofluorescencia la localización de E-cadherina. Dentro de las células positivas para STIM1 se cuantificó aquellas que presentaban una localización periférica de E-cadherina, en las uniones intercelulares, analizando varios campos de modo aleatorio. Las imágenes que se muestran son representativas de células tratadas con EGF. Escala = 20 µm. *p<0,05.

que simula la fosforilación constitutiva de STIM1 (STIM1-S575E/S608E/S621E-mCherry) se observa cómo la transición epitelio-mesénquima es equivalente a la observada en células que sobreexpresan STIM1-mCherry, es decir, la relocalización de E-cadherina en vesiculas citoplasmáticas y el aumento de expresión de filamentos de vimentina en células que responden al tratamiento con EGF. Estos resultados sugieren que la fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2 podría tener un papel relevante en este proceso en células Ishikawa. La participación en migración celular así como en la transición epitelio-mesénquima indica que la fosforilación de STIM1 podría tomarse en consideración como una nueva diana para el tratamiento de determinados tipos de cáncer, una posibilidad que necesitaría estar ampliamente avalada por una posterior experimentación en modelos experimentales animales.

10. RESVERATROL INHIBE SOCE EN CÉLULAS HEK293.

Se encuentra ampliamente descrito el efecto anticarcinogénico que tiene el resveratrol (RES) (Baur and Sinclair, 2006; Cucciolla et al., 2007; Jang et al., 1997), además del hecho que RES inhibe el influjo de Ca^{2+} en plaquetas (Dobrydneva et al., 1999), por lo que decidimos estudiar el efecto de esta fitoalexina sobre la activación de la ruta de señalización fosfo-ERK/fosfo-STIM1/influjo de Ca^{2+} inducido por Tg.

Para analizar el efecto del RES sobre el influjo de Ca^{2+} hemos utilizado células HEK293 que sobreexpresaban FLAG-STIM1 (**Figura 48 – panel A**). Las células (cargadas con fura2) se trataron con Tg 1 μM en medio libre de Ca^{2+}, lo que conlleva al vaciado de depósitos intracelulares de Ca^{2+} (minutos 2-4 de la gráfica). Después de 8 minutos del tratamiento con Tg se añadió Ca^{2+} extracelular, observándose la apertura de los canales SOC, que se detecta por el incremento en el nivel de Ca^{2+} citosólico (minutos 10-12 de la gráfica). En paralelo se llevó a cabo este mismo ensayo añadiendo RES junto con Tg, observánsdose que este compuesto inhibe la entrada de Ca^{2+} al interior celular de una manera dependiente de la dosis. En el **panel B** podemos ver que la concentración de RES a la que se consigue un 50% de inhibición de la entrada de Ca^{2+} (IC_{50}) era 10 μM para células HEK293.

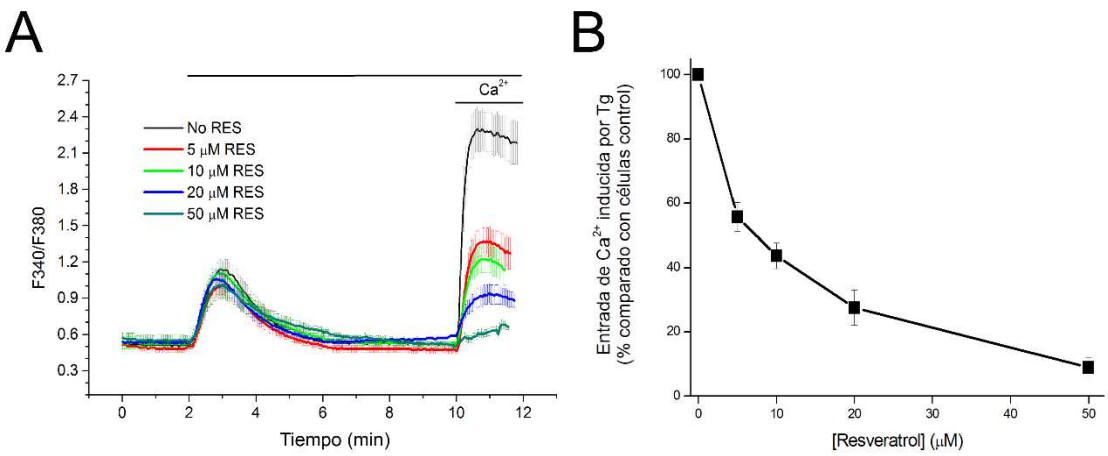

Figura 48: Inhibición de SOCE por RES en células HEK293. (A) Células HEK293 que expresan de modo estable FLAG-STIM1 y cargadas con fura-2 se trataron con 1 μM de Tg en HBSS libre de Ca^{2+} (minuto 2 de la gráfica) en ausencia (línea negra) o presencia de diferentes concentraciones de RES (líneas de color). Tras la adición de 2 mM de Ca^{2+} extracelular (minuto 10 de la gráfica) se analizó la entrada de Ca^{2+} al interior celular mediante la monitorización del ratio F340/F380. (B) Inhibición de SOCE tras el tratamiento con las distintas concentraciones de RES con respecto a las células tratadas sólo con Tg y sin RES (células control).

Puesto que SOCE es fuertemente dependiente de los niveles de Ca^{2+} intraluminal, hemos analizado el nivel de Ca^{2+} liberado hacia el citosol desde los depósitos intracelulares tras el tratamiento con Tg y en presencia de diferentes concentraciones de RES. En la **Figura 49** podemos observar que la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático (RE) al citosol no se veía afectada por RES de manera significativa con ninguna de las concentraciones ensayadas.

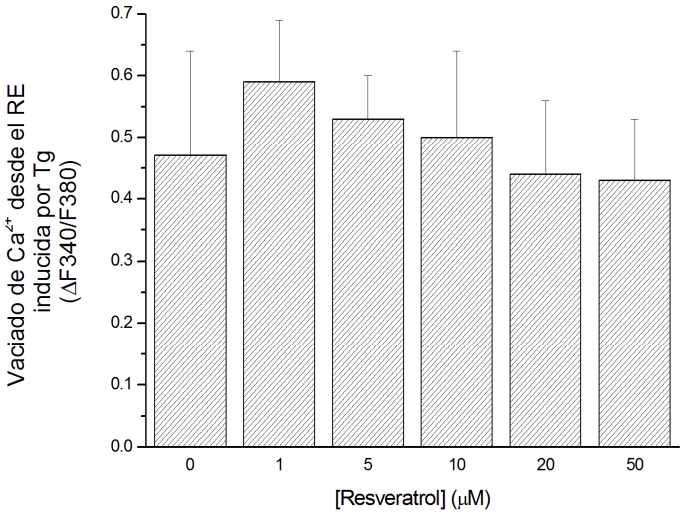

Figura 49: Vaciado de depósitos inducida por Tg. Células HEK293 que expresan de modo estable e inducible FLAG-STIM1 y cargadas con Fura-2 se trataron con Tg 1 μM en HBSS libre de Ca^{2+}. El incremento del ratio F340/F380 por epifluorescencia se evaluó y no se encontraron diferencias significativas entre el control (células no tratadas) y células tratadas con distintas concentraciones de RES.

Una vez observado que RES inhibe la entrada de Ca^{2+} en células HEK293 tratadas con Tg, nos plantemos determinar si RES inhibía SOCE mediante la inhibición de la cascada de señalización fosfo-ERK/fosfo-STIM1 o si por el contrario RES estaría actuando como un simple bloqueante de los canales SOC. Para abordar este estudio diseñamos un experimento similar al mostrado en la **Figura 48**, pero en este caso se utilizó una sola concentración de RES (20 μM) y se añadió al cultivo celular a diferentes tiempos (**Figura 50**). RES se añadió a las células 8 minutos antes de añadir Ca^{2+} extracelular, es decir justo cuando añadimos Tg (línea negra), 4 minutos antes de la adición de Ca^{2+} (línea roja), 2 minutos antes de la adición de Ca^{2+} (línea azul), o justo al añadir Ca^{2+} a las células (línea verde). Nuestros resultados muestran que el tratamiento con RES justo al añadir Ca^{2+} no inhibe SOCE, lo que sugiere que esta fitoalexina no estaría actuando a nivel de los canales SOC. Del mismo modo, podemos observar que aunque aumentamos el tiempo de preincubación con RES, antes de la adición de Ca^{2+}, RES no inhibe SOCE al menos hasta que se añada junto con Tg. Estos resultados muestran que RES no bloquea directamente los canales de Ca^{2+}, es decir, no actúa como un bloqueante físico del canal. Por otro lado, estos resultados sugieren que RES podría estar inhibiendo la cascada de señalización celular que activaría Tg al inducir un vaciado de los depositos intracelulares, ya que el efecto inhibidor del RES es solo visible cuando lo añadimos a las células junto con Tg.

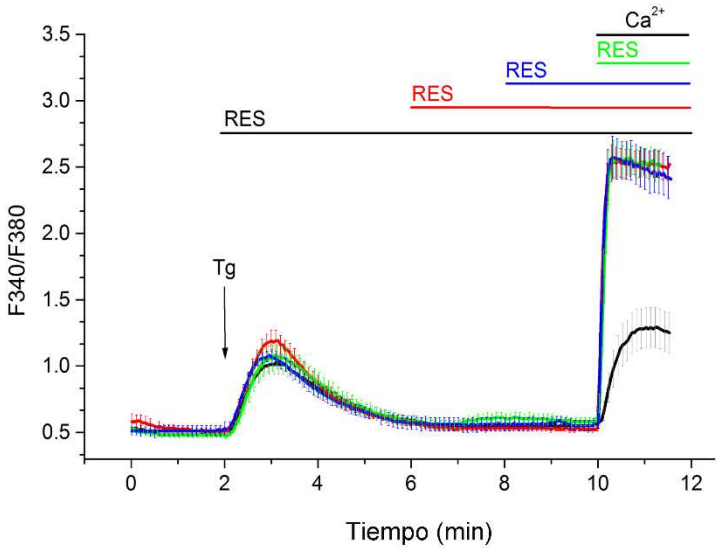

Figura 50: El efecto inhibidor de RES no está relacionado con un bloqueo directo de los canales SOC. Las células HEK293 que expresaban de modo estable FLAG-STIM1 se trataron con RES (20 μM) a diferentes tiempos para poder evaluar la capacidad para bloquear el influjo de Ca^{2+}: RES se añadío junto con Tg 1 μM, es decir 8 minutos antes de la adición de Ca^{2+} (línea negra); 4 minutos antes de la adición de Ca^{2+} (línea roja); 2 minutos antes de la adición de Ca^{2+} (línea azul) y por último junto con Ca^{2+} (línea verde).

Para determinar si RES inhibe la cascada de señalización que activa SOCE, hemos analizado el efecto de RES sobre la fosforilación de ERK1/2 y STIM1 en células HEK293.

11. RESVERATROL INHIBE LA ACTIVACIÓN DE ERK1/2 Y LA FOSFORILACIÓN DE STIM1.

Tal y como hemos visto anteriormente, STIM1 se fosforila *in vivo* en los residuos Ser575, Ser608 y Ser621 por ERK1/2 durante la activación de SOCE inducida por Tg en células HEK293, así como tras el tratamiento con EGF en células Ishikawa. Ya que esta fosforilación es necesaria para la activación de SOCE (Pozo-Guisado et al., 2010) nos planteamos la hipótesis de que resveratrol (RES) podría estar inhibiendo ERK1/2 y por tanto, la fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2 con la consecuente inhibición de SOCE observada en los experimentos mostrados en la **Figura 48**. Para estudiar el efecto del RES sobre la activación de ERK1/2 se trataron las células con Tg para inducir el vaciado de los depósitos, y en paralelo se les añadieron diferentes concentraciones de RES. El nivel de fosforilación de ERK1/2 en los residuos Tyr202 y Thr204 se analizó mediante inmunoblot utilizando un anticuerpo fosfo-específico. En la **Figura 51** se muestra que RES inhibe la fosforilación y por tanto la activación de ERK1/2 inducida por Tg. Como control de este experimento se utilizaron células HEK293 tratadas con el inhibidor de ERK1/2, PD0325901. Por otro lado se analizó también el nivel de ERK1/2 total, demostrándose así que la expresión de ERK1/2 no se veía afectada por el tratamiento con RES. Además, en la gráfica de la **Figura 51**, en la que se muestra la cuantificación de la fosforilacion de ERK1/2, observamos cómo esta inhibición presentaba una IC_{50} en el mismo rango de concentraciones que habíamos observado la inhibición de SOCE (vease **Figura 48 – panel B**).

Puesto que RES estaba inhibiendo la activación de ERK1/2, nos planteamos estudiar el estado de fosforilación de STIM1 en los residuos Ser575, Ser608 y Ser621, sitios diana de ERK1/2 en células tratadas con RES. Para ello, células HEK293 que expresan de modo estable STIM1 se trataron con Tg 1 μM para inducir el vaciado de los depósitos de Ca^{2+}, en presencia de distintas concentraciones de RES. Los lisados célulares se utilizaron para la detección de la fosforilación de STIM1 en las serinas 575, 608 y 621 mediante inmunoblot. En la **Figura 52** podemos observar que la fosforilación de STIM1 disminuye significativamente para estos tres residuos tras el tratamiento con RES de un

modo dosis-dependiente. Como control de este experimento se utilizó el inhibidor de ERK1/2 PD0325901, que también inhibió la fosforilación de STIM1 en los residuos Ser575, Ser608 y Ser621. Se muestra también la cantidad total de STIM1 en cada condición experimental, demostrando así que el nivel de STIM1 no variaba con el

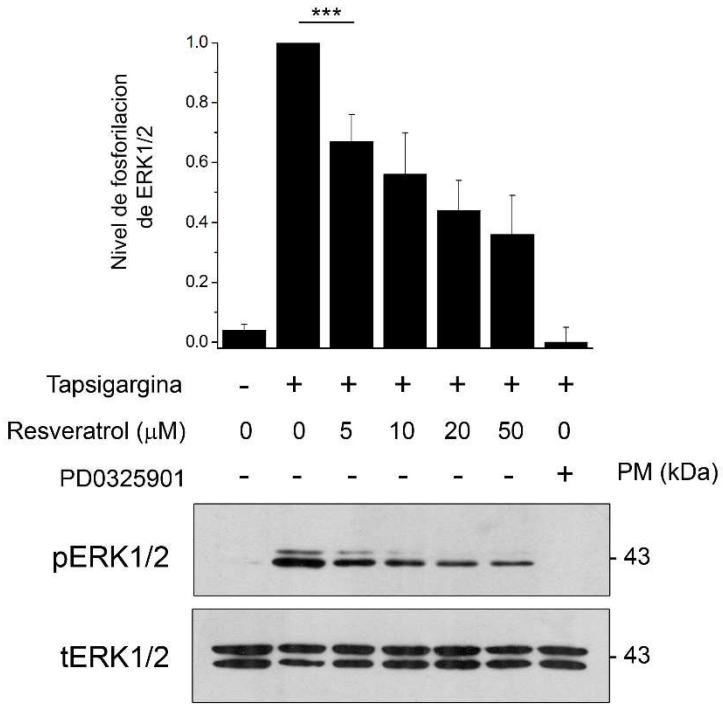

Figura 51: Inhibición de ERK1/2 por RES. Las células HEK293 que expresan de modo estable FLAG-STIM1 se trataron con Tg 1 μM, para inducir el vaciado de depósitos intracelulares, y con concentraciones crecientes de RES en HBSS libre de Ca^{2+}. Los lisados totales se utilizaron para evaluar fosfo-Thr202/Tyr204-ERK1/2 (marcado como pERK1/2) mediante inmunoblot. Como control de carga se evaluó el nivel total de ERK1/2 (marcado como tERK1/2). Como control del experimento se incubaron las células HEK293 con PD0325901 (0,1 μM). La cuantificación de la fosforilación de ERK1/2 se llevó a cabo por densiometría utilizando el software *ImageJ*. ***p<0,001.

tratamiento de RES. Puesto que la fosforilación de STIM1 en los sitios diana de ERK1/2 modula la activación de SOCE, la inhibición de la fosforilación de STIM1 por RES explica la inhibición de SOCE por esta fitoalexina. Estos resultados representan una nueva evidencia en el estudio de la inhibición del mecanismo molecular de SOCE por RES, ya que demuestra que la fosforilación de STIM1 es una diana para RES en células de mamíferos.

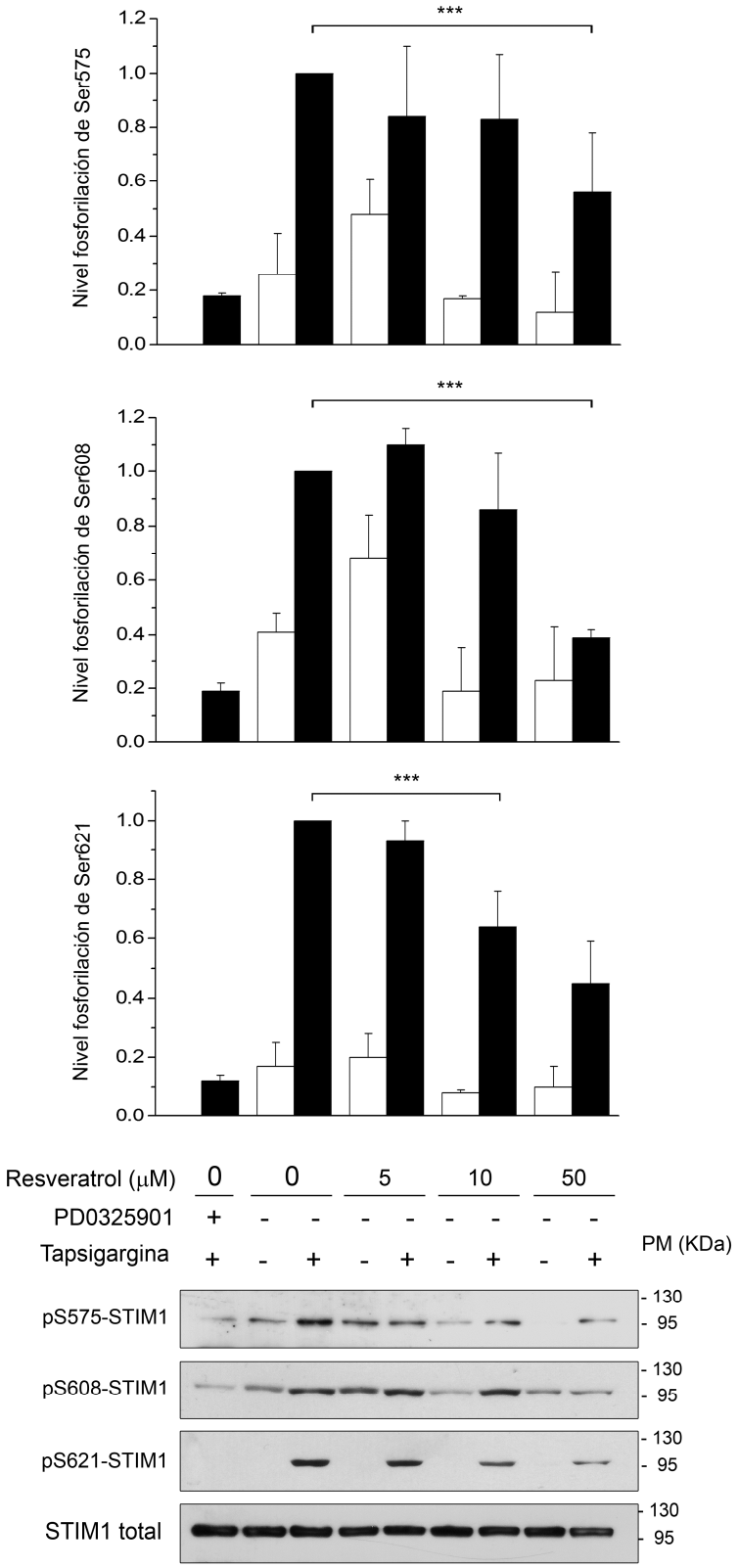

Figura 52: Inhibición de la fosforilación de STIM1 por RES. Las células HEK293 que expresan de modo estable FLAG-STIM1 se trataron con Tg 1 μM en presencia de concentraciones crecientes de RES en HBSS libre de Ca^{2+}. Los lisados totales se utilizaron para evaluar por inmunoblot el nivel de fosfo-Ser575-STIM1, fosfo-Ser608-STIM1 y fosfo-Ser621-STIM. El control de carga se monitorizó utilizando un anticuerpo específico anti-STIM1. Como control del experimento se utilizaron células HEK293 incubadas con el inhibidor de ERK1/2 PD0325901 (0,1 μM). La cuantificación de la fosforilación de STIM1 en células bajo vaciado de depósitos (+Tg, barra negra) o células en reposo, es decir células en medio con Ca^{2+} (-Tg, barra blanca) se llevó a cabo mediante densiometría utilizando el software *ImageJ*. Para el análisis estadístico se compararon los datos con el control (+Tg, -RES). ***p<0,001.

12. RESVERATROL INTERFIERE LA DISOCIACIÓN DE STIM1-EB1.

Anteriormente habiamos visto que la fosforilación de STIM1 en los sitios diana de ERK1/2 modula la interacción de STIM1 con EB1. Teniendo en cuenta que RES inhibe la fosforilación de STIM1 y que esta fosforilación regula la disociación de EB1, hemos estudiado la interacción de STIM1 y EB1 en células HEK293 tratadas con RES tras el vaciado de los depósitos con Tg. Para ello, células HEK293 que expresan de modo estable FLAG-STIM1 fueron transfectadas para la expresión transitoria de EB1-GFP. Las células se trataron con RES y se indujo el vaciado de depósitos intracelulares con Tg 1 μM en HBSS libre de Ca^{2+}, durante 10 minutos a 37ºC. Posteriormente se llevó a cabo la precipitación de EB1-GFP utilizando resinas de GFP-Trap y se evaluó el nivel STIM1 unido a EB1 mediante inmunoblot con un anticuerpo anti-STIM1. Como control negativo de este ensayo de co-precipitación se usaron células HEK293 que expresan de modo estable el péptido FLAG y se transfectaron para la expresión transitoria de EB1-GFP (**Figura 53**, línea 1). Del mismo modo, y como control negativo, células que expresaban FLAG-STIM1 fueron transfectadas para la expresión transitoria de la proteína GFP (**Figura 53**, línea 2). En la Figura 53 podemos observar como el vaciado de los depósitos inducido por Tg inducía una disociación significativa del complejo STIM1-EB1, tal y como habíamos observado en experimentos anteriores (calle 4). Sin embargo, pudimos comprobar que la presencia RES bloqueaba esta disociación, es decir, no se observa un descenso en el nivel de STIM1 unido a EB1 en células tratadas con RES (calle 6). En los paneles inferiores se muestran los niveles de expresión de STIM1 y EB1-GFP de los lisados totales, mostrándose así que no hay diferencias de expresión de estas proteínas en las diferentes condiciones ensayadas. Además mostramos también el estado de fosforilación de STIM1, mediante la detección por inmunoblot de la fosforilación de la serina 621. Estos resultados apoyan la hipótesis de que una fosforilación defectiva de STIM1 afecta a la disociación de STIM1-EB1 tras el vaciado de depósitos. Estos resultados muestran que la inhibición de ERK1/2 por el tratamiento con RES inhibe la fosforilacion de STIM1, y por tanto la disociación de EB1, explicando el mecanismo por el cual células tratadas con RES presentan una inhibición de SOCE.

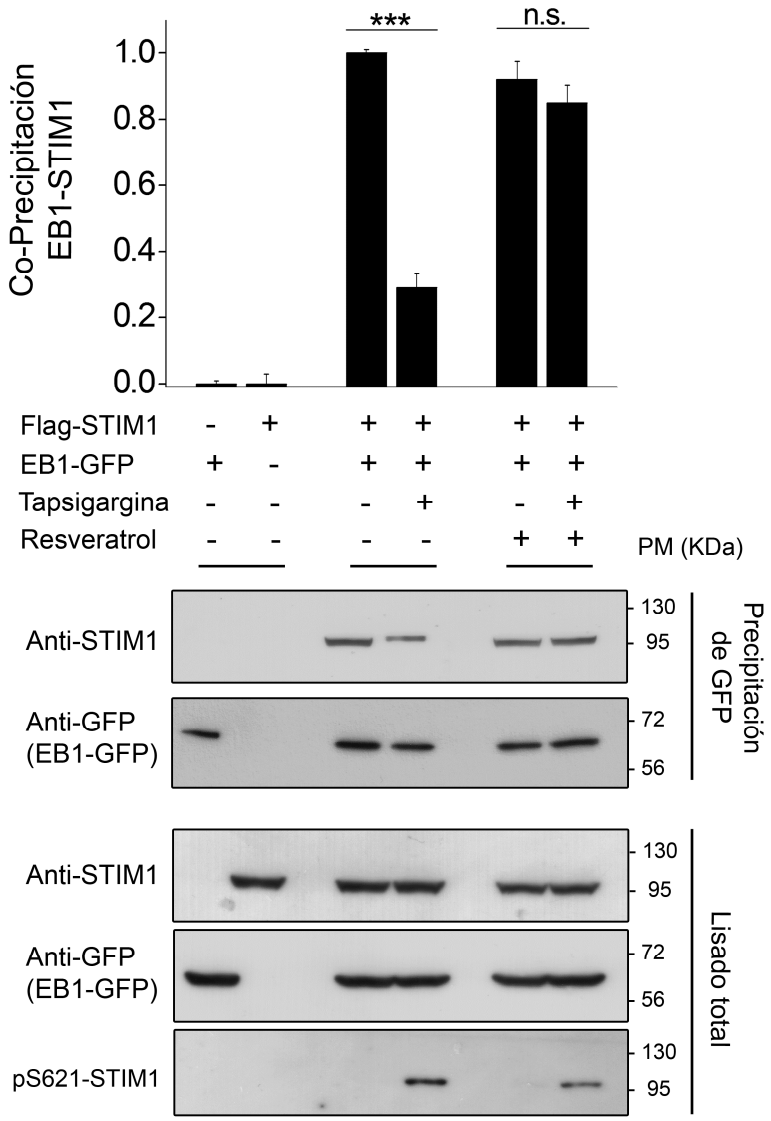

Figura 53: Inhibición de la disociación de STIM1 y EB1 por RES. Células HEK293 que expresan de modo estable FLAG-STIM1 se transfectaron para la expresión transitoria de EB1-GFP. Las células se incubaron con HBSS con Ca^{2+} (-Tg) o en HBSS libre de Ca^{2+} con 1 µM de Tg durante 10 minutos (+Tg). RES (50 µM) se preincubó 10 minutos antes del tratamiento con Tg y se mantuvo durante el tratamiento con Tg. EB1-GFP se inmunoprecipitó con GFP-Trap y el nivel de STIM1 unido a EB1 se evaluó por inmunoblot usando un anticuerpo anti-STIM1. El nivel de EB1-GFP precipitado se evaluó con un anticuerpo anti-GFP. La cantidad total de EB1-GFP y de FLAG-STIM1 expresado en cada condición se evaluaron utilizando los lisados totales. Finalmente para comprobar la activación de STIM1 por el vaciado de los depósitos intracelulares se monitorizó fosfo-Ser621-STIM1 en los lisados totales. La cuantificación de la unión STIM1-EB1 se llevó a cabo por densitometria utilizando el software ImageJ. Para el análisis estadístico se compararon los datos con el control (-Tg, –RES). n.s.: no significativo $p>0,05$; ***$p<0,001$.

13. RESVERATROL INHIBE LA MULTIMERIZACIÓN DE STIM1 EN CÉLULAS HEK293.

Un importante evento para la activación de SOCE es la multimerización de STIM1 en respuesta al vaciado de Ca^{2+} del RE. Esta multimerización está regulada por el dominio de unión a Ca^{2+} intraluminal de STIM1 (Stathopulos et al., 2006). Además el dominio SAM (*sterile-alpha motif*) inicia la homo-oligomerización de la proteína, facilitando la multimerización de STIM1 (Baba et al., 2006). Como sugirió Baba et al., el movimiento y multimerización de STIM1 también se encuentran mediados por las regiones citoplasmáticas coiled-coil y los dominios ricos en Ser/Pro (Baba et al., 2006). Además Sampieri et al., sugirieron que no sólo el vaciado de depósitos de Ca^{2+} sino también la disociación de STIM1 y EB1 es requerida para activar SOCE, es decir para permitir la unión de STIM1 a ORAI1 (Sampieri et al., 2009). Todos estos resultados nos permiten proponer que tras el vaciado de los depósitos intracelulares, la fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2 regula la disociación de STIM1 y EB1, y que este hecho facilita la formación de multímeros y favorece la relocalización de STIM1 en las cercanías de la membrana plasmática para poder activar los canales SOC (Pozo-Guisado et al., 2013). Así, en este trabajo hemos analizado la multimerización de STIM1 en presencia de RES. Para ello hemos utilizado células HEK293 que expresan de modo estable STIM1-GFP. Las células se trataron durante 3 minutos con Tg 1 μM, para inducir el vaciado de depósitos intracelulares de Ca^{2+}, en presencia o ausencia de RES. De este modo en la **Figura 54** podemos ver que Tg induce la multimerización de STIM1 en aproximadamente el 40% de las células tratadas. Sin embargo, la preincubación con RES 10 μM reduce el nivel de multimerización de STIM1 hasta un 15-20%. Además, la disminución en la multimerización de STIM1 fue similar a la observada en células tratadas con el inhibidor de ERK1/2 PD0325901, lo que sugiere que la inhibición de la multimerización de STIM1 por RES está directamente relacionada con la inhibición de la fosforilación de STIM1 por esta fitoalexina (veánse **Figura 51** y **Figura 52**).

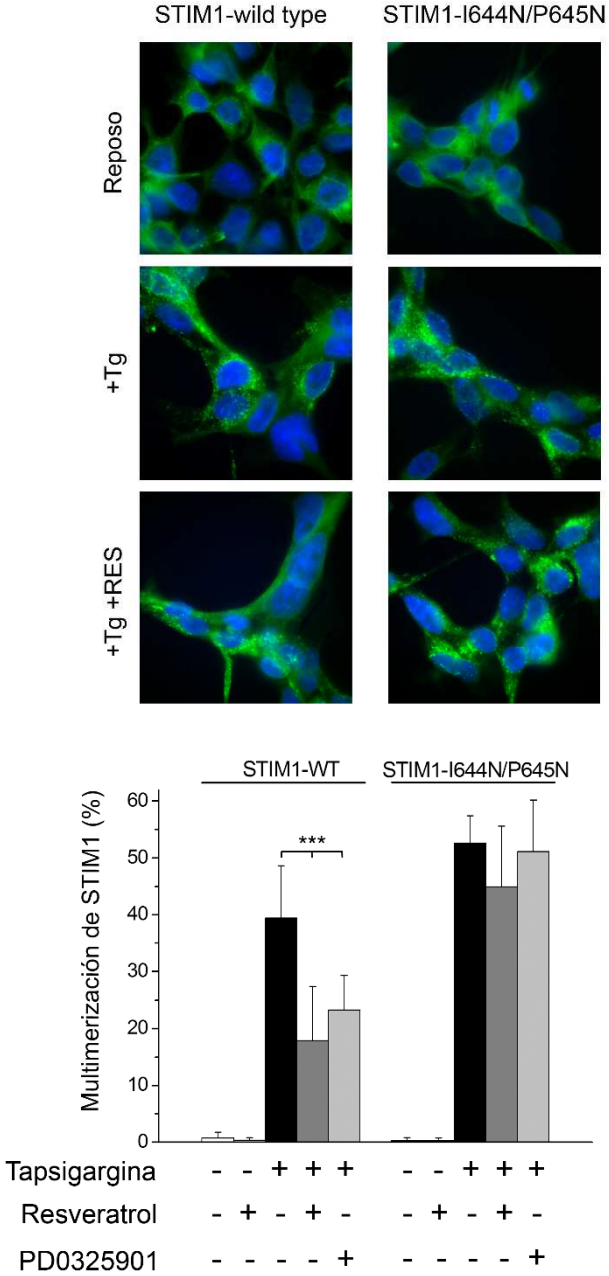

Figura 54: RES inhibe la multimerización de STIM1 en células HEK293. Las células HEK293 que expresan de modo estable STIM1-GFP (WT o I644N/P645N) se incubaron con Tg 1 μM en presencia o ausencia de RES 10 μM en HBSS libre de Ca^{2+} durante 3 minutos. El porcentaje de células que presentaban una marcada multimerización de STIM1 (multimeros > 0,2 μm) se calculó a partir de un mínimo de 200 células por condición. Se muestran imágenes representativas de las células en las distintas condiciones. Como control del experimento las células se incubaron con PD0325901 (0,1 μM). ***p<0,001.

Ha sido descrito que la mutación de STIM1 en los residuos Ile644-Pro645 a Asn644-Asn645 promueve la disociación de STIM1 y EB1 (Honnappa et al., 2009; Pozo-Guisado et al., 2013). De este modo STIM1-I644N/P645N permanece separado de EB1 independientemente del nivel de fosforilación de STIM1 (Pozo-Guisado et al., 2013).

Para determinar si el efecto de RES sobre la multimerización de STIM1 está directamente relacionado con la inhibición de la fosforilación de STIM1 analizamos si RES inhibía la multimerización de STIM1 en células que expresan STIM1-I644N/P645N. Para ello, células HEK293 que expresan esta mutación de STIM1 (STIM1-I644N/P645N-GFP) se trataron con Tg 1 μM en presencia y ausencia de RES. Tal y como esperábamos y de acuerdo con la hipótesis inicial, las células que expresan STIM1-I644N/P645N-GFP tratadas con RES 10 μM no muestran inhibición de la multimerización de STIM1 (**Figura 54**), ya que esta mutación libera a STIM1 de EB1 permitiendo su multimerización de manera independiente del nivel de fosforilación de STIM1 en los sitios diana de ERK1/2.

14. RESVERATROL INHIBE LA UNIÓN DE STIM1 A ORAI1 EN CÉLULAS HEK293.

La multimerización de STIM1 es un evento que precede a la unión de STIM1 a los canales SOC para su activación (Zhou et al., 2013). Así, hemos determinado si la inhibición de la multimerización inducida por RES afecta a la unión de STIM1 a ORAI1 tras la inducción del vaciado de depósitos con Tg. Para ello se utilizaron células HEK293 que expresan de modo estable STIM1-GFP y que fueron transfectadas para la expresión transitoria de HA-ORAI1. Las células se trataron con Tg 1 μM en presencia y ausencia de RES 50 μM y se analizó la coprecipitación del complejo STIM1-ORAI1. STIM1-GFP se inmunoprecipitó con resinas de GFP-Trap y se analizó la co-precipitación de HA-ORAI1 mediante inmunoblot usando un anticuerpo específico anti-HA. Como control negativo del experimento se utilizaron células HEK293 que expresaban de modo estable STIM1-GFP y que fueron transfectadas para la expresión del péptido HA. Por otro lado se comprobó que el nivel total de STIM1-GFP precipitado era similar en todas las condiciones ensayadas. Del mismo modo se utilizaron lisados totales para analizar el nivel de activación de las quinasas ERK1/2, así como el nivel total de dichas quinasas (marcado como tERK1/2), comprobando que no existe cambios en el nivel de expresión en los distintos grupos experimentales. En la **Figura 55** se muestra la cuantificación de ORAI1 co-precipitado. Los datos revelan que el tratamiento con RES reduce la cantidad de ORAI1 unido a STIM1 en condiciones de vaciado de depósitos intracelulares de Ca^{2+},

confirmando así que la inhibición de SOCE llevada a cabo por RES era debida, al menos en parte, a una disminución en el nivel de unión STIM1-ORAI1.

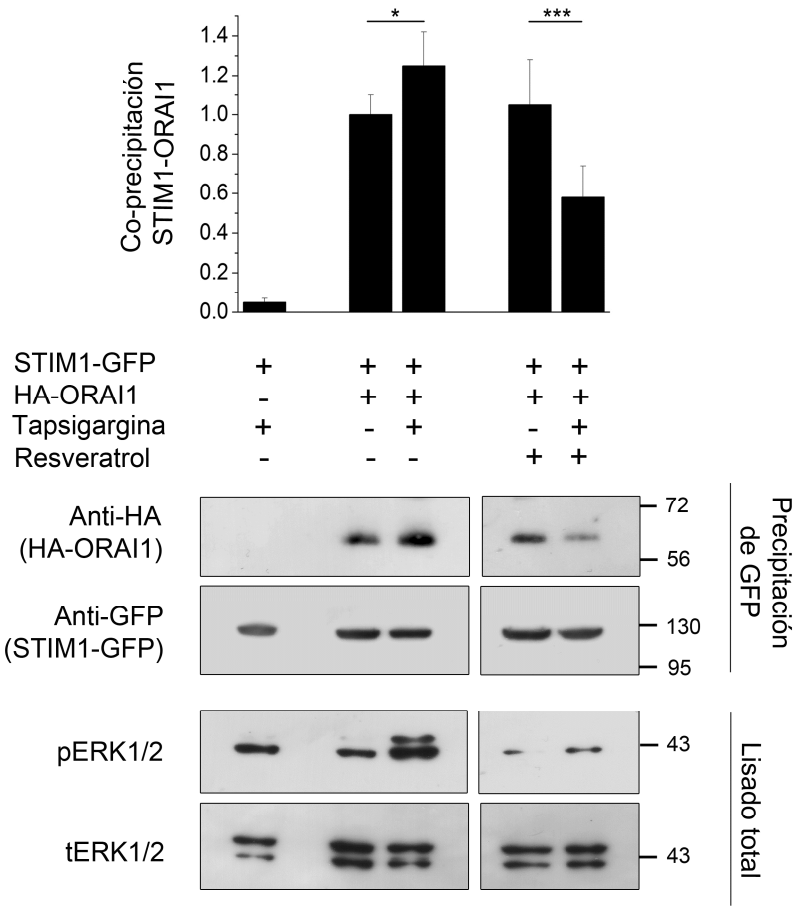

Figura 55: RES impide la unión de STIM1-ORAI1 bajo condiciones de vaciado de depósitos. Las células HEK293 que expresan de modo estable STIM1-GFP se transfectaron para la expresión transitoria de HA-ORAI1. Tras la transfección (24 h) se incubaron las células en HBSS con Ca^{2+} (-Tg), o en HBSS libre de Ca^{2+} con Tg 1 μM durante 10 minutos (+Tg), o con RES (50 μM) durante 10 minutos de preincubación antes al tratamiento con Tg, y durante el tratamiento con Tg. El nivel de ORAI1 unido a STIM1 se determinó por inmunoblot utilizando un anticuerpo específico anti-HA. El nivel de STIM1 precipitado se determinó con un anticuerpo anti-GFP. Para ver la activación de ERK1/2 por Tg así como la inhibición por RES, se monitorizó anti-fosfo-ERK1/2 (marcado como pERK1/2) y total-ERK1/2 (marcado como tERK1/2) mediante inmunoblot utilizando los lisados totales. La cuantificación de la unión de STIM1-EB1 se llevó a cabo por densiometría utilizando el software *ImageJ*. Para el análisis estadístico se compararon los datos con el control (-Tg). *p<0,05; ***p<0,001.

Estos datos sugieren que RES inhibe la actividad ERK1/2 y por tanto la fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2. Como consecuencia de la inhibición de la fosforilación de STIM1, éste se encuentra unido a EB1, disminuyendo así la multimerización de STIM1 y por tanto la unión a ORAI1 en la membrana plasmática. Por tanto, todos estos datos sugieren que fosforilación de STIM1 es una diana principal para RES en la inhibición de SOCE.

Un experimento crucial que apoya esta hipótesis es la medida de entrada de Ca^{2+} (SOCE) en células HEK293 que expresan STIM1-S575E/S608E/S621E o en células que expresan STIM1-I644N/P645N tratadas con RES. Ambos mutantes inducen la disociación de STIM1 de EB1. Además, el mutante S/E mimetiza una fosforilación constitutiva de STIM1, de manera que RES no podría inducir una desfosforilación de esos residuos. Por otro lado los mutantes de STIM1-IP/NN permanecen disociados de EB1 independientemente del nivel de fosforilación de los residuos Ser575/Ser608/Ser621. Por todo ello, y siguiendo la hipótesis y conclusiones anteriores, esperábamos que la entrada de Ca^{2+} no se viera afectada por el tratamiento con RES en estos mutantes. Las medidas de entrada de Ca^{2+} se llevaron a cabo en células HEK293 que expresaban de modo estable FLAG-ORAI1 y que fueron transfectados para la expresión transitoria de 1) STIM1-WT-mCherry (línea en negro); 2) STIM1-S575E/S608E/S621E-mCherry (línea en rojo); y 3) STIM1-I644N/P645N-mCherry (línea en verde). Las células se cargaron con fura-2 y se indujo el vaciado de depósitos con Tg 1 μM en medio libre de Ca^{2+} (minuto 2 de la gráfica). Tras la estabilización del nivel de Ca^{2+} citosólico, añadimos Ca^{2+} al medio extracelular (minuto 8 de la gráfica), monitorizando así la entrada de Ca^{2+} al citosol. De este modo, en la **Figura 56 – panel A** podemos observar que la expresión de estos mutantes (STIM1-S575E/S608E/S621E o STIM1-I644N/P645N) no afecta a la entrada de Ca^{2+} tras inducir el vaciado de depósitos con Tg. Del mismo modo, en la **Figura 56 – panel B** podemos ver que RES no inhibe SOCE en células que expresan STIM1-S575E/S608E/S621E o STIM1-I644N/I645N, lo cual apoya que la fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2 es la principal diana de RES en la inhibición de SOCE.

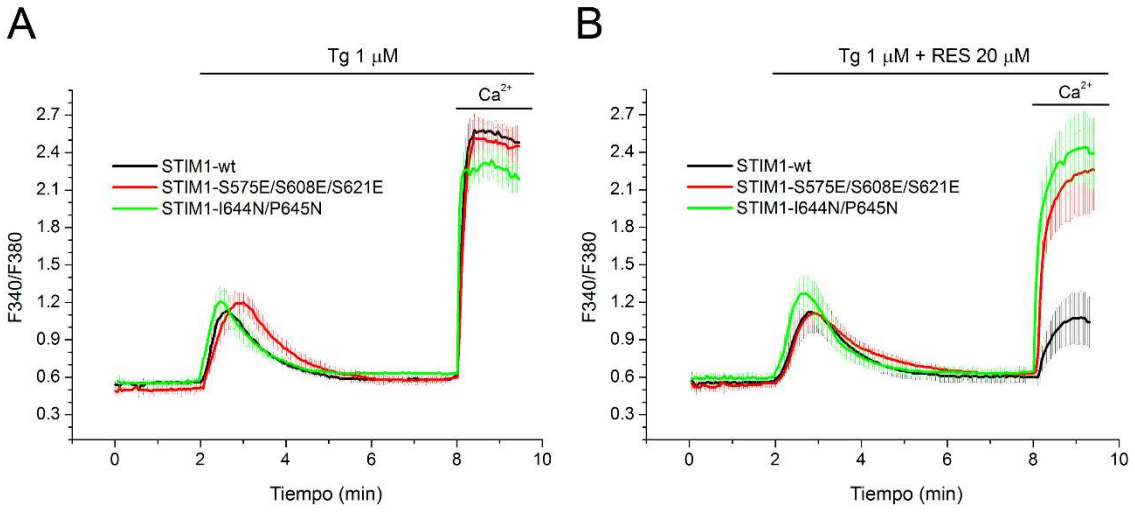

Figura 56: SOCE no se inhibe por RES en células que expresan STIM1-S575E/S608E/S621E o STIM1-I644N/P645N. Las células HEK293 que expresan de modo estable Flag-ORAI1 fueron transfectadas para la expresión transitoria de STIM1-mCherry (línea negra), STIM1-S575E/S608E/S621E-mCherry (línea roja) o STIM1-I644N/P645N-mCherry (línea verde). **(A)** Se evaluó SOCE en células cargadas con fura-2 a las que se añadío Tg 1 μM en HBSS libre de Ca^{2+}, seguido de una adición de Ca^{2+} 2 mM **(B)** Se evaluó SOCE en células cargadas con fura-2 a las que se le añadío Tg 1 μM junto con RES 20 μM , seguida de la adición de Ca^{2+} 2 mM.

DISCUSIÓN

Este trabajo pone de manifiesto la estrecha relación que existe entre el vaciado de los depósitos de Ca^{2+} (retículo endoplasmático), la activación de las quinasas ERK1/2 y la fosforilación de STIM1. Desde que en el año 2000 Manji y cols. definiesen a STIM1 como una proteína susceptible de ser fosforilada (Manji et al., 2000), muchos han sido los estudios enfocados a determinar los residuos de STIM1 que se fosforilan, así como las funciones en las que están implicados estos fosforesiduos. En 2006 Olsen y cols. observaron numerosos residuos de STIM1 fosforilados en células HeLa tratadas con EGF (Olsen et al., 2006). Posteriormente, en 2009, Smyth y cols. describieron la fosforilación de los residuos Ser575, Ser608, Ser621, Ser492, Ser553, Ser602, Ser620 y Ser668 (Smyth et al., 2009). Al mismo tiempo, utilizando como modelo de estudio ovocitos de *Xenopus*, Yu y cols. describieron también varios residuos de serinas y treoninas de STIM1 fosforilados, entre ellos, los residuos Ser575 y Ser621 (Yu et al., 2009). Por otro lado, nuestros resultados con células HEK293 han puesto de manifiesto la fosforilación de STIM1 en los residuos Ser575, Ser608 y Ser621. La fosforilación de estas serinas se identificó con técnicas de espectrometría de masas y mediante experimentos de fosforilación *in vitro*, y se demostró que estos residuos son diana de las quinasas ERK1/2 (Pozo-Guisado et al., 2010). Así, nuestro grupo de investigación identificó por primera vez a una quinasa responsable de la fosforilación y activación de STIM1 en unas condiciones determinadas. Por otro lado, con la utilización de anticuerpos específicos, que reconocen los residuos Ser575, Ser608 y Ser621 fosforilados, hemos podido demostrar la fosforilación de STIM1 en los residuos diana de ERK1/2 *in vivo*. Nuestro trabajo utiliza como modelo de estudio cultivos celulares asincrónicos, mientras que los estudios de Smyth y cols. utilizaron células paradas en mitosis tras el tratamiento con nocodazol. Del mismo modo, el trabajo presentado por Yu y cols. se basaba en ovocitos de *Xenopus* que se encuentran detenidos en meiosis. Este aspecto es de particular importancia ya que se ha observado que tanto en mitosis como en meiosis SOCE es una ruta inhibida (Machaca and Haun, 2000; Russa et al., 2008; Yu et al., 2009). En este sentido, Smyth y cols. demostraron que, en células HeLa y HEK293 paradas en mitosis, la fosforilación de las Ser486 y la Ser668 inhibía SOCE (Smyth et al., 2009). Además, estos mismos autores consideraron en función de sus resultados que las Ser575 y Ser621 se encontraban fosforiladas de modo constitutivo. Sin embargo, con la utilización de anticuerpos fosfo-específicos hemos podido observar un nivel basal de fosforilación cuando las células están en reposo y un incremento significativo en la fosforilación de

estos residuos cuando se activa SOCE tras el vaciado de depósitos de Ca^{2+}. El tratamiento con tapsigargina (Tg) se desarrolla mediante la inhibición de la SERCA, por lo que se bloquea el rellenado del retículo endoplasmático. Por otro lado, también hemos observado un incremento en la fosforilación de STIM1 tras la estimulación de las células con el factor de crecimiento epidérmico (EGF), lo que supone un estímulo más similar a una activación de tipo fisiológico. De este modo, nuestros resultados muestran que la fosforilación de STIM1 en los residuos Ser575, Ser608 y Ser621 es desencadenada por la activación de las quinasas ERK1/2 y que este paso es crítico para la activación de SOCE. Además hemos podido observar que la fosforilación de STIM1 en los sitios diana de ERK1/2 está relacionada con su multimerización, disociación de microtúbulos, interacción con canales SOC y la entrada de Ca^{2+} extracelular.

La ruta de señalización RAS-RAF-MEK-ERK se activa tras la unión de un ligando específico a receptores tirosina quinasa presentes en la membrana plasmática. Entre estos receptores tirosina quinasa nos encontramos el receptor de EGF (EGFR), frecuentemente mutado o sobreexpresado en diferentes tipos de cáncer de humano. En este sentido, numerosos estudios han puesto de manifiesto que la isoforma K-RAS, de la proteína Ras, está mutada en aproximadamente el 30% de casos de cáncer en humanos, y que la mutación B-RAF (V600E), que activa la proteína de forma constitutiva, es la más común en nuestra población (Cantwell-Dorris et al., 2011). Debido a la importancia que tiene esta ruta en el origen de distintos tipos de cáncer, muchos estudios clínicos se han centrado en el uso de inhibidores específicos de la ruta de señalización RAS-RAF-MEK-ERK con el fin de evaluar su potencial como posible tratamiento frente al desarrollo tumoral (Roberts and Der, 2007).

Numerosos factores de crecimiento, citoquinas y hormonas, modulan la ruta de las MAPK y, por tanto, activan las quinasas ERK1/2. En este sentido, STIM1 fosforilado podría ser un efector de esta ruta y ser el responsable de numerosos eventos celulares. En este trabajo hemos utilizado la línea celular Ishikawa derivada de un adenocarcinoma endometrial humano y se ha mostrado por primera vez que la activación de las rutas de señalización activadas por EGF induce la fosforilación de STIM1 en los sitios diana de ERK1/2. Además, hemos mostrado que la fosforilación de STIM1 regula su activación modulando procesos tan importantes para la célula como la migración celular o la transición epitelio-mensénquima. Del mismo modo, estudios paralelos realizados en nuestro laboratorio han mostrado la fosforilación de STIM1 en los residuos dianas de

ERK1/2 y su activación tras el tratamiento con IGF-1, que también activa la ruta de las MAPK (Tomas-Martin et al., 2015). Además, también hemos podido mostrar cómo la mutación oncogénica H-RAS(G12V) estimula la fosforilación y activación de STIM1 en ausencia de EGF, corroborando así que la ruta RAS-RAF-MEK-ERK estimula la fosforilación de STIM1. Todos estos resultados nos permiten proponer a STIM1 como un nuevo efector de la cascada RAS-RAF-MEK-ERK que tendría como diana la activación de canales SOC y con ello, la entrada de Ca^{2+} y la activación de numerosos procesos celulares de pendientes de Ca^{2+}. De este modo, nuestros resultados muestran que la activación de la ruta de señalización RAS-RAF-MEK-ERK-STIM1 regula varios procesos celulares, entre ellos motilidad y migración. De forma similar, la presencia de fosfo-tirosinas descrita en plaquetas y la fosforilación de la Ser575 descrita en mioblastos podría explicar la activación plaquetaria (Elvers et al., 2012) y la diferenciación de mioblastos (Lee et al., 2012).

Otra conclusión importante que podemos extraer de los resultados obtenidos en este trabajo es que la activación de MEK-ERK no requiere de la entrada de Ca^{2+} extracelular, ya que la expresión de H-RAS (G12V) es suficiente para activar ERK1/2. Además, este resultado ha sido corroborado tras observar activación de ERK1/2 y fosforilación de STIM1 en ausencia de Ca^{2+} extracelular. Aunque este trabajo no se ha centrado en la ruta de activación de ERK1/2 en ausencia de influjo de Ca^{2+}, existen diversas posibilidades que habilitarían esta activación, siendo la más probable la activación de la Ca^{2+}/calmodulina quinasa II (CaMKII) tras el tratamiento con EGF o Tg. Cualquiera de estas dos estimulaciones conduce a un incremento de la concentración de Ca^{2+} citosólico, que activaría CaMKII, que es un conocido regulador de RAF1, por lo que la activación de ésta última podría explicar la activación de ERK1/2.

En los últimos años se ha propuesto la activación de los canales SOC como potencial diana terapéutica en el tratamiento del cáncer, ya que se ha visto que la activación de estos canales está implicada en la proliferación celular de células de glioblastoma (Liu et al., 2011; Motiani et al., 2013) y células de glándula mamaria MDA-MB-231 (Yang et al., 2009). Se ha propuesto que ORAI1, proteína que constituye un tipo de canal SOC, está directamente implicada en proliferación celular (El Boustany et al., 2010). Además, la proteína ORAI3 se ha relacionado directamente con desarrollo tumoral en la línea de cáncer de glándula mamaria humana MCF-7 (Motiani et al., 2013). Consecuentemente, numerosos grupos han demostrado que la proliferación de diversas

líneas celulares se reduce (1) tras el bloqueo de canales SOCs con el tratamiento con SKF96365, un conocido agente bloqueante de la entrada de Ca^{2+}; y (2) tras la reducción de la expresión de los principales componentes de los canales SOC, es decir, tras el bloqueo de la síntesis de STIM1 y/o ORAI1 (Chen et al., 2011; Faouzi et al., 2011; Liu et al., 2011; Motiani et al., 2013; Yang et al., 2013; Yang et al., 2009; Yoshida et al., 2012). Además, se ha mostrado también que el bloqueo de canales SOC con SKF96365, así como tras la reducción de expresión de STIM1 mediante siRNA, disminuye la migración celular en células de hepatocarcinoma (Yang et al., 2013). Tras analizar la migración de células Ishikawa, hemos podido demostrar que este proceso se ve disminuido en aquellas células que sobre-expresaban STIM1 mutado en las serinas 575, 608 y 621 para simular una desfosforilación constitutiva (Ser/Ala). Esta desfosforilación mantiene inactivo a STIM1 y por tanto, mantiene inhibida la maquinaria de SOCE, resultado que concuerda con los obtenidos por otros autores mediante la reducción de la expresión de STIM1 o el bloqueo de los canales SOCs (Yang et al., 2013).

Estos datos, junto con el hecho de que la migración de células Ishikawa sea inhibida tanto con SKF96365 como por PD0325901, inhibidor de ERK1/2, nos permite sugerir que la inhibición de la fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2 es suficiente para prevenir la migración celular. Esta hipótesis ha sido explorada y validada mediante el reciente descubrimiento de que la activación de receptores tirosina quinasa conlleva a la activación local de STIM1 en el frente de migración de células epiteliales (Tsai et al., 2014).

Otro evento importante en el desarrollo de cáncer es la transición epitelio mesénquima (TEM), proceso mediante el cual las células epiteliales sufren cambios morfológicos que les permiten disminuir la adhesión a la lámina basal y estimular su capacidad de migración e invasión en otros tejidos. Es ampliamente conocida la implicación de EGF en este proceso en distintos tipos celulares (Cheng et al., 2012; Lee et al., 2008; Richter et al., 2011). En este trabajo hemos podido demostrar la implicación de STIM1 en esta transformación epitelio-mesénquima tratando células de tipo epitelial (células Ishikawa) con EGF durante 24 horas. Por un lado, se pudo comprobar cómo la proteína E-cadherina, que en células epiteliales aparece localizada en la membrana plasmática, sufre una relocalización hacia el citosol tras el tratamiento con EGF. Este resultado concuerda con los mostrados por Grille y cols. en la línea celular de carcinoma SCC13 (Grille et al., 2003). Otro marcador utilizado en este trabajo para detectar la

transición epitelio-mensénquima es vimentina, que se encuentra sobreexpresado en tipos mesenquimales como hemos confirmado tras el tratamiento de células Ishikawa con EGF. Sin embargo, las células Ishikawa transfectadas con STIM1-S575A/S608A/S621A apenas presentan niveles detectables de vimentina, lo que corrobora la hipótesis de que la desfosforilación de STIM1 disminuye significativamente la transformación de células epiteliales en mesenquimales. Estos resultados están por lo tanto estrechamente relacionados con los que muestran la disminución en migración observada en células que sobreexpresaban el mutante de STIM1 que simula una desfosforilación, ya que el fenotipo epitelial presenta una menor motilidad. Además, estos resultados concuerdan con la disminución de la migración celular observada por otros grupos tras una regulación negativa de la expresión de STIM1 (Chen et al., 2011; Faouzi et al., 2011; Liu et al., 2011; Motiani et al., 2013; Yang et al., 2013; Yang et al., 2009; Yoshida et al., 2012). Así, nuestros resultados nos permiten sugerir que la fosforilación de STIM1 inducida por EGF activa la entrada de Ca^{2+} a través de los canales SOC y que este aumento de Ca^{2+} intracelular debe activar factores de transcripción que inducen la expresión de vimentina o la relocalización de E-cadherina al citosol, promoviendo de este modo la transformación fenotípica a un tipo mesenquimal.

Por otro lado, la migración celular se encuentra gobernada por la dinámica de microtúbulos y existen varios trabajos que han puesto de manifiesto la relación entre STIM1 y microtúbulos (Bain et al., 2007; Chen et al., 2013; Grigoriev et al., 2008; Pozo-Guisado et al., 2013). Todos estos resultados nos llevaron a estudiar el papel de STIM1 en migración celular y más concretamente el papel de la fosforilación de STIM1 en la modulación de la migración. STIM1 es transportado a través de los túbulos del retículo endoplasmático mediante un mecanismo dependiente de EB1, proteína que regula el extremo en crecimiento de microtúbulos (plus-end). De hecho, STIM1 se une directamente a EB1, de manera que STIM1 se considera una *plus-end-tracking protein* (+TIPs) (Grigoriev et al., 2008). Se ha demostrado que EB1 y STIM1 colocalizan en determinadas condiciones, aunque existen diferencias entre tipos celulares, comportándose de modo distinto en los fibroblastos MRC5-SV y en la línea celular HeLa (Grigoriev et al., 2008). Mientras STIM1 colocaliza con EB1 bajo condiciones de vaciado de depósitos en células HeLa, en fibroblastos MRC5-SV STIM1 se transporta de forma independientemente de EB1. Estos resultados han permitido sugerir que la asociación de STIM1 a microtúbulos no es necesaria para la activación de SOCE (Grigoriev et al.,

2008). Otros autores han encontrado que el tratamiento de células HEK293 con nocodazol, un inhibidor de la polimerización de microtúbulos, inhibe SOCE (Smyth et al., 2007), lo que sugiere que la asociación entre STIM1 y microtúbulos modula positivamente SOCE. Posteriormente, Sampieri y cols. encontraron que la disociación de STIM1 y EB1 es un requisito para la formación de multímeros de STIM1 y por tanto, la activación de ORAI1 y SOCE (Sampieri et al., 2009). De este modo, los mecanismos que inducen la disociación del complejo STIM1-EB1, requerida para la activación de SOCE, es desconocida aún. Así, durante el desarrollo de este trabajo, fueron varias las evidencias que nos llevaron a estudiar el papel de la fosforilación de STIM1 como posible mecanismo que modula la asociación dinámica entre STIM1 y EB1: (i) se ha sugerido que el dominio Ser/Pro de STIM1 está implicado en la formación de multímeros y por tanto en la activación de SOCE (Baba et al., 2006); (ii) EB1 se une directamente a la secuencia TRIP de STIM1, que está localizada cerca del dominio Ser/Pro (Honnappa et al., 2009); (iii) la unión de otras proteínas +TIPs a EB1 es regulada mediante la fosforilación de residuos vecinos de la secuencia S/TxIP (Kumar et al., 2009; Watanabe et al., 2009); y (iv) STIM1 se fosforila en las proximidades de la secuencia S/TxIP, que sirve de unión a EB1 (Pozo-Guisado et al., 2010).

En este sentido nuestros resultados concuerdan con previos estudios, en los que otras proteínas +TIPs, como son CLASPs (Kumar et al., 2009), APC (Nathke, 2004) y MCAK (Andrews et al., 2004), son fosforiladas en residuos próximos a la secuencia S/TxIP, regulando de este modo la interacción con microtúbulos. En todos los casos, al igual que ocurre con STIM1, las secuencias que flanquean a S/TxIP contienen numerosos residuos básicos que permiten la unión a residuos de EB1, mientras que la fosforilación de residuos estaría añadiendo carga negativa que estimularía la disociación de EB1. Este trabajo presenta evidencias sólidas de que la fosforilación de STIM1 en los sitios diana de ERK1/2 (Ser575, Ser608, Ser621) regula la disociación entre STIM1 y EB1, paso necesario para la activación de SOCE. Por otro lado, nuestras conclusiones no descartan la posibilidad de que otros sitios puedan ser fosforilados para llevar a cabo otras funciones, como ocurre con CLASPs, en la que patrones distintos de fosforilación determinan si las CLASPs se unen al extremo en crecimiento de los microtúbulos o bien si se asocian a lo largo de los mismos (Kumar et al., 2009). Este podría ser el caso de STIM1, ya que la fosforilación en sitios diana de ERK1/2 disocia a la proteína EB1 y promueve SOCE, mientras que, por el contrario, la fosforilación de otros residuos de

STIM1 ha sido relacionada con la inhibición de SOCE en mitosis (Smyth et al., 2009). Además, es posible que otras modificaciones post-traduccionales de STIM1 tengan alguna repercusión en el papel de la fosforilación de ciertos residuos de STIM1 y por tanto, modulen su función. Con esta consideración, la modificación de STIM1 en los residuos Ser/Thr con N-acetilglucosamina (N-acetil glicosilación) atenúa la multimerización de STIM1 en cardiomiocitos neonatales llevando a la inhibición de SOCE (Zhu-Mauldin et al., 2012). También estos autores demostraron que el aumento de N-acetil glicosilación de STIM1 alteraba la fosforegulación de STIM1, lo que sugiere una relación entre ambas modificaciones post-traduccionales.

Aunque en este trabajo hemos comprobado que EGF induce la disociación entre STIM1 y EB1, la fosforilación de STIM1 es reversible, de modo que la desfosforilación de STIM1 estimula la nueva asociación a EB1, proceso que afecta a la entrada de Ca^{2+} regulada por depósitos intracelulares (Pozo-Guisado et al., 2013). Esto significa que existe un proceso cíclico de fosforilación/desfosforilación de STIM1 que permite de forma dinámica la liberación y unión a EB1. Para testar si el transporte mediado por microtúbulos es el responsable de la localización de STIM1, Tsai y cols. expresaron un mutante de STIM1 deficiente en la unión con EB1 (YFP-STIM1-Ile644Asn/Pro645Asn). Los resultados mostraron que este mutante de STIM1 presentaba una activación de SOCE similar a la presentada por la proteína silvestre, indicando así que el mutante mantiene su habilidad completa para controlar la entrada de Ca^{2+} (Tsai et al., 2014). Sin embargo, YFP-STIM1-Ile644Asn/Pro645Asn falló en su polarización celular durante la migración, sugiriendo así el requerimiento del complejo STIM1-EB1 en estado de reposo aunque no para la activación de SOCE. De este modo, es posible que STIM1 viaje unido a EB1 hasta alcanzar una región de la célula con alta actividad de RAS-RAF-MEK-ERK y una vez fosforilado se disocie de EB1 para activar la entrada de Ca^{2+}.

Los resultados mostrados en este trabajo ponen de manifiesto la importancia de la inhibición de la ruta RAS-RAF-MEK-ERK-STIM1 para inhibir procesos celulares relacionados con migración de células tumorales. Desde que en 1997, Jang y cols. publicaran que resveratrol (RES) inhibía carcinogénesis (Jang et al., 1997), se han llevado a cabo numerosos estudios en los que se administraba RES con el fin de estudiar la reducción del crecimiento de tumores utilizando diferentes modelos animales (Asensi et al., 2002; Marier et al., 2002; Meng et al., 2004). Además, los estilbenos se han considerado como anticancerígenos desde que se conoce que pueden inhibir SOCE

(Dobrydneva et al., 2003). Sin embargo, el mecanismo molecular de la inhibición de SOCE mediado por RES no está claro, lo que hace necesario localizar las dianas moleculares de esta inhibición, así como concretar su uso terapéutico.

En este trabajo hemos contribuido al análisis del mecanismo molecular de inhibición de SOCE. Nuestros resultados muestran que RES inhibe SOCE con una IC_{50} próxima a 10 μM en células HEK293. Además, hemos observado que esta inhibición no es debida a que RES bloquee directamente el canal, sino a la inhibición de la cascada de señalización celular responsable de la fosforilación de STIM1. Los experimentos realizados con mutantes de STIM1 indican que la fosforilación de STIM1 en los residuos diana de ERK1/2 (Ser575, Ser608 y Ser621) es necesaria para activar SOCE y que la fosforilación de estos residuos es inhibida por RES. Esta inhibición podría ser debida a la inhibición directa de ERK1/2 por RES, pero no descartamos la posibilidad de que RES actúe sobre quinasas que activen ERK1/2, como ya han sugerido otros autores (Delmas et al., 2006). De este modo, el hecho de que RES inhiba la activación de ERK1/2 y la fosforilación de STIM1 explica la inhibición en la entrada de Ca^{2+} en presencia de RES. Estos datos han sido corroborados tras observar que RES no inhibe movilización de Ca^{2+} en células que sobre-expresan el mutante STIM1-S575E/S608E/S621E. Por otro lado, hemos mostrado que, además de inhibir SOCE, RES también inhibe la multimerización de STIM1, la disociación de EB1 y la interacción de STIM1 a ORAI1, mientras que la actividad del mutante STIM1-S575E/S608E/S621E no se ve afectado por RES. Estos resultados pueden dar explicación a la inhibición de la migración celular observada por otros autores en células tratadas con RES (Kumerz et al., 2011), al igual que la inhibición de la TEM en distintos tipos celular tratados con RES (Ji et al., 2015; Li et al., 2013).

Se ha mostrado que RES altera muchas dianas moleculares y que además tiene un efecto dosis-dependiente (revisado por (Mukherjee et al., 2010)). En este sentido se ha observado que RES activa la ruta PI3K a concentraciones próximas a 10 μM en células MCF-7, mientras que presenta inhibición de la vía PI3K e inhibición de la proliferación celular a concentraciones superiores a 50 μM (Pozo-Guisado, 2004). El efecto de RES sobre la fisiología de la célula es probable que dependa del tipo celular, pero es posible que la inhibición de SOCE por RES afecte principalmente a aquellos tipos celulares que son fuertemente dependientes de la entrada de Ca^{2+}.

Por otro lado, se ha mostrado que RES promueve la parada del ciclo celular en la fase S en diferentes líneas celulares, incluyendo células de cáncer de mama (Pozo-Guisado et al., 2002) mientras que el bloqueante de canales de Ca^{2+} SKF96365 produce una parada en fase G2/M (Nordstrom et al., 1992). Este efecto diferente entre RES y SKF96365 podría explicarse por el hecho de que RES, además de inhibir la entrada de Ca^{2+}, presente muchas otras dianas celulares.

En resumen, hemos descrito que la fosforilación *in vivo* de STIM1 en las Ser575, Ser608 y Ser621 se encuentra mediada por la actividad de ERK1/2 y que esta fosforilación puede ser inducida tanto por Tg como por estímulos más fisiológicos como EGF. Además, hemos puesto de manifiesto que la fosforilación de STIM1 regula su multimerización, disociación de EB1, interacción con ORAI1 y la activación de SOCE. Del mismo modo hemos mostrado que la fosforilación de STIM1 media la migración celular y la TEM inducida por EGF en células epiteliales de endometrio. Asimismo, hemos mostrado que la activación de STIM1 se ve bloqueada tras inhibir la fosforilación de los residuos dianas de ERK1/2 con RES o tras la sobre-expresión del mutante STIM1-S575A/S608A/S621A. Además, este trabajo pone por primera vez de manifiesto que STIM1 es un efector de la ruta de señalización RAS-RAF-MEK-ERK lo que sugiere un papel relevante de la fosforilación de STIM1 como posible diana terapéutica en el tratamiento frente al cáncer.

CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo han sido:

1.- El vaciado de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} induce la fosforilación de STIM1 en los residuos Ser575, Ser608 y Ser621, siendo ERK1/2 las quinasas responsables de dicha fosforilación.

2.- La activación de STIM1 por fosforilación estimula la multimerización de STIM1, la disociación de EB1, la interacción con el canal ORAI1 y el influjo de Ca^{2+} desde el medio extracelular hacia el interior celular.

3.- La fosforilación de STIM1 en los residuos diana de ERK1/2 es detectada tanto con un tratamiento con tapsigargina, un inhibidor de la SERCA, como con el factor de crecimiento epidérmico EGF.

4.- La activación de la ruta Ras-Raf-MEK-ERK, ya sea mediante EGF, o con una versión constitutivamente activa de Ras (H-RasG12V), estimula la fosforilación de STIM1 en ausencia de Ca^{2+} extracelular, por lo que la fosforilación de STIM1 es independiente del influjo de Ca^{2+} desde el medio extracelular.

5.- La fosforilación de STIM1 en los sitios diana de ERK1/2 estimula la migración de células de adenocarcinoma endometrial inducida por EGF. Del mismo modo, la fosforilación de STIM1 regula la transición epitelio-mesénquima estimulada por EGF.

6.- El resveratrol inhibe el influjo de Ca^{2+} tras el vaciado de depósitos intracelulares inducido por tapsigargina en células HEK293. Además, esta inhibición es debida, al menos parcialmente, a la inhibición de la fosforilación de STIM1 en sitios diana de ERK1/2 mediada resveratrol.

7.- El resveratrol inhibe la multimerización de STIM1 estimulada por tapsigargina, así como la disociación de EB1 y la interacción con ORAI1. Estos resultados sugieren que el resveratrol, como inhibidor de SOCE, es un potencial inhibidor de migración celular y de la transición epitelio-mesénquima en células tumorales.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CULTIVOS CELULARES

1.1 Cultivo de las líneas celulares.

En este estudio se ha empleado las línea celular embrionaria HEK293 (Human Embryonic Kidney cells) transfectada de forma estable con plásmidos que contienen la información necesaria para la expresión de la proteína STIM1 (NP_033313) de ratón (*Mus musculus*). También se ha empleado la línea celular Ishikawa, establecida de un adenocarcinoma endometrial procedente de una mujer de 39 años, obtenida de la *European Collection of Cell Cultures (ECACC).*

Para expandir los cultivos o para sembrar las células a la densidad requerida en los experimentos se parte de monocapas de células al 80-90% de confluencia. Tras aspirar el medio de cultivo, las células adheridas a la placa se lavan con PBS[1] y se incuban en una solución de tripsina[2] (Invitrogen) durante 3 minutos a 37ºC. A continuación se inactiva la tripsina[2] por adición de 3 volúmenes de medio suplementado[3], se toma una alícuota de la suspensión celular obtenida y se cuenta el número de células utilizando una cámara Neubauer. Posteriormente se siembra el mismo número de células para cada condición experimental y se mantienen en atmósfera de aire humidificado con 5% CO_2 a 37°C, de tal manera que los cultivos alcancen una confluencia aproximada del 70-80% en el momento de llevar a cabo los experimentos.

1.2 Tratamientos de las líneas celulares.

Las células se siembran y se mantienen en cultivo durante 24-48 horas hasta conseguir una confluencia del 70-80%. Transcurrido este tiempo y 8-12 horas antes de la realización del experimento, el medio de cultivo se sustituye por medio libre de suero[4], con el fin de mantener las células con un nivel basal de estimulación.

---

[1] **PBS**: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 4.3 mM, KH_2PO_4 1.5 mM, pH 7.4.
[2] **Solución de tripsina**: tripsina 0.05% (p/v), EDTA 5 mM.
[3] **Medio de cultivo suplementado:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (en el caso de células HEK293) o 5% (v/v) de suero fetal bovino (en el caso de células Ishikawa), L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml.
[4] **Medio libre de suero:** DMEM, suplementado con L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml.

El tratamiento de las células con resveratrol o EGF (factor de crecimiento epidérmico) se lleva a cabo en HBSS libre de Ca^{2+} [5] durante 10-20 minutos a 37ºC. Tanto el resveratrol como el EGF se mantienen a -80ºC en alícuotas individuales, manteniéndolas un máximo de 6 meses tras su preparación.

1.3 Expresión de STIM1 en líneas celulares de HEK293 de modo estable e inducible.

Las líneas celulares HEK293 Flp-In T-Rex que expresan Flag-STIM1 o STIM1-GFP generadas en nuestro laboratorio (Pozo-Guisado et al., 2010) son resistentes a higromicina B (100 μg/ml) y a blasticidina (15 μg/ml). Por ello para mantener el DNA de STIM1 integrado en el genoma de las células se añaden estos antibióticos al medio de cultivo. Para inducir la expresión de STIM1 (Flag-STIM1 o STIM1-GFP) los cultivos se tratan con doxiciclina (1 μg/ml) durante un máximo de 24-36 horas previas a la realización de los experimentos.

Las líneas celulares transfectadas de modo estable con STIM1 se obtuvieron por clonación del cDNA de Stim1 de ratón (NM_009287) en un vector pcDNA5-FRT/TO (Invitrogen) con el péptido FLAG (H_3N-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-COOH) en el extremo N-terminal ó con GFP (Green Fluorescent Protein) en el extremo C-terminal. Se requieren tres pasos para la expresión estable de proteínas mediante el sistema Flp-In T-REx: (1) integración independiente de dos plásmidos en el genoma de las células HEK293, un plásmido con un sitio de unión (FRT) para la recombinasa **(Figura 57a)** y un plásmido que expresa un represor de Tet de forma constitutiva **(Figura 57b);** (2) integración de un vector que contiene el gen de interés bajo un promotor inducible por doxiciclina **(Figura 57c)**, mediada por la recombinasa-Flp en el sitio FRT; (3) inducción de la expresión del gen de interés por adición de doxiciclina **(Figura 58).**

[5] **HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) libre de Ca^{2+}**(Life Technologies)**:** NaCl 138 mM, KCl 5.3 mM, Na_2HPO_4 0.34 mM, KH_2PO_4 0.44 mM, $NaHCO_3$ 4.17 mM, $MgCl_2$ 2.2 mM, EGTA 0.1 mM, D-glucosa 5.56 mM (pH 7.4) de Life Technologies.

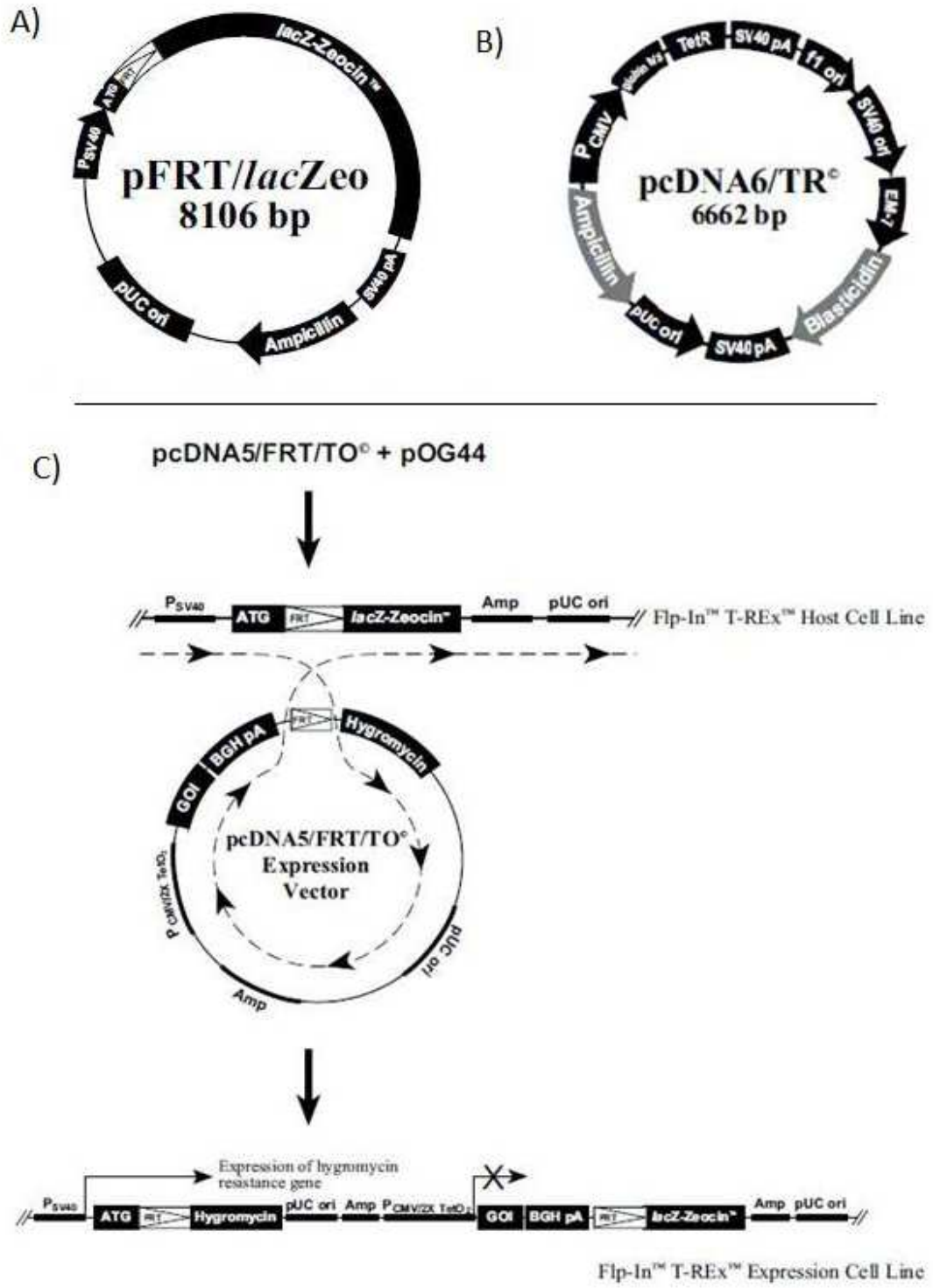

Figura 57: Obtención de las líneas Flp-In T-REx. (A) Plásmido pFRT/lacZeo que contiene un sitio FRT para unión de la recombinasa y un gen de resistencia a zeocina. **(B)** Plásmido pcDNA6/TR© que expresa el represor Tet de forma constitutiva y tiene un gen de resistencia a blasticidina. **(C)** integración del plásmido pcDNA5/FRT/TO© que contiene el gen de interés. La integración de este plásmido confiere a las células resistencia a blasticidina y sensibilidad a zeocina. La expresión del gen de interés está reprimida por el represor Tet.

Las células Flp-In T-REx HEK293 fueron transfectadas con una mezcla que contenía el cDNA de STIM1 en el vector pcDNA5/FRT/TO y el cDNA de la enzima

recombinasa en el vector pOG44 en una proporción (1:9) y usando para ello polietilenimina. Tras 48 horas, el medio se cambió por un medio suplementado con higromicina B (100 μg/ml) y blasticidina (15 μg/ml) para seleccionar las células transfectadas de forma estable. La expresión de FLAG-STIM1 o STIM1-GFP se determinó mediante western blot o mediante microscopia de fluorescencia respectivamente. Mediante esta técnica se generaron líneas celulares que expresan STIM1 (wild type), STIM1 mutado Ser→Ala, o STIM1 mutado Ser→Glu. Los residuos de STIM1 mutados fueron las serina 575, serina 608 y serina 621. Las mutaciones se confirmaron con la posterior secuenciación del DNA genómico de estas líneas celulares.

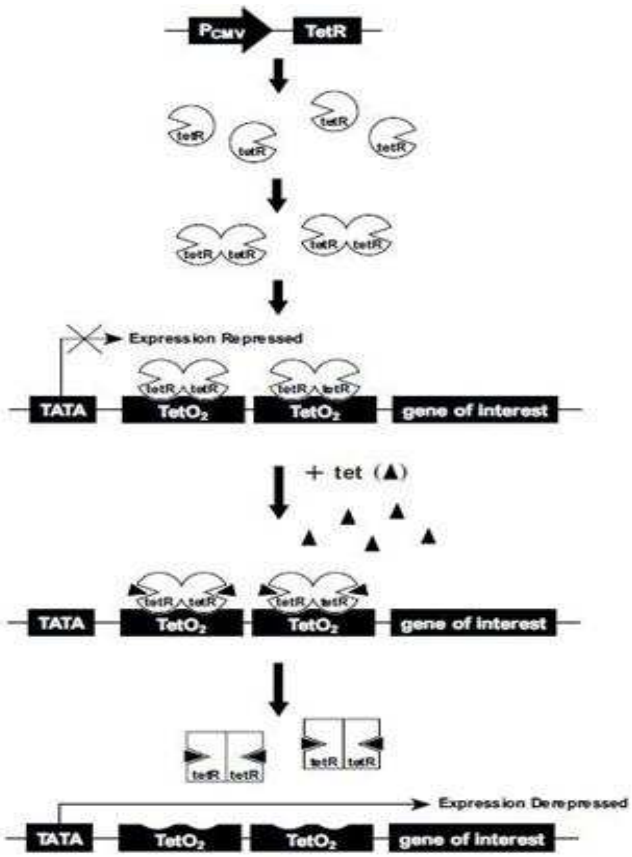

Figura 58: Expresión del gen de interés por adición de doxiciclina. La proteína represora Tet (TetR) es expresada por el plásmido pcDNA6/TR© en las células Flp-In T-REx. Homodímeros de TetR se unen a la secuencia Tet operador 2 (TetO2) del vector pcDNA5/FRT/TO© reprimiendo la transcripción del gen de interés. Tras la adición de doxiciclina, ésta se une a los homodímeros de TetR provocando un cambio conformacional en el TetR que la libera de la secuencia operadora y permite la expresión del gen de interés.

1.4 Transfección transitoria de las líneas celulares.

Para la transfección transitoria de los plásmidos utilizados en este trabajo las líneas celulares se siembran entre 6-8 horas antes de la transfección del plásmido de interés. En la **Tabla I (Anexo I)** se muestra la relación de plásmidos utilizados en este estudio. El vehículo de transfección utilizado en este trabajo fue polietilenimina (PEI), polímero catiónico que mantiene su estructura estable a pH fisiológico, lo que le confiere gran

afinidad por el DNA y alta eficacia en el proceso de transfección. La solución de transfección utilizada para cada placa de 10 cm de diámetro contiene 1-2 µg de DNA y 10-20 µg/ml de PEI en 1 ml de DMEM. La solución preparada se mezcla con vórtex durante 10-15 segundos y se deja 20 minutos a temperatura ambiente para facilitar la unión del DNA al polímero. Transcurrido este tiempo se añade la solución de transfección, gota a gota, a la placa de cultivo. Para permitir la expresión del plásmido, las células se mantienen en atmósfera de aire humidificado con 5% CO_2 a 37°C durante 24-36 horas antes de la realización de los experimentos.

2. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES Y WESTERN BLOT.

2.1 Preparación de extractos celulares.

Los extractos proteicos se obtienen a partir de cultivos celulares (HEK293 o Ishikawa) sembrados en placas de 10 cm de diámetro. Las células tratadas con el estímulo adecuado se lavan con PBS[1], se les añade 1 ml de tampón de lisis para extractos proteicos totales[6] y se sonican para completar la lisis celular. A continuación se clarifica el lisado centrifugando a 20.000 rcf durante 15 minutos a 4ºC y se recoge el sobrenadante. Todo el proceso de obtención de extractos se realiza en frío.

2.2 Medida de concentración de proteína.

La concentración de proteína de los extractos se determina mediante el método colorimétrico de Bradford[7], utilizando la albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. La concentración de proteína se determina midiendo la absorbancia de las muestras a 595 nm e interpolando los valores obtenidos en una recta patrón construida con cantidades conocidas de BSA (1-6 µg).

2.3 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes y transferencia a membranas de nitrocelulosa.

[6] **Tampón de lisis para extractos proteicos totales:** Tris-HCl 50 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, fluoruro sódico 50 mM, pirofosfato sódico 5 mM, ortovanadato sódico 1 mM, 1% Nonidet P-40, sacarosa 270 mM, DTT 1 mM, benzamidina 1 mM y PMSF 0.1 mM.
[7] **Bradford:** Coomassie (Bradford) protein assay de Thermo Scientific.

Para la realización de las electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida se ha utilizado el sistema de tampón discontinuo descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Entre 20-40 µg de extractos proteicos totales se mezclan con un volumen adecuado de tampón de carga[8] y se incuban a 90ºC durante 5 minutos para su completa desnaturalización. A continuación se someten las proteínas a electroforesis en geles de poliacrilamida y en condiciones desnaturalizantes en presencia del detergente iónico SDS[9], de manera que las proteínas se separan en el gel en función de su peso molecular. Dependiendo del peso molecular de la proteína en estudio se emplean geles de poliacrilamida de entre el 6-12%.

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas presentes en el gel se transfieren a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories) por aplicación de un campo eléctrico en una cubeta que contiene una solución de transferencia[10]. La transferencia se realiza a 40 V durante 3-4 horas y a 4ºC.

2.4 Inmunodetección.

Tras la transferencia, las proteínas son teñidas con el colorante reversible Ponceau S[11], lo que permite comprobar la eficiencia de la transferencia, así como la homogeneidad de la carga en las diferentes muestras. Para la inmunodetección de proteínas las membranas de nitrocelulosa se bloquean durante 1 hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo para western blot[12] y se incuban con el correspondiente anticuerpo primario empleando la concentración y condiciones indicadas en la **Tabla II (Anexo I).** Tras lavar las membranas con TBS-T[13], se incuban con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP), a una dilución 1:20.000 y en solución de bloqueo[12]. Tras 60 minutos de incubación con el anticuerpo secundario a temperatura ambiente, se lava el anticuerpo no unido de forma específica a la membrana con TBS-T[13]. Tras un lavado final de 5 minutos en TBS[14] se incuban las membranas con el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Dura (Thermo Scientific) durante 3 minutos a temperatura ambiente. Dichas membranas se exponen a

[8] **Tampón de carga:** LDS (4x) de Nu-PAGE suplementado con DTT 40 mM.
[9] **Tampón de electroforesis:** Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0.1% (p/v).
[10] **Tampón de transferencia**: Tris 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20% (v/v).
[11] **Ponceau S:** ponceau S 0.5% (p/v), ácido acético 5% (v/v).
[12] **Solución de bloqueo:** leche desnatada en polvo al 10% (p/v) disuelta en TBS-Tween 20 al 0.2%.
[13] **TBS-T:** Tris-HCl 50 mM pH7.5, NaCl 75 mM, Tween-20 0.2% (v/v).
[14] **TBS:** Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 75 mM.

películas fotográficas. A continuación se revelan las películas y las bandas correspondientes a las proteínas inmunorreactivas se observan allí donde ha habido emisión de luminiscencia.

Algunas membranas de nitrocelulosa se utilizan para la detección de una segunda proteína y para ello se lavan las membranas con TBS[14] tras la detección de la primera proteína y se incuban con tampón de lavado[15] durante 15 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se retira el tampón de lavado y se lavan nuevamente las membranas en TBS-T[13] durante 1-2 horas. A continuación se bloquean las membranas durante 60 minutos y se incuban con el siguiente anticuerpo correspondiente.

Tras escanear las películas, las bandas detectadas por quimioluminiscencia se cuantifican utilizando el software ImageJ.

3. PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS.

3.1 Precipitación de proteínas que presentan el tag GFP.

Las proteínas sobrexpresadas y unidas a GFP se purifican a partir de extractos celulares totales. Las líneas celulares se siembran en placas de 10 cm de diámetro, y tras el tratamiento correspondiente se lisan siguiendo el protocolo que se detalla en el apartado 2.1 y 2.2.

Entre 3-6 mg de extractos celulares totales, a una concentración de 2 mg/ml, son empleados en cada ensayo y se les añade 5-10 µl de resina GFP-Trap® equilibrada previamente con TBS[14]. Las muestras se incuban durante 1 hora a 4ºC con rotación para facilitar la unión de la resina de GFP-Trap a la proteína STIM1-GFP. Transcurrido este tiempo la resina de agarosa se lava con tampón de lisis[6] que contiene NaCl 0.5 M cuando STIM1-GFP es el objeto de estudio y NaCl 0.15 M para ensayos de co-precipitación de otras proteínas con STIM1-GFP. A continuación, para eliminar el exceso de NaCl y detergente contenido en el tampón de lavado se lava la resina con buffer A[16]. Tras centrifugar las resinas de agarosa a 1.400 rcf eliminamos el sobrenadante, añadimos a las resinas de agarosa 15 µl de tampón de elución[17] y posteriormente calentamos la muestra

[15] **Tampón de lavado:** Restore™ Western Blot Stripping Buffer de Thermo Scientific.
[16] **Buffer A**: Tris-HCl 50 mM, EGTA 0.1 mM, pH 7.5.
[17] **Tampón de elución**: NuPAGE-LDS sample buffer 2x, β-mercaptoetanol 12.5% (v/v).

a 70ºC durante 10 minutos para conseguir la completa desnaturalización de las proteínas precipitadas.

Tras centrifugar a 1.400 rcf durante 5 minutos pasamos el eluído por columnas SpinX® para descartar las resinas de agarosa. Finalmente las muestras están listas para detección por inmunoblot (véase apartado 2.3 y 2.4).

3.2 Co-inmunoprecipitación de EB1-STIM1.

EB1 endógeno se purifica mediante inmunoprecipitación y utilizando un anticuerpo específico frente a EB1 unido de modo covalente a resinas de proteína G-sefarosa. Para ello se lisan las células siguiendo el protocolo que se detalla en el apartado 2.1 y 2.2. Para purificar EB1 endógeno se incuba 1 mg del lisado celular con 5 µl de anticuerpo anti-EB1 unido de modo covalente a proteína G-sefarosa. Tras 16 horas de incubación con agitación y a 4ºC, se lava la resina de agarosa dos veces con tampón de lisis[6], que contiene NaCl 0.15 M y un lavado más con buffer A[16]. A continuación precipitamos el complejo mediante centrifugación a 1.400 rcf y eluímos las proteínas inmunoprecipitadas añadiendo 15 µl de tampón de elución[17] y calentando la muestra a 70ºC durante 10 minutos. Finalmente las muestras están listas para detección por inmunoblot (véase apartado 2.3 y 2.4)

3.2.1 Unión covalente del anticuerpo a la resina de proteína G-sefarosa.

La proteína G-sefarosa, previamente equilibrada en PBS, se incuba con el anticuerpo anti-EB1 (en un ratio 1 µg: 1 µl) en PBS, a 4ºC y con agitación durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo obtenemos el complejo proteína G-sefarosa: anticuerpo anti-EB1 unido de forma no covalente.

Para conseguir la unión covalente de la proteína G-sefarosa y el anticuerpo anti-EB1, se incuba este complejo en borato sódico 0.1 M pH 9.3 y 20 mM DMP (dihidrocloruro de dimetil pimelimidato) durante 1 hora, a 4ºC y con agitación, para ayudar a estabilizar la unión entre ambas proteínas. Posteriormente se lava la resina con glicina 50 mM (pH 2.5) para eliminar el anticuerpo que no se ha unido de modo covalente a la proteína G-sefarosa. Por último, se neutraliza el complejo incubando con Tris-HCl 0.2 M (pH 8.0) durante 2 horas a temperatura ambiente y con agitación. Las resinas se lavan 3 veces con PBS antes de su uso.

4. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO LIBRE INTRACELULAR

Para determinar la concentración de Ca^{2+} libre intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) se ha seguido el método descrito en (Martin-Romero et al., 2008) empleando fura-2 como sonda fluorescente sensible a Ca^{2+}. Fura-2 presenta un espectro de excitación con dos máximos situados a 340 y 380 nm (**Figura 59**). El primero de ellos permite monitorizar la concentración del complejo fura 2-Ca^{2+}, mientras que el segundo corresponde al fura 2 libre. A 360 nm presenta un punto isosbéstico que se utiliza para determinar la fluorescencia independiente de Ca^{2+} o para determinar la extinción de fluorescencia.

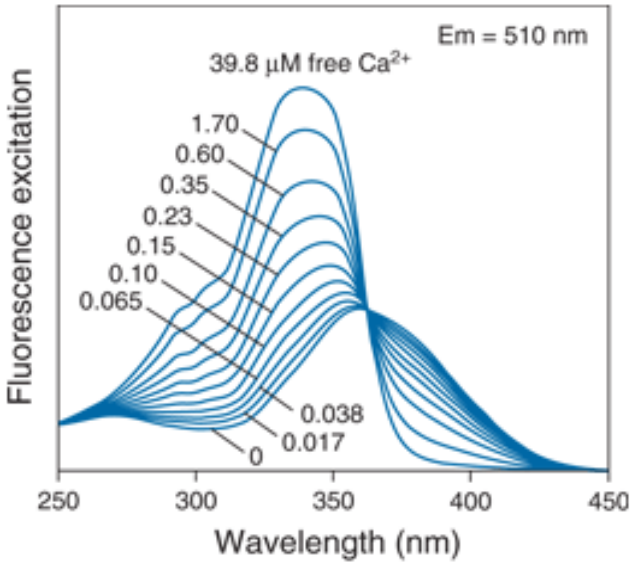

Figura 59: Espectro de excitación del fura 2-AM. La gráfica representa el espectro de excitación de la sonda fluorescente fura 2-AM en presencia de concentraciones de Ca^{2+} saturantes (38.9 µM), y concentraciones que se encuentran dentro del intervalo de detección con fura 2: 0.017-1.70 µM, para una longitud de onda de emisión de 510 nm.

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

Debido a que el fura 2 es un anión policarboxilato, no atraviesa la bicapa lipídica, por lo que la forma más conveniente de cargar este indicador en la célula es mediante dispersión del acetoximetiléster (AM) del indicador. Los grupos carboxílicos del indicador son esenciales para que éste sea sensible a Ca^{2+}, por lo tanto los grupos esterificados a los mismos deben ser eliminados una vez que el indicador ha penetrado en la célula. Esta acción es llevada a cabo por las esterasas intracelulares, capaces de liberar

la forma policarboxilato sensible a Ca^{2+}. Un problema importante de los acetoxi-metilésteres de los indicadores es su baja solubilidad en soluciones acuosas. Por ello, para que la carga del fura-2AM sea efectiva se necesita realizarla junto con pluronic F-127, un surfactante no iónico que facilita la dispersión de los mismos.

4.1 Carga con fura 2-AM en cultivos celulares.

Para realizar la medida de la $[Ca^{2+}]_i$ con fura-2AM se procede en primer lugar a la carga del mismo en la célula. Para ello se incuban las células con fura-2AM 1 µM y pluronic 0.0125 % en medio de cultivo durante 1 hora a 37ºC. Transcurrido este tiempo se lavan las células con HBSS[5] y se lleva a cabo la medida de los valores de fluorescencia.

4.2 Medida de los valores de fluorescencia.

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

4.3 Calibración de la medida.

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

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

Donde R es el cociente de la fluorescencia (F_{340} / F_{380}). $R_{máx}$ y $R_{mín}$ son los valores de R bajo condiciones saturantes y libres de Ca^{2+}, respectivamente, y β es el cociente de

los valores de fluorescencia a 380 nm registrados en condiciones de Ca^{2+} libre y saturantes.

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

Para inducir la apertura de los canales de Ca^{2+} regulados por depósitos intracelulares (canales SOC), se emplea tapsigargina (Tg), un inhibidor específico de la Ca^{2+}-ATPasa del retículo sarco(endo)plasmático (SERCA) (Lytton et al., 1991; Thastrup et al., 1990). La depleción de los depósitos intracelulares se determina incubando las células durante 6-8 minutos con Tg 1 µM en tampón HBSS libre de Ca^{2+} [5]. La activación de canales SOC se confirma por el incremento el ratio F_{340} /F_{380} tras la adición de $CaCl_2$ 2 mM al medio extracelular en presencia de Tg.

5. ANÁLISIS DE LA MULTIMERIZACIÓN DE STIM1.

Para estudiar la multimerización de STIM1, tras el vaciado de depósitos intracelulares, se expresó STIM1-GFP en la línea celular HEK293 Flp-In T-Rex y se analizó la localización celular de STIM1-GFP por epifluorescencia. Las células que expresan STIM1-GFP se someten a distintos tratamientos durante 3 minutos en HBSS libre de Ca^{2+} [5] y se fijan en paraformaldehído 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez fijadas, las células se lavan con PBS[1], agua y finalmente se montan en portaobjetos con medio Hydromount® (National Diagnostics).

Para observar la multimerización de STIM1-GFP por epifluorescencia se utiliza un microscopio invertido Nikon TE2000-U equipado con filtros de excitación de 465-495 nm, dicroico de 505 nm y de emisión de 515-555 nm (Semrock). Las imágenes se obtienen con una cámara CCD Hamamatsu C9100-02 acoplada al microscopio de fluorescencia invertido y analizadas con el software Metafluor®.

6. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR.

En este trabajo hemos empleado citometría de flujo para cuantificar la distribución de las células a lo largo del ciclo celular, así como la proporción de células apoptóticas. Una vez realizados los tratamientos correspondientes, se separan las células de las placas de cultivo por adición de tripsina[2], se lavan en PBS[1] y se fijan a 4ºC en una solución de etanol al 70% (v/v). Antes de su análisis las células se incuban con 10 µg/ml de RNasa a 37ºC durante 30 minutos y se tiñe el DNA con 50 µg/ml de yoduro de propidio a

temperatura ambiente durante 15 minutos y en oscuridad. El contenido total de DNA por célula se determina empleando un citómetro de flujo Cytomics FC500 de Beckman Coulter. Para el análisis de distribución en el ciclo celular, se considera la señal procedente de células individuales (se contaron 10.000 células por muestra).

7. INMUNOLOCALIZACIÓN.

7.1 Inmunolocalización.

Para analizar la expresión y localización de ciertas proteínas, las células se siembran en cubreobjetos de vidrio de 18 mm de diámetro, se tratan y se fijan en parafolmaldehido al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras dos lavados de 10 minutos con PBS[1], las membranas célulares se permeabilizan con PBS + 0.2% de Triton X-100 durante 10 minutos para permitir el paso de los anticuerpos al interior celular. Para el bloqueo de los epítopos inespecíficos las células se incuban durante 30 minutos con la solución de bloqueo para inmunolocalización[18] a temperatura ambiente y en agitación. A continuación se añade el anticuerpo específico diluido en solución de bloqueo[18] (las concentraciones utilizadas se muestran en la **Tabla II**) y se incuba durante toda la noche a 4ºC en una cámara húmeda. Después de lavar el anticuerpo primario con solución de lavado para inmunolocalización[19], se añade el anticuerpo secundario anti-mouse IgG marcado con Alexa Fluor-488 diluido 1:500 en solución de bloqueo[18]. Finalmente se lavan las células con PBS[1], agua, y finalmente se montan los cubres con medio Hydromount® (National Diagnostics).

Para observar el fluoróforo Alexa Fluor-488 del anticuerpo secundario por epifluorescencia se utiliza un microscopio invertido Nikon TE2000-U equipado con filtros de excitación de 465-495 nm, dicroico de 505 nm y de emisión de 515-555 nm (Semrock). Las imágenes se obtienen con una cámara CCD Hamamatsu C9100-02 acoplada al microscopio de fluorescencia invertido y son analizadas con el software Metafluor®.

---

[18] **Solución de bloqueo para inmunolocalización**: 3% (v/v) gelatina de piel de pez (de Sigma) en solución de lavado para inmunolocalización.
[19] **Solución de lavado para inmunolocalización**: PBS-Tween 0.2% (v/v), pH 7.4.

7.2 Tinción de la cromatina nuclear con Hoechst 33342.

La tinción de la cromatina nuclear se lleva a cabo empleando Hoechst 33342, un colorante fluorescente que se excita con luz ultravioleta (alrededor de 350 nm) y que emite en azul/cian con un máximo en 461 nm. Una vez realizados los tratamientos, los cultivos se lavan con PBS[1] y se fijan con paraformaldehido al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se incuban con Hoechst 33342 0.2 µg/ml durante 5 minutos en oscuridad. Para eliminar el exceso de Hoechst 33342 las células se lavan con PBS[1], agua y finalmente se montan con medio Hydromount® (National Diagnostics).

8. ENSAYO DE CIERRE DE HERIDA EN PLACA.

La línea celular Ishikawa se siembra en placa de 35 mm de diámetro, con una densidad celular de 100.000 células por placa. Transcurridas unas 6-8 horas se transfectan las células para la expresión de Flag-STIM1. Las células se dejan en atmósfera húmeda con 5% de CO_2 y 37ºC durante 16-18 horas para permitir la expresión del vector.

Cuando las células alcanzan una densidad del 80-90% (24 horas tras la siembra), se rasga la monocapa de células con ayuda de una punta de pipeta (≈ 500 µm de ancho). Tras un lavado con PBS[1] para arrastrar las células en suspensión desprendidas de la monocapa se añade EGF 10 ng/ml y se realiza una fotografía de la herida tomándola como tiempo 0. Las células se dejan en cultivo 24 horas para el cierre de la herida y se fotografía de nuevo (tiempo 24h). Las imágenes son obtenidas en microscopio de contraste de fase con una cámara Nikon Digital Sight DS-U2 acoplada al microscopio invertido Nikon TE2000-U y utilizando el software Nis-Elements-F. Para cuantificar el sellamiento de la herida se calcula el área del cierre de la herida con ayuda del software ImageJ. Cada experimento se realiza por triplicado en cada condición experimental y se analizan una media de cuatro fotografías por condición.

Una vez realizada las fotografías del sellamiento de la herida, las placas se lisan (300 µl de tampón de lisis[6] por placa) para poder comprobar mediante western blot (véase apartado 2) la expresión de la proteína STIM1 en todas las muestras.

BIBLIOGRAFIA

- Akhmanova, A., and Steinmetz, M.O. (2008). Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. Nature reviews Molecular cell biology *9*, 309-322.Andrews, P.D., Ovechkina, Y., Morrice, N., Wagenbach, M., Duncan, K., Wordeman, L., and Swedlow, J.R. (2004). Aurora B regulates MCAK at the mitotic centromere. Developmental cell *6*, 253-268.
- Antkiewicz-Michaluk, L. (1999). Voltage-operated calcium channels: characteristics and their role in the mechanism of action of psychotropic drugs. Polish journal of pharmacology *51*, 179-186.
- Asanov, A., Sherry, R., Sampieri, A., and Vaca, L. (2013). A relay mechanism between EB1 and APC facilitate STIM1 puncta assembly at endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions. Cell calcium *54*, 246-256.
- Asensi, M., Medina, I., Ortega, A., Carretero, J., Bano, M.C., Obrador, E., and Estrela, J.M. (2002). Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. Free radical biology & medicine *33*, 387-398.
- Athar, M., Back, J.H., Kopelovich, L., Bickers, D.R., and Kim, A.L. (2009). Multiple molecular targets of resveratrol: Anti-carcinogenic mechanisms. Archives of biochemistry and biophysics *486*, 95-102.
- Atten, M.J., Godoy-Romero, E., Attar, B.M., Milson, T., Zopel, M., and Holian, O. (2005). Resveratrol regulates cellular PKC alpha and delta to inhibit growth and induce apoptosis in gastric cancer cells. Investigational new drugs *23*, 111-119.
- Baba, Y., Hayashi, K., Fujii, Y., Mizushima, A., Watarai, H., Wakamori, M., Numaga, T., Mori, Y., Iino, M., Hikida, M*., et al.* (2006). Coupling of STIM1 to store-operated Ca2+ entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *103*, 16704-16709.
- Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C.J., McLauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J.S., Alessi, D.R., and Cohen, P. (2007). The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. The Biochemical journal *408*, 297-315.
- Baur, J.A., and Sinclair, D.A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. Nature reviews Drug discovery *5*, 493-506.
- Benitez, D.A., Pozo-Guisado, E., Alvarez-Barrientos, A., Fernandez-Salguero, P.M., and Castellon, E.A. (2007a). Mechanisms involved in resveratrol-induced apoptosis and cell cycle arrest in prostate cancer-derived cell lines. J Androl *28*, 282-293.
- Benitez, D.A., Pozo-Guisado, E., Clementi, M., Castellon, E., and Fernandez-Salguero, P.M. (2007b). Non-genomic action of resveratrol on androgen and oestrogen receptors in prostate cancer: modulation of the phosphoinositide 3-kinase pathway. British journal of cancer *96*, 1595-1604.
- Berridge, M.J. (1998). Neuronal calcium signaling. Neuron *21*, 13-26.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., and Roderick, H.L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. Nature reviews Molecular cell biology *4*, 517-529.
- Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. Nature reviews Molecular cell biology *1*, 11-21.
- Bhardwaj, R., Muller, H.M., Nickel, W., and Seedorf, M. (2013). Oligomerization and Ca2+/calmodulin control binding of the ER Ca2+-sensors STIM1 and STIM2 to plasma membrane lipids. Bioscience reports *33*.
- Blume-Jensen, P., and Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. Nature *411*, 355-365.
Bootman, M.D., Collins, T.J., Peppiatt, C.M., Prothero, L.S., MacKenzie, L., De Smet, P., Travers, M., Tovey, S.C., Seo, J.T., Berridge, M.J*., et al.* (2001). Calcium signalling--an overview. Semin Cell Dev Biol *12*, 3-10.
- Bos, J.L. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. Cancer research *49*, 4682-4689.
- Boulton, T.G., Gregory, J.S., Jong, S.M., Wang, L.H., Ellis, L., and Cobb, M.H. (1990). Evidence for insulin-dependent activation of S6 and microtubule-associated protein-2 kinases via a human insulin receptor/v-ros hybrid. The Journal of biological chemistry *265*, 2713-2719.

- Bowers, J.L., Tyulmenkov, V.V., Jernigan, S.C., and Klinge, C.M. (2000). Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta. Endocrinology *141*, 3657-3667.
- Brennan, D.F., Dar, A.C., Hertz, N.T., Chao, W.C., Burlingame, A.L., Shokat, K.M., and Barford, D. (2011). A Raf-induced allosteric transition of KSR stimulates phosphorylation of MEK. Nature *472*, 366-369.
- Burgess, A.W., Cho, H.S., Eigenbrot, C., Ferguson, K.M., Garrett, T.P., Leahy, D.J., Lemmon, M.A., Sliwkowski, M.X., Ward, C.W., and Yokoyama, S. (2003). An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. Molecular cell *12*, 541-552.
- Calloway, N., Holowka, D., and Baird, B. (2010). A basic sequence in STIM1 promotes Ca2+ influx by interacting with the C-terminal acidic coiled coil of Orai1. Biochemistry *49*, 1067-1071.
Cano, A., Perez-Moreno, M.A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M.J., del Barrio, M.G., Portillo, F., and Nieto, M.A. (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. Nature cell biology *2*, 76-83.
- Cantwell-Dorris, E.R., O'Leary, J.J., and Sheils, O.M. (2011). BRAFV600E: implications for carcinogenesis and molecular therapy. Mol Cancer Ther *10*, 385-394.
- Carvalho, P., Tirnauer, J.S., and Pellman, D. (2003). Surfing on microtubule ends. Trends in cell biology *13*, 229-237.
- Catterall, W.A. (1998). Structure and function of neuronal Ca2+ channels and their role in neurotransmitter release. Cell calcium *24*, 307-323.
- Cavero, I., and Spedding, M. (1983). "Calcium antagonists": a class of drugs with a bright future. Part I. Cellular calcium homeostasis and calcium as a coupling messenger. Life sciences *33*, 2571-2581.
- Clapper, D.L., Walseth, T.F., Dargie, P.J., and Lee, H.C. (1987). Pyridine nucleotide metabolites stimulate calcium release from sea urchin egg microsomes desensitized to inositol trisphosphate. The Journal of biological chemistry *262*, 9561-9568.
- Cohen, S. (1964). Isolation and Biological Effects of an Epidermal Growth-Stimulating Protein. National Cancer Institute monograph *13*, 13-37.
- Cohen, S., Carpenter, G., and Lembach, K.J. (1975). Interaction of epidermal growth factor (EGF) with cultured fibroblasts. Advances in metabolic disorders *8*, 265-284.
- Cole, C., Barber, J.D., and Barton, G.J. (2008). The Jpred 3 secondary structure prediction server. Nucleic acids research *36*, W197-201.
- Covington, E.D., Wu, M.M., and Lewis, R.S. (2010). Essential role for the CRAC activation domain in store-dependent oligomerization of STIM1. Molecular biology of the cell *21*, 1897-1907.
- Cucciolla, V., Borriello, A., Oliva, A., Galletti, P., Zappia, V., and Della Ragione, F. (2007). Resveratrol: from basic science to the clinic. Cell cycle *6*, 2495-2510.
- Chang, F., and McCubrey, J.A. (2001). P21(Cip1) induced by Raf is associated with increased Cdk4 activity in hematopoietic cells. Oncogene *20*, 4354-4364.
- Chen, C.K., and Pace-Asciak, C.R. (1996). Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta. General pharmacology *27*, 363-366.
- Chen, Y.F., Chiu, W.T., Chen, Y.T., Lin, P.Y., Huang, H.J., Chou, C.Y., Chang, H.C., Tang, M.J., and Shen, M.R. (2011). Calcium store sensor stromal-interaction molecule 1-dependent signaling plays an important role in cervical cancer growth, migration, and angiogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *108*, 15225-15230.
- Chen, Y.F., Chou, C.Y., Wilkins, R.J., Ellory, J.C., Mount, D.B., and Shen, M.R. (2009). Motor protein-dependent membrane trafficking of KCl cotransporter-4 is important for cancer cell invasion. Cancer research *69*, 8585-8593.
- Chen, Y.T., Chen, Y.F., Chiu, W.T., Liu, K.Y., Liu, Y.L., Chang, J.Y., Chang, H.C., and Shen, M.R. (2013). Microtubule-associated histone deacetylase 6 supports the calcium store sensor STIM1 in mediating malignant cell behaviors. Cancer research *73*, 4500-4509.
- Cheng, J.C., Chang, H.M., and Leung, P.C. (2012). Epidermal growth factor induces human oviductal epithelial cell invasion by down-regulating E-cadherin expression. The Journal of clinical endocrinology and metabolism *97*, E1380-1389.

- Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W.*, et al.* (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature *417*, 949-954.
- Davies, S.P., Reddy, H., Caivano, M., and Cohen, P. (2000). Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. The Biochemical journal *351*, 95-105.
- Delmas, D., Lancon, A., Colin, D., Jannin, B., and Latruffe, N. (2006). Resveratrol as a chemopreventive agent: a promising molecule for fighting cancer. Current drug targets *7*, 423-442.
- Demrow, H.S., Slane, P.R., and Folts, J.D. (1995). Administration of wine and grape juice inhibits in vivo platelet activity and thrombosis in stenosed canine coronary arteries. Circulation *91*, 1182-1188.
- Diaz, B., Barnard, D., Filson, A., MacDonald, S., King, A., and Marshall, M. (1997). Phosphorylation of Raf-1 serine 338-serine 339 is an essential regulatory event for Ras-dependent activation and biological signaling. Molecular and cellular biology *17*, 4509-4516.
- Dobrydneva, Y., Williams, R.L., and Blackmore, P.F. (1999). trans-Resveratrol inhibits calcium influx in thrombin-stimulated human platelets. British journal of pharmacology *128*, 149-157.
- Dobrydneva, Y., Williams, R.L., Katzenellenbogen, J.A., Ratz, P.H., and Blackmore, P.F. (2003). Diethylstilbestrol and tetrahydrochrysenes are calcium channel blockers in human platelets: relationship to the stilbene pharmacophore. Thromb Res *110*, 23-31.
- Dogan, S., Demirer, S., Kepenekci, I., Erkek, B., Kiziltay, A., Hasirci, N., Muftuoglu, S., Nazikoglu, A., Renda, N., Dincer, U.D.*, et al.* (2009). Epidermal growth factor-containing wound closure enhances wound healing in non-diabetic and diabetic rats. International wound journal *6*, 107-115.
- Ebashi, S., Endo, M., and Otsuki, I. (1969). Control of muscle contraction. Quarterly reviews of biophysics *2*, 351-384.
- El Boustany, C., Katsogiannou, M., Delcourt, P., Dewailly, E., Prevarskaya, N., Borowiec, A.S., and Capiod, T. (2010). Differential roles of STIM1, STIM2 and Orai1 in the control of cell proliferation and SOCE amplitude in HEK293 cells. Cell calcium *47*, 350-359.
- Elvers, M., Herrmann, A., Seizer, P., Munzer, P., Beck, S., Schonberger, T., Borst, O., Martin-Romero, F.J., Lang, F., May, A.E.*, et al.* (2012). Intracellular cyclophilin A is an important Ca2+ regulator in platelets and critically involved in arterial thrombus formation. Blood *120*, 1317-1326.
- Ercan, E., Momburg, F., Engel, U., Temmerman, K., Nickel, W., and Seedorf, M. (2009). A conserved, lipid-mediated sorting mechanism of yeast Ist2 and mammalian STIM proteins to the peripheral ER. Traffic *10*, 1802-1818.
- Faouzi, M., Hague, F., Potier, M., Ahidouch, A., Sevestre, H., and Ouadid-Ahidouch, H. (2011). Down-regulation of Orai3 arrests cell-cycle progression and induces apoptosis in breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells. Journal of cellular physiology *226*, 542-551.
- Fernandez-Montequin, J.I., Valenzuela-Silva, C.M., Diaz, O.G., Savigne, W., Sancho-Soutelo, N., Rivero-Fernandez, F., Sanchez-Penton, P., Morejon-Vega, L., Artaza-Sanz, H., Garcia-Herrera, A.*, et al.* (2009). Intra-lesional injections of recombinant human epidermal growth factor promote granulation and healing in advanced diabetic foot ulcers: multicenter, randomised, placebo-controlled, double-blind study. International wound journal *6*, 432-443.
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S.H., Tanasa, B., Hogan, P.G., Lewis, R.S., Daly, M., and Rao, A. (2006). A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. Nature *441*, 179-185.
- Frankel, E.N., Waterhouse, A.L., and Kinsella, J.E. (1993). Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. Lancet *341*, 1103-1104.
- Fuhrman, B., Lavy, A., and Aviram, M. (1995). Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. The American journal of clinical nutrition *61*, 549-554.

- Fukuda, M., Gotoh, I., Adachi, M., Gotoh, Y., and Nishida, E. (1997). A novel regulatory mechanism in the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade. Role of nuclear export signal of MAP kinase kinase. The Journal of biological chemistry *272*, 32642-32648.
- Galjart, N., and Perez, F. (2003). A plus-end raft to control microtubule dynamics and function. Current opinion in cell biology *15*, 48-53.
- Gill, D.L., Chueh, S.H., and Whitlow, C.L. (1984). Functional importance of the synaptic plasma membrane calcium pump and sodium-calcium exchanger. The Journal of biological chemistry *259*, 10807-10813.
- Giordano, F., Saheki, Y., Idevall-Hagren, O., Colombo, S.F., Pirruccello, M., Milosevic, I., Gracheva, E.O., Bagriantsev, S.N., Borgese, N., and De Camilli, P. (2013). PI(4,5)P(2)-dependent and Ca(2+)-regulated ER-PM interactions mediated by the extended synaptotagmins. Cell *153*, 1494-1509.
- Grigoriev, I., Gouveia, S.M., van der Vaart, B., Demmers, J., Smyth, J.T., Honnappa, S., Splinter, D., Steinmetz, M.O., Putney, J.W., Jr., Hoogenraad, C.C.*, et al.* (2008). STIM1 is a MT-plus-end-tracking protein involved in remodeling of the ER. Current biology : CB *18*, 177-182.
- Grille, S.J., Bellacosa, A., Upson, J., Klein-Szanto, A.J., van Roy, F., Lee-Kwon, W., Donowitz, M., Tsichlis, P.N., and Larue, L. (2003). The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines. Cancer research *63*, 2172-2178.
- Gumbiner, B.M. (2005). Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. Nature reviews Molecular cell biology *6*, 622-634.
- Hardwicke, J., Schmaljohann, D., Boyce, D., and Thomas, D. (2008). Epidermal growth factor therapy and wound healing--past, present and future perspectives. The surgeon : journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland *6*, 172-177.
- Harris, R.C., Chung, E., and Coffey, R.J. (2003). EGF receptor ligands. Experimental cell research *284*, 2-13.
- Hasselbach, W. (1964). Relaxation and the Sarcotubular Calcium Pump. Federation proceedings *23*, 909-912.
- Hayashi, I., and Ikura, M. (2003). Crystal structure of the amino-terminal microtubule-binding domain of end-binding protein 1 (EB1). The Journal of biological chemistry *278*, 36430-36434.
- Hollenberg, M.D., and Cuatrecasas, P. (1973). Epidermal growth factor: receptors in human fibroblasts and modulation of action by cholera toxin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *70*, 2964-2968.
- Honnappa, S., Gouveia, S.M., Weisbrich, A., Damberger, F.F., Bhavesh, N.S., Jawhari, H., Grigoriev, I., van Rijssel, F.J., Buey, R.M., Lawera, A.*, et al.* (2009). An EB1-binding motif acts as a microtubule tip localization signal. Cell *138*, 366-376.
- Hu, J., Stites, E.C., Yu, H., Germino, E.A., Meharena, H.S., Stork, P.J., Kornev, A.P., Taylor, S.S., and Shaw, A.S. (2013). Allosteric activation of functionally asymmetric RAF kinase dimers. Cell *154*, 1036-1046.
- Hutchinson, R.A., Adams, R.A., McArt, D.G., Salto-Tellez, M., Jasani, B., and Hamilton, P.W. (2015). Epidermal growth factor receptor immunohistochemistry: new opportunities in metastatic colorectal cancer. Journal of translational medicine *13*, 217.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., Slowing, K.V., Thomas, C.F., Beecher, C.W., Fong, H.H., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Mehta, R.G.*, et al.* (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. Science *275*, 218-220.
- Jayatilake, G.S., Jayasuriya, H., Lee, E.S., Koonchanok, N.M., Geahlen, R.L., Ashendel, C.L., McLaughlin, J.L., and Chang, C.J. (1993). Kinase inhibitors from Polygonum cuspidatum. Journal of natural products *56*, 1805-1810.
- Ji, Q., Liu, X., Han, Z., Zhou, L., Sui, H., Yan, L., Jiang, H., Ren, J., Cai, J., and Li, Q. (2015). Resveratrol suppresses epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer through TGF-beta1/Smads signaling pathway mediated Snail/E-cadherin expression. BMC cancer *15*, 97.

- Jiang, K., and Akhmanova, A. (2011). Microtubule tip-interacting proteins: a view from both ends. Current opinion in cell biology *23*, 94-101.
- Karlsson, J., Emgard, M., Brundin, P., and Burkitt, M.J. (2000). trans-resveratrol protects embryonic mesencephalic cells from tert-butyl hydroperoxide: electron paramagnetic resonance spin trapping evidence for a radical scavenging mechanism. Journal of neurochemistry *75*, 141-150.
- Karnoub, A.E., and Weinberg, R.A. (2008). Ras oncogenes: split personalities. Nature reviews Molecular cell biology *9*, 517-531.
- Kim, H., and Muller, W.J. (1999). The role of the epidermal growth factor receptor family in mammary tumorigenesis and metastasis. Experimental cell research *253*, 78-87.
- Komarova, Y., De Groot, C.O., Grigoriev, I., Gouveia, S.M., Munteanu, E.L., Schober, J.M., Honnappa, S., Buey, R.M., Hoogenraad, C.C., Dogterom, M.*, et al.* (2009). Mammalian end binding proteins control persistent microtubule growth. The Journal of cell biology *184*, 691-706.
- Korzeniowski, M.K., Manjarres, I.M., Varnai, P., and Balla, T. (2010). Activation of STIM1-Orai1 involves an intramolecular switching mechanism. Sci Signal *3*, ra82.
- Kumar, P., Lyle, K.S., Gierke, S., Matov, A., Danuser, G., and Wittmann, T. (2009). GSK3beta phosphorylation modulates CLASP-microtubule association and lamella microtubule attachment. The Journal of cell biology *184*, 895-908.
- Kumerz, M., Heiss, E.H., Schachner, D., Atanasov, A.G., and Dirsch, V.M. (2011). Resveratrol inhibits migration and Rac1 activation in EGF- but not PDGF-activated vascular smooth muscle cells. Molecular nutrition & food research *55*, 1230-1236.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature *227*, 680-685.
- Larue, L., and Bellacosa, A. (2005). Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. Oncogene *24*, 7443-7454.
- Lee, H.J., Bae, G.U., Leem, Y.E., Choi, H.K., Kang, T.M., Cho, H., Kim, S.T., and Kang, J.S. (2012). Phosphorylation of Stim1 at serine575 via netrin-2/Cdo-activated ERK1/2 is critical for the promyogenic function of Stim1. Molecular biology of the cell *23*, 1376-1387.
- Lee, J.M., Dedhar, S., Kalluri, R., and Thompson, E.W. (2006). The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. The Journal of cell biology *172*, 973-981.
- Lee, M.Y., Chou, C.Y., Tang, M.J., and Shen, M.R. (2008). Epithelial-mesenchymal transition in cervical cancer: correlation with tumor progression, epidermal growth factor receptor overexpression, and snail up-regulation. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *14*, 4743-4750.
- Leicht, D.T., Balan, V., Kaplun, A., Singh-Gupta, V., Kaplun, L., Dobson, M., and Tzivion, G. (2007). Raf kinases: function, regulation and role in human cancer. Biochimica et biophysica acta *1773*, 1196-1212.
- Lekakis, J., Rallidis, L.S., Andreadou, I., Vamvakou, G., Kazantzoglou, G., Magiatis, P., Skaltsounis, A.L., and Kremastinos, D.T. (2005). Polyphenolic compounds from red grapes acutely improve endothelial function in patients with coronary heart disease. European journal of cardiovascular prevention and rehabilitation : official journal of the European Society of Cardiology, Working Groups on Epidemiology & Prevention and Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology *12*, 596-600.
- Lewis, R.S. (2007). The molecular choreography of a store-operated calcium channel. Nature *446*, 284-287.
- Li, W., Ma, J., Ma, Q., Li, B., Han, L., Liu, J., Xu, Q., Duan, W., Yu, S., Wang, F.*, et al.* (2013). Resveratrol inhibits the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells via suppression of the PI-3K/Akt/NF-kappaB pathway. Current medicinal chemistry *20*, 4185-4194.
- Liou, J., Fivaz, M., Inoue, T., and Meyer, T. (2007). Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after

Ca2+ store depletion. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *104*, 9301-9306.
- Liou, J., Kim, M.L., Heo, W.D., Jones, J.T., Myers, J.W., Ferrell, J.E., Jr., and Meyer, T. (2005). STIM is a Ca(2+) sensor essential for Ca(2+)-store-depletion-triggered Ca(2+) influx. Current biology : CB *15*, 1235-1241.
- Liu, H., Hughes, J.D., Rollins, S., Chen, B., and Perkins, E. (2011). Calcium entry via ORAI1 regulates glioblastoma cell proliferation and apoptosis. Exp Mol Pathol *91*, 753-760.
- Lopez, E., Jardin, I., Berna-Erro, A., Bermejo, N., Salido, G.M., Sage, S.O., Rosado, J.A., and Redondo, P.C. (2012). STIM1 tyrosine-phosphorylation is required for STIM1-Orai1 association in human platelets. Cellular signalling *24*, 1315-1322.
- Lytton, J., Westlin, M., and Hanley, M.R. (1991). Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. The Journal of biological chemistry *266*, 17067-17071.
- Lloyd, A.C. (2006). Distinct functions for ERKs? Journal of biology *5*, 13.
- Machaca, K., and Haun, S. (2000). Store-operated calcium entry inactivates at the germinal vesicle breakdown stage of Xenopus meiosis. The Journal of biological chemistry *275*, 38710-38715.
- Maheshwari, G., Wells, A., Griffith, L.G., and Lauffenburger, D.A. (1999). Biophysical integration of effects of epidermal growth factor and fibronectin on fibroblast migration. Biophysical journal *76*, 2814-2823.
- Manji, S.S., Parker, N.J., Williams, R.T., van Stekelenburg, L., Pearson, R.B., Dziadek, M., and Smith, P.J. (2000). STIM1: a novel phosphoprotein located at the cell surface. Biochimica et biophysica acta *1481*, 147-155.
- Manning, G., Plowman, G.D., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002). Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. Trends in biochemical sciences *27*, 514-520.
- Marais, R., Light, Y., Paterson, H.F., and Marshall, C.J. (1995). Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. The EMBO journal *14*, 3136-3145.
- Marier, J.F., Vachon, P., Gritsas, A., Zhang, J., Moreau, J.P., and Ducharme, M.P. (2002). Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics *302*, 369-373.
- Martin-Romero, F.J., Ortiz-de-Galisteo, J.R., Lara-Laranjeira, J., Dominguez-Arroyo, J.A., Gonzalez-Carrera, E., and Alvarez, I.S. (2008). Store-operated calcium entry in human oocytes and sensitivity to oxidative stress. Biol Reprod *78*, 307-315.
- Mason, C.S., Springer, C.J., Cooper, R.G., Superti-Furga, G., Marshall, C.J., and Marais, R. (1999). Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. The EMBO journal *18*, 2137-2148.
- Massague, J., and Pandiella, A. (1993). Membrane-anchored growth factors. Annual review of biochemistry *62*, 515-541.
- Matallanas, D., Romano, D., Al-Mulla, F., O'Neill, E., Al-Ali, W., Crespo, P., Doyle, B., Nixon, C., Sansom, O., Drosten, M.*, et al.* (2011). Mutant K-Ras activation of the proapoptotic MST2 pathway is antagonized by wild-type K-Ras. Molecular cell *44*, 893-906.
- McKay, J., Wang, X., Ding, J., Buss, J.E., and Ambrosio, L. (2011). H-ras resides on clathrin-independent ARF6 vesicles that harbor little RAF-1, but not on clathrin-dependent endosomes. Biochimica et biophysica acta *1813*, 298-307.
- Meissner, G. (1994). Ryanodine receptor/Ca2+ release channels and their regulation by endogenous effectors. Annual review of physiology *56*, 485-508.
- Meng, X., Maliakal, P., Lu, H., Lee, M.J., and Yang, C.S. (2004). Urinary and plasma levels of resveratrol and quercetin in humans, mice, and rats after ingestion of pure compounds and grape juice. Journal of agricultural and food chemistry *52*, 935-942.
- Mercer, K.E., and Pritchard, C.A. (2003). Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. Biochimica et biophysica acta *1653*, 25-40.

- Minden, A., Lin, A., McMahon, M., Lange-Carter, C., Derijard, B., Davis, R.J., Johnson, G.L., and Karin, M. (1994). Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. Science *266*, 1719-1723.
- Motiani, R.K., Hyzinski-Garcia, M.C., Zhang, X., Henkel, M.M., Abdullaev, I.F., Kuo, Y.H., Matrougui, K., Mongin, A.A., and Trebak, M. (2013). STIM1 and Orai1 mediate CRAC channel activity and are essential for human glioblastoma invasion. Pflugers Archiv : European journal of physiology.
- Muik, M., Fahrner, M., Derler, I., Schindl, R., Bergsmann, J., Frischauf, I., Groschner, K., and Romanin, C. (2009). A Cytosolic Homomerization and a Modulatory Domain within STIM1 C Terminus Determine Coupling to ORAI1 Channels. The Journal of biological chemistry *284*, 8421-8426.
- Muik, M., Fahrner, M., Schindl, R., Stathopulos, P., Frischauf, I., Derler, I., Plenk, P., Lackner, B., Groschner, K., Ikura, M.*, et al.* (2011). STIM1 couples to ORAI1 via an intramolecular transition into an extended conformation. The EMBO journal *30*, 1678-1689.
- Muik, M., Frischauf, I., Derler, I., Fahrner, M., Bergsmann, J., Eder, P., Schindl, R., Hesch, C., Polzinger, B., Fritsch, R.*, et al.* (2008). Dynamic coupling of the putative coiled-coil domain of ORAI1 with STIM1 mediates ORAI1 channel activation. The Journal of biological chemistry *283*, 8014-8022.
- Mukherjee, S., Dudley, J.I., and Das, D.K. (2010). Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits. Dose-response : a publication of International Hormesis Society *8*, 478-500.
Nathke, I. (2004). APC at a glance. Journal of cell science *117*, 4873-4875.
Niault, T.S., and Baccarini, M. (2010). Targets of Raf in tumorigenesis. Carcinogenesis *31*, 1165-1174.
- Nolen, B., Taylor, S., and Ghosh, G. (2004). Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. Molecular cell *15*, 661-675.
- Nordstrom, T., Nevanlinna, H.A., and Andersson, L.C. (1992). Mitosis-arresting effect of the calcium channel inhibitor SK&F 96365 on human leukemia cells. Experimental cell research *202*, 487-494.
- Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Yamanaka, M., Kim, J.H., Saito, K., Sakamoto, A., Inoue, M., Shirouzu, M.*, et al.* (2002). Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. Cell *110*, 775-787.
- Olsen, J.V., Blagoev, B., Gnad, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., and Mann, M. (2006). Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. Cell *127*, 635-648.
- Orci, L., Ravazzola, M., Le Coadic, M., Shen, W.W., Demaurex, N., and Cosson, P. (2009). From the Cover: STIM1-induced precortical and cortical subdomains of the endoplasmic reticulum. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *106*, 19358-19362.
- Orsini, F., Pelizzoni, F., Verotta, L., Aburjai, T., and Rogers, C.B. (1997). Isolation, synthesis, and antiplatelet aggregation activity of resveratrol 3-O-beta-D-glucopyranoside and related compounds. Journal of natural products *60*, 1082-1087.
- Park, C.Y., Hoover, P.J., Mullins, F.M., Bachhawat, P., Covington, E.D., Raunser, S., Walz, T., Garcia, K.C., Dolmetsch, R.E., and Lewis, R.S. (2009). STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. Cell *136*, 876-890.
- Park, C.Y., Shcheglovitov, A., and Dolmetsch, R. (2010). The CRAC channel activator STIM1 binds and inhibits L-type voltage-gated calcium channels. Science *330*, 101-105.
- Penna, A., Demuro, A., Yeromin, A.V., Zhang, S.L., Safrina, O., Parker, I., and Cahalan, M.D. (2008). The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers. Nature *456*, 116-120.
- Peplow, P.V., and Chatterjee, M.P. (2013). A review of the influence of growth factors and cytokines in in vitro human keratinocyte migration. Cytokine *62*, 1-21.

- Pozo-Guisado, E. (2004). Actividad antiproliferativa de resveratrol frente al desarrollo de cáncer de glándula mamaria. In Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética (Badajoz: Universidad de Extremadura).
- Pozo-Guisado, E., Alvarez-Barrientos, A., Mulero-Navarro, S., Santiago-Josefat, B., and Fernandez-Salguero, P.M. (2002). The antiproliferative activity of resveratrol results in apoptosis in MCF-7 but not in MDA-MB-231 human breast cancer cells: cell-specific alteration of the cell cycle. Biochemical pharmacology *64*, 1375-1386.
- Pozo-Guisado, E., Campbell, D.G., Deak, M., Alvarez-Barrientos, A., Morrice, N.A., Alvarez, I.S., Alessi, D.R., and Martin-Romero, F.J. (2010). Phosphorylation of STIM1 at ERK1/2 target sites modulates store-operated calcium entry. Journal of cell science *123*, 3084-3093.
- Pozo-Guisado, E., Casas-Rua, V., Tomas-Martin, P., Lopez-Guerrero, A.M., Alvarez-Barrientos, A., and Martin-Romero, F.J. (2013). Phosphorylation of STIM1 at ERK1/2 target sites regulates interaction with the microtubule plus-end binding protein EB1. Journal of cell science *126*, 3170-3180.
- Pozo-Guisado, E., Lorenzo-Benayas, M.J., and Fernandez-Salguero, P.M. (2004). Resveratrol modulates the phosphoinositide 3-kinase pathway through an estrogen receptor alpha-dependent mechanism: relevance in cell proliferation. International journal of cancer *109*, 167-173.
- Prakriya, M., Feske, S., Gwack, Y., Srikanth, S., Rao, A., and Hogan, P.G. (2006). Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. Nature *443*, 230-233.
- Preston, S.F., Sha'afi, R.I., and 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*, 915-925.
- Putney, J.W., Jr. (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. Cell calcium *7*, 1-12.
- Putney, J.W., Jr. (2001). Pharmacology of capacitative calcium entry. Mol Interv *1*, 84-94.
- Radisky, D.C., and Bissell, M.J. (2006). Matrix metalloproteinase-induced genomic instability. Current opinion in genetics & development *16*, 45-50.
- Richter, P., Umbreit, C., Franz, M., Berndt, A., Grimm, S., Uecker, A., Bohmer, F.D., Kosmehl, H., and Berndt, A. (2011). EGF/TGFbeta1 co-stimulation of oral squamous cell carcinoma cells causes an epithelial-mesenchymal transition cell phenotype expressing laminin 332. Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology *40*, 46-54.
- Rinehart, J., Adjei, A.A., Lorusso, P.M., Waterhouse, D., Hecht, J.R., Natale, R.B., Hamid, O., Varterasian, M., Asbury, P., Kaldjian, E.P.*, et al.* (2004). Multicenter phase II study of the oral MEK inhibitor, CI-1040, in patients with advanced non-small-cell lung, breast, colon, and pancreatic cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology *22*, 4456-4462.
- Roberts, P.J., and Der, C.J. (2007). Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. Oncogene *26*, 3291-3310.
- Roos, J., DiGregorio, P.J., Yeromin, A.V., Ohlsen, K., Lioudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J.A., Wagner, S.L., Cahalan, M.D.*, et al.* (2005). STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca(2+) channel function. The Journal of cell biology *169*, 435-445.
- Rotondo, S., Rajtar, G., Manarini, S., Celardo, A., Rotillo, D., de Gaetano, G., Evangelista, V., and Cerletti, C. (1998). Effect of trans-resveratrol, a natural polyphenolic compound, on human polymorphonuclear leukocyte function. British journal of pharmacology *123*, 1691-1699.
- Rowinsky, E.K., Schwartz, G.H., Gollob, J.A., Thompson, J.A., Vogelzang, N.J., Figlin, R., Bukowski, R., Haas, N., Lockbaum, P., Li, Y.P.*, et al.* (2004). Safety, pharmacokinetics, and activity of ABX-EGF, a fully human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in patients with metastatic renal cell cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology *22*, 3003-3015.

- Rush, J.S., and Ceresa, B.P. (2013). RAB7 and TSG101 are required for the constitutive recycling of unliganded EGFRs via distinct mechanisms. Molecular and cellular endocrinology *381*, 188-197.
- Russa, A.D., Ishikita, N., Masu, K., Akutsu, H., Saino, T., and Satoh, Y. (2008). Microtubule remodeling mediates the inhibition of store-operated calcium entry (SOCE) during mitosis in COS-7 cells. Arch Histol Cytol *71*, 249-263.
- Sampieri, A., Zepeda, A., Asanov, A., and Vaca, L. (2009). Visualizing the store-operated channel complex assembly in real time: identification of SERCA2 as a new member. Cell calcium *45*, 439-446.
- Savage, C.R., Jr., Hash, J.H., and Cohen, S. (1973). Epidermal growth factor. Location of disulfide bonds. The Journal of biological chemistry *248*, 7669-7672.
- Savagner, P. (2001). Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology *23*, 912-923.
- Scherber, C., Aranyosi, A.J., Kulemann, B., Thayer, S.P., Toner, M., Iliopoulos, O., and Irimia, D. (2012). Epithelial cell guidance by self-generated EGF gradients. Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro *4*, 259-269.
- Schmitt, E., Lehmann, L., Metzler, M., and Stopper, H. (2002). Hormonal and genotoxic activity of resveratrol. Toxicology letters *136*, 133-142.
- Schneider, M.R., and Wolf, E. (2009). The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. Journal of cellular physiology *218*, 460-466.
- Schulze, W.X., Deng, L., and Mann, M. (2005). Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family. Molecular systems biology *1*, 2005 0008.
- Schuyler, S.C., and Pellman, D. (2001). Microtubule "plus-end-tracking proteins": The end is just the beginning. Cell *105*, 421-424.
- Sebolt-Leopold, J.S., and Herrera, R. (2004). Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. Nature reviews Cancer *4*, 937-947.
- Shen, M.R., Hsu, Y.M., Hsu, K.F., Chen, Y.F., Tang, M.J., and Chou, C.Y. (2006). Insulin-like growth factor 1 is a potent stimulator of cervical cancer cell invasiveness and proliferation that is modulated by alphavbeta3 integrin signaling. Carcinogenesis *27*, 962-971.
- Shen, W.W., Frieden, M., and Demaurex, N. (2011). Remodelling of the endoplasmic reticulum during store-operated calcium entry. Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization *103*, 365-380.
- Shirakata, Y., Kimura, R., Nanba, D., Iwamoto, R., Tokumaru, S., Morimoto, C., Yokota, K., Nakamura, M., Sayama, K., Mekada, E.*, et al.* (2005). Heparin-binding EGF-like growth factor accelerates keratinocyte migration and skin wound healing. Journal of cell science *118*, 2363-2370.
- Smyth, J.T., DeHaven, W.I., Bird, G.S., and Putney, J.W., Jr. (2007). Role of the microtubule cytoskeleton in the function of the store-operated Ca2+ channel activator STIM1. Journal of cell science *120*, 3762-3771.
- Smyth, J.T., Petranka, J.G., Boyles, R.R., DeHaven, W.I., Fukushima, M., Johnson, K.L., Williams, J.G., and Putney, J.W., Jr. (2009). Phosphorylation of STIM1 underlies suppression of store-operated calcium entry during mitosis. Nature cell biology *11*, 1465-1472.
Stathopulos, P.B., Li, G.Y., Plevin, M.J., Ames, J.B., and Ikura, M. (2006). Stored Ca2+ depletion-induced oligomerization of stromal interaction molecule 1 (STIM1) via the EF-SAM region: An initiation mechanism for capacitive Ca2+ entry. The Journal of biological chemistry *281*, 35855-35862.
- Stathopulos, P.B., Zheng, L., Li, G.Y., Plevin, M.J., and Ikura, M. (2008). Structural and mechanistic insights into STIM1-mediated initiation of store-operated calcium entry. Cell *135*, 110-122.

- Stewart, J.R., and O'Brian, C.A. (2004). Resveratrol antagonizes EGFR-dependent Erk1/2 activation in human androgen-independent prostate cancer cells with associated isozyme-selective PKC alpha inhibition. Investigational new drugs *22*, 107-117.
- Su, L.K., Burrell, M., Hill, D.E., Gyuris, J., Brent, R., Wiltshire, R., Trent, J., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1995). APC binds to the novel protein EB1. Cancer research *55*, 2972-2977.
Su, L.K., and Qi, Y. (2001). Characterization of human MAPRE genes and their proteins. Genomics *71*, 142-149.
- Subbaramaiah, K., and Dannenberg, A.J. (2003). Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment. Trends in pharmacological sciences *24*, 96-102.
- Tamura, N., and Draviam, V.M. (2012). Microtubule plus-ends within a mitotic cell are 'moving platforms' with anchoring, signalling and force-coupling roles. Open Biol *2*, 120132.
- Taylor, J.R., Halprin, K.M., Levine, V., and Woodyard, C. (1983). Effects of methotrexate in vitro on epidermal cell proliferation. The British journal of dermatology *108*, 45-61.
- Thastrup, O., Cullen, P.J., Drobak, B.K., Hanley, M.R., and Dawson, A.P. (1990). Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca(2+) stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *87*, 2466-2470.
- Therrien, M., Chang, H.C., Solomon, N.M., Karim, F.D., Wassarman, D.A., and Rubin, G.M. (1995). KSR, a novel protein kinase required for RAS signal transduction. Cell *83*, 879-888.
- Thiery, J.P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. Nature reviews Cancer *2*, 442-454.
- Thomas, A.P., and Delaville, F. (1991). The use of fluorescent indicators for measurements of cytosolic-free calcium concentration in cell population and single cells. In Cellular calcium, J.G. McCormack, and P.H. Cobbold, eds. (Oxford, UK: IRL Press), pp. 1-54.
- Tomas-Martin, P., Lopez-Guerrero, A.M., Casas-Rua, V., Pozo-Guisado, E., and Martin-Romero, F.J. (2015). Phospho-STIM1 is a downstream effector that mediates the signaling triggered by IGF-1 in HEK293 cells. Cellular signalling *27*, 545-554.
- Tomas, A., Futter, C.E., and Eden, E.R. (2014). EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer. Trends in cell biology *24*, 26-34.
- Tran, N.H., and Frost, J.A. (2003). Phosphorylation of Raf-1 by p21-activated kinase 1 and Src regulates Raf-1 autoinhibition. The Journal of biological chemistry *278*, 11221-11226.
- Tsai, F.C., Seki, A., Yang, H.W., Hayer, A., Carrasco, S., Malmersjo, S., and Meyer, T. (2014). A polarized Ca2+, diacylglycerol and STIM1 signalling system regulates directed cell migration. Nature cell biology *16*, 133-144.
- Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J.S., Dull, T.J., Gray, A., Tam, A.W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T.A., Schlessinger, J.*, et al.* (1984). Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. Nature *309*, 418-425.
- Vaca, L. (2010). SOCIC: the store-operated calcium influx complex. Cell calcium *47*, 199-209.
Vig, M., Peinelt, C., Beck, A., Koomoa, D.L., Rabah, D., Koblan-Huberson, M., Kraft, S., Turner, H., Fleig, A., Penner, R.*, et al.* (2006). CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca(2+) entry. Science *312*, 1220-1223.
- Vigil, D., Cherfils, J., Rossman, K.L., and Der, C.J. (2010). Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? Nature reviews Cancer *10*, 842-857.
- Vojtek, A.B., Hollenberg, S.M., and Cooper, J.A. (1993). Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. Cell *74*, 205-214.
- Wan, P.T., Garnett, M.J., Roe, S.M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V.M., Jones, C.M., Marshall, C.J., Springer, C.J., Barford, D.*, et al.* (2004). Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. Cell *116*, 855-867.
- Wang, M., Jin, Y., and Ho, C.T. (1999). Evaluation of resveratrol derivatives as potential antioxidants and identification of a reaction product of resveratrol and 2, 2-diphenyl-1-picryhydrazyl radical. Journal of agricultural and food chemistry *47*, 3974-3977.

- Wang, S.J., Saadi, W., Lin, F., Minh-Canh Nguyen, C., and Li Jeon, N. (2004). Differential effects of EGF gradient profiles on MDA-MB-231 breast cancer cell chemotaxis. Experimental cell research *300*, 180-189.
- Wang, Y., Deng, X., Mancarella, S., Hendron, E., Eguchi, S., Soboloff, J., Tang, X.D., and Gill, D.L. (2010). The calcium store sensor, STIM1, reciprocally controls Orai and CaV1.2 channels. Science *330*, 105-109.
- Wang, Z., Zou, J., Cao, K., Hsieh, T.C., Huang, Y., and Wu, J.M. (2005). Dealcoholized red wine containing known amounts of resveratrol suppresses atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits without affecting plasma lipid levels. International journal of molecular medicine *16*, 533-540.
- Ware, M.F., Wells, A., and Lauffenburger, D.A. (1998). Epidermal growth factor alters fibroblast migration speed and directional persistence reciprocally and in a matrix-dependent manner. Journal of cell science *111 (Pt 16)*, 2423-2432.
- Warne, P.H., Viciana, P.R., and Downward, J. (1993). Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro. Nature *364*, 352-355.
- Watanabe, T., Noritake, J., Kakeno, M., Matsui, T., Harada, T., Wang, S., Itoh, N., Sato, K., Matsuzawa, K., Iwamatsu, A*., et al.* (2009). Phosphorylation of CLASP2 by GSK-3beta regulates its interaction with IQGAP1, EB1 and microtubules. Journal of cell science *122*, 2969-2979.
- Wells, A., Souto, J.C., Solava, J., Kassis, J., Bailey, K.J., and Turner, T. (2002). Luteinizing hormone-releasing hormone agonist limits DU-145 prostate cancer growth by attenuating epidermal growth factor receptor signaling. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *8*, 1251-1257.
- Wenczak, B.A., Lynch, J.B., and Nanney, L.B. (1992). Epidermal growth factor receptor distribution in burn wounds. Implications for growth factor-mediated repair. The Journal of clinical investigation *90*, 2392-2401.
- Williams, R.T., Senior, P.V., Van Stekelenburg, L., Layton, J.E., Smith, P.J., and Dziadek, M.A. (2002). Stromal interaction molecule 1 (STIM1), a transmembrane protein with growth suppressor activity, contains an extracellular SAM domain modified by N-linked glycosylation. Biochimica et biophysica acta *1596*, 131-137.
- Wortzel, I., and Seger, R. (2011). The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. Genes & cancer *2*, 195-209.
- Yang, N., Tang, Y., Wang, F., Zhang, H., Xu, D., Shen, Y., Sun, S., and Yang, G. (2013). Blockade of store-operated Ca(2+) entry inhibits hepatocarcinoma cell migration and invasion by regulating focal adhesion turnover. Cancer letters *330*, 163-169.
- Yang, S., Zhang, J.J., and Huang, X.Y. (2009). Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis. Cancer cell *15*, 124-134.
- Yang, W.N., Ai, Z.H., Wang, J., Xu, Y.L., and Teng, Y.C. (2014). Correlation between the overexpression of epidermal growth factor receptor and mesenchymal makers in endometrial carcinoma. J Gynecol Oncol *25*, 36-42.
- Yang, X., Jin, H., Cai, X., Li, S., and Shen, Y. (2012). Structural and mechanistic insights into the activation of Stromal interaction molecule 1 (STIM1). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *109*, 5657-5662.
- Yeromin, A.V., Zhang, S.L., Jiang, W., Yu, Y., Safrina, O., and Cahalan, M.D. (2006). Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. Nature *443*, 226-229.
- Yoon, S.Y., Lee, Y.J., Seo, J.H., Sung, H.J., Park, K.H., Choi, I.K., Kim, S.J., Oh, S.C., Choi, C.W., Kim, B.S*., et al.* (2006). uPAR expression under hypoxic conditions depends on iNOS modulated ERK phosphorylation in the MDA-MB-231 breast carcinoma cell line. Cell research *16*, 75-81.
Yoshida, J., Iwabuchi, K., Matsui, T., Ishibashi, T., Masuoka, T., and Nishio, M. (2012). Knockdown of stromal interaction molecule 1 (STIM1) suppresses store-operated calcium entry, cell proliferation and tumorigenicity in human epidermoid carcinoma A431 cells. Biochemical pharmacology *84*, 1592-1603.

- Yu, F., Sun, L., and Machaca, K. (2009). Orai1 internalization and STIM1 clustering inhibition modulate SOCE inactivation during meiosis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *106*, 17401-17406.
- Yuan, J.P., Zeng, W., Dorwart, M.R., Choi, Y.J., Worley, P.F., and Muallem, S. (2009). SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels. Nature cell biology *11*, 337-343.
- Zakharov, S.I., Smani, T., Dobrydneva, Y., Monje, F., Fichandler, C., Blackmore, P.F., and Bolotina, V.M. (2004). Diethylstilbestrol is a potent inhibitor of store-operated channels and capacitative Ca(2+) influx. Molecular pharmacology *66*, 702-707.
- Zehorai, E., Yao, Z., Plotnikov, A., and Seger, R. (2010). The subcellular localization of MEK and ERK--a novel nuclear translocation signal (NTS) paves a way to the nucleus. Molecular and cellular endocrinology *314*, 213-220.
- Zeisberg, M., Shah, A.A., and Kalluri, R. (2005). Bone morphogenic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney. The Journal of biological chemistry *280*, 8094-8100.
- Zern, T.L., West, K.L., and Fernandez, M.L. (2003). Grape polyphenols decrease plasma triglycerides and cholesterol accumulation in the aorta of ovariectomized guinea pigs. The Journal of nutrition *133*, 2268-2272.
- Zhang, Q., Thomas, S.M., Lui, V.W., Xi, S., Siegfried, J.M., Fan, H., Smithgall, T.E., Mills, G.B., and Grandis, J.R. (2006a). Phosphorylation of TNF-alpha converting enzyme by gastrin-releasing peptide induces amphiregulin release and EGF receptor activation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *103*, 6901-6906.
- Zhang, S.L., Yeromin, A.V., Zhang, X.H., Yu, Y., Safrina, O., Penna, A., Roos, J., Stauderman, K.A., and Cahalan, M.D. (2006b). Genome-wide RNAi screen of Ca(2+) influx identifies genes that regulate Ca(2+) release-activated Ca(2+) channel activity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *103*, 9357-9362.
- Zhang, X.F., Settleman, J., Kyriakis, J.M., Takeuchi-Suzuki, E., Elledge, S.J., Marshall, M.S., Bruder, J.T., Rapp, U.R., and Avruch, J. (1993). Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. Nature *364*, 308-313.
- Zheng, C.F., and Guan, K.L. (1994). Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. The EMBO journal *13*, 1123-1131.
- Zhou, Y., Meraner, P., Kwon, H.T., Machnes, D., Oh-hora, M., Zimmer, J., Huang, Y., Stura, A., Rao, A., and Hogan, P.G. (2010). STIM1 gates the store-operated calcium channel ORAI1 in vitro. Nature structural & molecular biology *17*, 112-116.
- Zhou, Y., Srinivasan, P., Razavi, S., Seymour, S., Meraner, P., Gudlur, A., Stathopulos, P.B., Ikura, M., Rao, A., and Hogan, P.G. (2013). Initial activation of STIM1, the regulator of store-operated calcium entry. Nature structural & molecular biology *20*, 973-981.
- Zhu-Mauldin, X., Marsh, S.A., Zou, L., Marchase, R.B., and Chatham, J.C. (2012). Modification of STIM1 by O-linked N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) Attenuates Store-operated Calcium Entry in Neonatal Cardiomyocytes. The Journal of biological chemistry *287*, 39094-39106.
- Zumbrunn, J., Kinoshita, K., Hyman, A.A., and Nathke, I.S. (2001). Binding of the adenomatous polyposis coli protein to microtubules increases microtubule stability and is regulated by GSK3 beta phosphorylation. Current biology : CB *11*, 44-49.

ANEXOS

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

NOMBRE DEL PLÁSMIDO	PROTEÍNA	ESPECIE	GENBANK	PLÁSMIDO PARENTAL	ENZIMAS DE RESTRICCIÓN
EB1-pEGFP	EB1-GFP	Mouse	NM_007896	pEGFP-N1	XhoI/SacII
pCMV-HA-ORAI1	HA-ORAI1	Human	NM_032790	pCMV-HA-1	BamHI/NotI
pcDNA3.1-RAS-G12V	RAS-G12V	Human	NM_001130442.1 P01112	pcDNA3.1	
pCMV-Flag-STIM1	Flag-STIM1-WT	Mouse	NM_009287	pCMV-Flag-1	BamHI/NotI
pCMV-Flag-STIM1-S575A/S608A/S621A	Flag-STIM1-3A	Mouse	NM_009287	pCMV-Flag-1	BamHI/NotI
pCMV-Flag-STIM1-S575E/S608E/S621E	Flag-STIM1-3E	Mouse	NM_009287	pCMV-Flag-1	BamHI/NotI
pcDNA5/FRT/TO-Flag-STIM1-I644N/P645N	Flag-STIM1-TRNN	Mouse	NM_009287	pcDNA5/FRT/TO-Flag	
STIM1-pmCherry	STIM1-Cherry	Mouse	NM_009287	pmCherry-N1	XhoI/BamHI
STIM1-S575A/S608A/S621A-pmCherry	STIM1-3A-Cherry	Mouse	NM_009287	pmCherry-N1	XhoI/BamHI
STIM1-S575E/S608E/S621E-pmCherry	STIM1-3E-Cherry	Mouse	NM_009287	pmCherry-N1	XhoI/BamHI
STIM1-I644N/P645N-pmCherry	STIM1-TRNN-Cherry	Mouse	NM_009287	pmCherry-N1	XhoI/BamHI
pCMV-Tag-3B-STIM1-GFP	Myc-STIM1-WT-GFP	Mouse	NM_009287	pCMV-Tag-3B	BamHI/XhoI
pCMV-Tag-3B-STIM1-S575A/S608A/S621A-GFP	Myc-STIM1-3A-GFP	Mouse	NM_009287	pCMV-Tag-3B	BamHI/XhoI
pCMV-Tag-3B-STIM1-S575E/S608E/S621E-GFP	Myc-STIM1-3E-GFP	Mouse	NM_009287	pCMV-Tag-3B	BamHI/XhoI
pCMV-Tag-3B-STIM1-I644N/P645N-GFP	Myc-STIM1-TRNN-GFP	Mouse	NM_009287	pCMV-Tag-3B	BamHI/XhoI

Tabla II. *Relación de anticuerpos utilizados en este estudio.*

ANTICUERPO	HOSPEDADOR	MARCA COMERCIAL	USO	CONCENTRACIÓN	INCUBACIÓN
EB1	Mouse	*BD Transduction Laboratories.*	IF	12.5 µg/ml	O/N – 4ºC
EB1	Rabbit	*Santa Cruz Biotechnologies, Inc.*	IP	5 µg : 1mg de lisado	O/N – 4ºC
E-Cadherina	Mouse	*BD Transduction Laboratories*	WB IF	50 ng/ml 2.5 µg/ml	O/N – 4ºC 1h – T.A.
GAPDH	Mouse	*AbCam*	WB	0.4 µg/ml	O/N – 4ºC
GFP	Rabbit	*Cell Signalling Technology*	WB	1 µg/ml	O/N – 4ºC
HA	Rabbit	*Sigma Aldrich*	WB		
Phospho-Thr202/Thr204-ERK1/2	Rabbit	*Cell Signalling Technology*	WB	1 µg/ml	O/N – 4ºC
PhosphoSer575STIM1	Sheep	*Division of Signal Transduction Therapy. University of Dundee*	WB	1 µg/ml	O/N – 4ºC
PhosphoSer608STIM1	Sheep	*Division of Signal Transduction Therapy. University of Dundee*	WB	1 µg/ml	O/N – 4ºC
PhosphoSer621STIM1	Sheep	*Division of Signal Transduction Therapy. University of Dundee*	WB	1 µg/ml	O/N – 4ºC
STIM1	Rabbit	*ProSci Inc.*	WB	1 µg/ml	O/N – 4ºC
Total-ERK1/2	Rabbit	*Cell Signalling Technology*	WB	1 µg/ml	O/N – 4ºC
Vimentina clon V9	Mouse	*Sigma Aldrich*	WB IF	1 µg/ml 20 µg/ml	O/N – 4ºC 1h – T.A.

WB: Western blot.
IF: Inmunofluorescencia
IP: Inmunoprecipitación
T.A.: Temperatura ambiente
O/N.: durante la noche