



TESIS DOCTORAL

**Regulación de la homeostasis de Ca^{2+} y
viabilidad celular por STIM1 en la línea de
neuroblastoma SH-SY5Y**

Carlos Pascual Caro

Programa de Doctorado en Biomarcadores de
Salud y Estados Patológicos

2019



TESIS DOCTORAL

**Regulación de la homeostasis de Ca^{2+} y
viabilidad celular por STIM1 en la línea de
neuroblastoma SH-SY5Y**

Carlos Pascual Caro

Programa de Doctorado en Biomarcadores de Salud y Estados Patológicos

Conformidad de los directores:

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

2019



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 y Biología Molecular y Genética, la **Dra. Eulalia Pozo Guisado**, Investigadora Postdoctoral del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética.

CERTIFICAN que:

La presente Tesis Doctoral, titulada: “**Regulación de la homeostasis de Ca²⁺ y viabilidad celular por STIM1 en la línea de neuroblastoma SH-SY5Y**” presentada por **D. Carlos Pascual Caro**, 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 20 de diciembre de 2018.

Fdo. Dr. Fco. Javier Martín Romero

Fdo. Dra. Eulalia Pozo Guisado

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

- **Pascual-Caro, C.**, Berrocal, M., Lopez-Guerrero, A. M., Alvarez-Barrientos, A., Pozo-Guisado, E., Gutierrez-Merino, C., Mata, A. M. and Martin-Romero, F. J. (2018) 'STIM1 deficiency is linked to Alzheimer's disease and triggers cell death in SH-SY5Y cells by upregulation of L-type voltage-operated Ca', *J Mol Med (Berl)*, 96(10), pp. 1061-1079.

- **Pascual-Caro, C.**, Espinosa-Bermejo, N., Pozo-Guisado, E. and Martin-Romero, F. (2018b) 'Role of STIM1 in neurodegeneration', *World Journal of Biological Chemistry*, 9, pp. 16-24.

- **Pascual-Caro, C.**, Gutierrez-Martin, Y., Alvarez-Barrientos, A. and Martin-Romero, F.J. 'Downregulation of ITPR3 mediates mitochondrial dysfunction in STIM1-deficient SH-SY5Y cells' (en preparación).

Colaboraciones con otros miembros del grupo de investigación:

- Lopez-Guerrero, A. M., Tomas-Martin, P., **Pascual-Caro, C.**, Macartney, T., Rojas-Fernandez, A., Ball, G., Alessi, D. R., Pozo-Guisado, E. and Martin-Romero, F. J. (2017b) 'Regulation of membrane ruffling by polarized STIM1 and ORAI1 in cortactin-rich domains', *Sci Rep*, 7(1), pp. 383.

- Martin-Romero FJ, Lopez-Guerrero AM, **Pascual-Caro C**, Pozo-Guisado E. The Interplay between Cytoskeleton and Calcium Dynamics, in Cytoskeleton: Structure, Dynamics, Function and Disease. Edited by J.C. Jimenez Lopez. Intech Eds. ISBN: 978-953-51-4898-2 (2017).

- Lopez-Guerrero, A. M., **Pascual-Caro, C.**, Martin-Romero, F. J. and Pozo-Guisado, E. (2017a) 'Store-operated calcium entry is dispensable for the activation of ERK1/2 pathway in prostate cancer cells', *Cell Signal*, 40, pp. 44-52.

- Martin-Romero FJ, **Pascual-Caro C**, Lopez-Guerrero A, Pozo-Guisado E., Espinosa-Bermejo N. Regulation of Calcium Signaling by STIM1 and ORAI1, in Calcium and Signal Transduction. Edited by Dr. John N. Buchholz Intech Eds. ISBN: 978-953-51-6737-2 (2018)

Congresos científicos:

- Lopez-Guerrero AM, **Pascual-Caro C**, Rojas-Fernandez A, Macartney T, Alessi DR, Pozo-Guisado E, Martin-Romero FJ. Cortactin recruits the Ca(2+) channel ORAI1 in membrane ruffles. European Cytoskeletal Forum. Cambridge (United Kingdom). 2016.

- **Pascual-Caro C**, Lopez-Guerrero AM, Macartney T, Alessi DR, Pozo-Guisado E and Martin-Romero FJ. CRISPR/Cas9 genome editing of STIM1 and ORAI1 in cancer cell lines. Congress: XIV International Meeting of the European Calcium Society. Valladolid (Spain). 2016.

- Lopez-Guerrero AM, **Pascual-Caro C**, Macartney T, Alessi DR, Pozo-Guisado E, Martin-Romero FJ. ORAI1 and STIM1 promote membrane ruffling at the leading edge of migrating cells. Congress: International Workshop of the Spanish Ion Channel Initiative (SICI). Segovia (Spain). 2016.

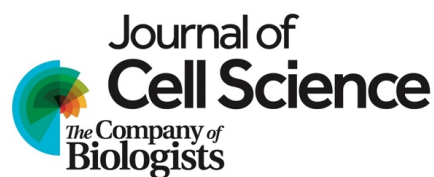
- **Pascual-Caro C**, Pozo-Guisado E, Martin-Romero F.J. Cav1.2 channels overexpression underlie cell death in STIM1-deficient differentiated SH-SY5Y cells. Congress: VI Meeting of The Spanish Ion Calcium Initiative of the Spanish Ion Channel Initiative (SICI). Santiago de Compostela (Spain). 2017.

- **Pascual-Caro C**, Lopez-Guerrero AM, Macartney T, Alessi DR, Pozo-Guisado E, Martin-Romero FJ. STIM1 deficiency triggers mitochondrial impairment and senescence by upregulation of Cav1.2 channels. Congress: XL SEBBM Congress (FEBS3+). Barcelona (Spain). 2017.

- **Pascual-Caro C**, Lopez-Guerrero AM, Alvarez-Barrientos A, Pozo-Guisado E, Martin-Romero FJ. STIM1 deficiency triggers mitochondrial impairment and senescence by upregulation of L-type voltage operated Ca^{2+} entry in SH-SY5Y cells. Congress: The 43rd FEBS Congress. Prague (Czech Republic). 2018.

- Lopez-Guerrero AM, **Pascual-Caro C**, Espinosa-Bermejo N, Pozo-Guisado E, Martin-Romero FJ. Rac1-cortactin regulates ORAI1 localization at membrane ruffling sites. Congress: The 43rd FEBS Congress. Prague (Czech Republic). 2018.

Este trabajo ha sido financiado con Proyectos del Ministerio de Economía y Competitividad (**BFU2014-52401-P**), del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (**BFU2017-82716-P**) y de la Junta de Extremadura-Fondo Social Europeo (**IB16088** y **GR15077**). D. Carlos Pascual Caro ha sido beneficiario de una beca predoctoral de Formación del Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte del Gobierno de España (**FPU13/03430**) y una beca de estancia en el extranjero de The Company of Biologists (**Travelling Fellowship, JCSTF-170507**).



Dicen que para tener éxito en la vida, tienes que ser afortunado, o un poco loco, o muy talentoso, o encontrarte en el lugar y momento adecuado. Para mí el éxito radica en disfrutar cada día con lo que haces y aunque no sé qué parte de loco o talentoso puede corresponder a mi persona, pero tengo claro que aquel verano de 2012 en el que terminaba cuarto de licenciatura estuve en el lugar adecuado. Yo buscaba algún grupo de investigación de Bioquímica, pues decía que quería investigar y que me fascinaba esa disciplina, pero sinceramente, ¿qué sabía yo de investigación y de Bioquímica en aquel momento? Seguramente nada y tal vez sepa poco aún, pero lo que sí sé ahora es que quiero seguir descubriendo ese mundo. Con mucho respeto pero la verdad con poco miedo, me asomé a aquel laboratorio y pregunté por Lali, cuyo nombre me había facilitado una buena amiga. Lali me presentó a Javier y en pocas palabras me convenció para que aquel verano empezara a ir al laboratorio. Al año siguiente finalicé la carrera y en una visita a su despacho, Javier me enseñó una carpeta con un nuevo proyecto que tenía en mente pero que nadie había comenzado, me ofrecía aprender, crecer personalmente, formarme profesionalmente. INVESTIGAR. Ya aquí estoy varios años después presentando mi Tesis Doctoral. Aunque es difícil agradecer en pocas palabras a todas las personas que me han ayudado en el transcurso de esta etapa de mi vida, considero indispensable nombrar a algunas de ellas.

En primer lugar, gracias a mis directores, “mis padres en la ciencia”. Al Dr. Fco. Javier Martín Romero por sus sabias enseñanzas, mostrándome que la paciencia y la perseverancia tienen un efecto mágico ante los cuales desaparecen las dificultades y los obstáculos, no podía haber encontrado mejor maestro. Gracias a la Dra. Eulalia Pozo Guisado por esa dedicación, apoyo y visión positiva, todo se veía más fácil después de escuchar tus consejos y por supuesto, por elaborar una “carrot cake” que ya quisieran en Reino Unido.

Gracias a mis compañeras de laboratorio, porque ahora que corren tiempos difíciles para las mujeres, yo debo decir que a “Carlitos” lo acogió un grupo de mujeres fuertes y trabajadoras. Gracias a Vanessa Casas y Patricia Tomás por enseñarme con paciencia las diferentes técnicas de laboratorio y por hacerme disfrutar de tan buenos momentos, y en especial a “la jefa” Aída López, porque aunque pienso que la primera vez que me enseñaste a revelar un inmunoblot estabas tú más nerviosa que yo, has sido siempre mi mejor apoyo en el laboratorio dándome desde el primer momento ese trato tan familiar. También quiero agradecer a las últimas incorporaciones, Noelia Espinosa e Irene Sánchez, por aguantar mi mal humor en algunos momentos y por amenizar las tardes entre pipetas, planificando mis planes y actividades aunque luego nos cueste materializarlas.

También quiero dar las gracias a todos mis compañeros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética, así como al Servicio de Apoyo a la Investigación de la UEx; de todos he recibido siempre un trato amable y atento.

Gracias a mis amigos de Biología, con mención especial a Teresa y Guada, que nunca han dudado de mi capacidad y me han apoyado hasta el último momento.

Gracias a mis amigos, por ayudarme a desconectar en mis momentos de agobios y sacarme siempre una sonrisa.

Y por supuesto, gracias a toda mi familia; en especial a mi hermana que es la principal culpable de las metas que he alcanzado, marcándome los pasos a seguir con esa constancia y orgullo para derrotar todas las barreras y alcanzar los objetivos más difíciles. Gracias a mis padres por todo, no sólo me habéis regalado la vida sino que la habéis hecho fácil con un apoyo y cariño incondicional, ya que posiblemente no entendéis a lo que me dedico o tal vez hubierais preferido otro camino para mí, pero siempre habéis respetado mi elección y eso es lo que me hace más feliz. Para mí sois el mayor ejemplo de trabajo y lucha, siempre sumando, siempre creciendo; porque como bien dice mi padre: “Hay que levantarse cada mañana con el objetivo de ser productivo”.

Por último, dar las gracias a mis dos ángeles, mis sobrinas Marta y Lucía; porque aunque ahora quizás no sois conscientes de ello, habéis sido mi mayor fuerza en los últimos meses; recibir un vídeo o foto vuestra o disfrutar un ratito con vosotras, me hacía olvidar todo lo malo y me llenaba de energía para continuar. Algún día os contaré este cuento princesas, ya que para mí ha tenido un final muy feliz.

*“Es preciso sacudir energicamente el bosque
de las neuronas cerebrales adormecidas;
es menester hacerlas vibrar con la emoci3n
de lo nuevo e infundirles nobles y elevadas
inquietudes”*

Santiago Ram3n y Cajal

Abreviaturas, acrónimos y siglas

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

[Ca²⁺]_{mito}: Concentración de calcio libre mitocondrial (*mitochondrial free calcium concentration*)

ΔV: Potencial de membrana (*membrane potential*)

Aβ: Péptido β-amiloide (*amyloid β*)

APP: Proteína Precursora Amiloidea (*Amyloid Precursor Protein*)

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

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro (*Brain-derived neurotrophic factor*)

BSA: Albúmina de suero bovino (*Bovine serum albumin*)

CAD: Dominio activador de CRAC (*CRAC activating domain*)

CAMKII: Proteína quinasa dependiente de Ca²⁺-calmodulina II (*Ca²⁺-calmodulin-dependent kinase II*)

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

Cas9n: Nickasa Cas9 (*Cas9 nickase*)

CAD: Dominio activador de CRAC (*CRAC activation domain*)

CaM: Calmodulina (*Calmodulin*)

CDI: Inactivación dependiente de calcio (*Calcium-dependent inactivation*)

CDK: Quinasa dependiente de ciclina (*Cyclin-dependent kinase*)

cDNA: DNA complementario (*Complementary DNA*)

CFP: Proteína fluorescente cian (*Cyan fluorescent protein*)

C12FDG: 5-Dodecanoilaminofluoresceína di-β-D-galactopiranosido (*5-Dodecanoylaminofluorescein di-β-D-galactopyranoside*)

CICR: Liberación de Ca²⁺ activada por Ca²⁺ (*Ca²⁺-induced Ca²⁺-release*)

CRAC: Canales de Ca²⁺ activados por Ca²⁺ (*Calcium-release activated channels*)

CRISPR: Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)

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

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

DMSO: Dimetil-sulfóxido (*Dimethyl Sulfoxide*)

dNTPs: Desoxirribonucleósidos trifosfato (*Deoxyribonucleoside triphosphates*)

dsDNA: DNA de doble cadena (*double-strand DNA*)

DSB: Cortes de doble cadena en el DNA (*Double-strand breaks*)

DTT: Ditiotreitól (*Dithiothreitol*)

EGTA: Ácido etilen glicol-bis(2-amiloetiléter)-N, N, N', N'-tetraacético (*Ethylene Glycol-bis(2-aminoethylether)-N, N, N', N'-Tetraacetic Acid*)

FAD: Enfermedad de Alzheimer de tipo familiar (*Familial Alzheimer's disease*)

FBS: Suero fetal bovino (*Fetal bovine serum*)

FCCP: Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (*Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone*)

FRET: Transferencia de energía de resonancia de Förster (*Förster Resonance Energy Transfer*)

FURA 2-AM: Fura 2-acetoximetiléster (*Fura 2-acetoxymethyl ester*)

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

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

HDR: Recombinación homóloga (*Homology Directed Repair*)

HRP: Peroxidasa de rábano (*Horseradish peroxidase*)

IP₃: Inositol 1,4,5-trisfosfato (*Inositol 1,4,5-trisphosphate*)

ITPR: Receptor de IP₃ (*Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor*)

JC-1: Yoduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetil-imidacarbocianina (*5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-imidacarbocyanine iodide*)

kDa: Kilodalton

KO: Knock-out

LB: Medio Luria Bertani para *E.coli*

MCU: Uniportador de calcio mitocondrial (*Mitochondrial calcium uniporter*)

mGluR1: Receptor metabotrópico de glutamato 1 (*Metabotropic glutamate receptor 1*)

MP: Membrana plasmática (*PM: Plasma Membrane*)

mRNA: RNA mensajero (*Messenger RNA*)

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (*3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-Diphenyltetrazolium Bromide*)

NA: Apertura numérica (*Numerical aperture*)

NHEJ: Recombinación de extremos no homólogos (*Non-Homologous End Joining*)

N-terminal: Amino-terminal (*Amino-terminal*)

ORAI1: *Calcium Release-Activated Calcium Channel Protein 1 (CRAC1)*

PAM: Motivo adyacente al protoespaciador (*Protospacer adjacent motif*)

pb: Pares de bases (*bp: base pair*)

PBS: Tampón fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*)

PBS-T: Tampón fosfato salino + Tween 0.2% (*Phosphate Buffered-Saline + Tween*)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PEI: Polietilenimina (*Polyethylenimine*)

PKC: Proteína quinasa C (*Protein kinase C*)

PMCA: Ca²⁺-ATPasa de la membrana plasmática (*Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase*)

PMSF: Fluoruro de fenil metil sulfonilo (*Phenylmethylsulfonyl fluoride*)

PSEN: Presenilina (*Presenilin*)

RA: Ácido retinoico (*Retinoic acid*)

RE: Retículo endoplasmático (*ER: Endoplasmic Reticulum*)

RNA: Ácido ribonucleico (*Ribonucleic Acid*)

RNAasa: Ribonucleasa (*RNAase: Ribonuclease*)

RNAi/ shRNA: RNA de interferencia (*RNA interference*)

RT: Temperatura ambiente (*Room temperature*)

RyR: Receptor de rianodina (*Ryanodine receptor*)

SAM: Motivo alfa estéril (*Sterile Alpha Motif*)

sd: Desviación estándar (*Standard deviation*)

SDS: Dodecil sulfato sódico (*Sodium dodecyl sulfate*)

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida (*Poliacrylamide gel electrophoresis*)

SERCA: Ca²⁺-ATPasa del retículo sarco(endo)plasmático (*Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase*)

SOAR: Región de activación STIM1-ORAI1 (*STIM1-ORAI1 activation region*)

SOCs: Canales de Ca²⁺ operados por depósitos (*Store-operated Ca²⁺ channels*)

SOCE: Entrada de calcio regulada por depósitos intracelulares (*Store-Operated Calcium Entry*)

STIM1: *Stromal Interaction Molecule 1*

TEMED: N, N, N', N'-tetrametil etilendiamina (*Tetramethylethylenediamine*)

Tg: Tapsigargina (*Thapsigargin*)

TMRM: Tetrametilrodamina metil éster (*Tetramethylrhodamine methyl ester*)

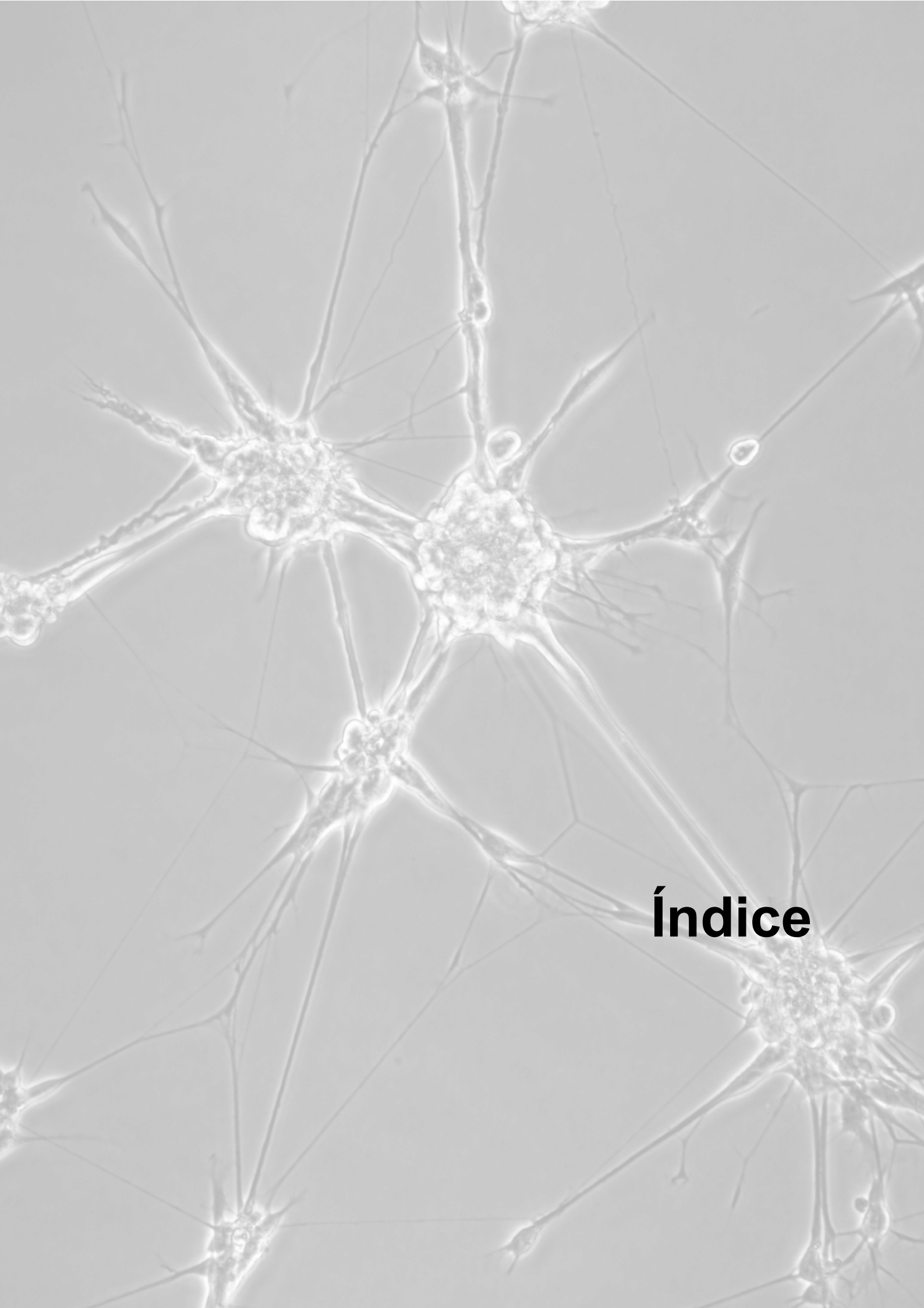
Tris: Tris (hidroximetil) aminometano (*Tris (hydroxymethyl) aminomethane*)

TRP: Receptores de potencial transitorio (*Transient Receptor Potential*)

VOCCs: canales de Ca²⁺ operados por voltaje (*Voltage-operated Ca²⁺ channels*)

YFP: Proteína fluorescente amarilla (*Yellow fluorescent protein*)

WT: wild-type



Índice

Resumen	25
Summary	29
Introducción	33
1. LA IMPORTANCIA DEL ION Ca^{2+} EN LA SEÑALIZACIÓN CELULAR.	35
1.1. Activación de mecanismos que incrementan los niveles de Ca^{2+} citosólico.	36
1.2. Mecanismos que restauran los niveles basales de Ca^{2+} intracelular.	39
2. ENTRADA DE CALCIO REGULADA POR DEPÓSITOS INTRACELULARES (SOCE).	39
2.1. Principios del mecanismo.	39
2.2. Proteínas STIM.	40
2.3. STIM1: estructura, localización y mecanismo de acción.	41
2.3.1. Dominios funcionales de la proteína STIM1.	41
2.3.2. Localización celular de STIM1.	43
2.3.3. Mecanismo de acción de STIM1.	43
2.3.4. Otros componentes implicados en la interacción STIM1-ORAI1.	44
3. CANALES OPERADOS POR VOLTAJE EN LA SEÑALIZACIÓN POR Ca^{2+}	45
3.1. Clasificación de los canales de Ca^{2+} operados por voltaje (VOCs).	46
3.2. Familia de canales de Ca^{2+} operados por voltaje tipo L: canal $Ca_v1.2$	47
3.3. Interacción STIM1- $Ca_v1.2$ en la regulación de la entrada de Ca^{2+}	48
4. LOS RECEPTORES DE IP_3 EN LA MOVILIZACIÓN DEL Ca^{2+} INTRACELULAR.	49
5. EL PAPEL DE LA MITOCONDRIA EN LA SEÑALIZACIÓN POR Ca^{2+}	51
6. SEÑALIZACIÓN POR Ca^{2+} EN LA FUNCIÓN NEURONAL.	53
6.1. STIM1 y SOCE en la función neuronal.	54
6.2. Desregulación de la homeostasis del Ca^{2+} y neurodegeneración.	54
6.2.1. La hipótesis del Ca^{2+} en la enfermedad de Alzheimer.	54
6.2.2. STIM1 en el daño y muerte celular neuronal.	57
6.2.3. Deficiencia de STIM1 y Alzheimer.	57
6.2.4. Sobreactivación de VOCs y neurodegeneración.	61
7. DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL Y NEURODEGENERACIÓN.	62
Objetivos/Objectives	65
Resultados	71
Capítulo 1	73
1. ESTUDIO DE LA DEFICIENCIA DE STIM1 EN CÉLULAS SH-SY5Y.	75
1.1. Generación de una línea celular SH-SY5Y STIM1-KO.	75
1.2. Caracterización de la línea celular SH-SY5Y STIM1-KO.	78
1.3. La adhesión celular de neuroblastos se ve afectada por la deficiencia de STIM1.	81
2. LA SOBREPRESIÓN DE STIM1 EN LA LÍNEA CELULAR SH-SY5Y STIM1-KO PERMITE LA RECUPERACIÓN DEL FENOTIPO SILVESTRE.	83
3. DIFERENCIACIÓN NEURONAL DE CÉLULAS SH-SY5Y Y EXPRESIÓN DE STIM1.	84
3.1. STIM1 no es esencial para la diferenciación de células SH-SY5Y.	86
4. LA AUSENCIA DE STIM1 DISMINUYE LA VIABILIDAD EN CÉLULAS EN DIFERENCIACIÓN.	87
4.1. Alteración del ciclo celular durante la diferenciación de células STIM1-KO.	88
5. INCREMENTO DE LOS NIVELES DE SENESCENCIA EN CÉLULAS STIM1-KO DIFERENCIADAS.	90

6. CONCENTRACIÓN DE Ca ²⁺ LIBRE CITOSÓLICO EN CÉLULAS STIM1-KO.....	92
7. ENTRADA DE Ca ²⁺ A TRAVÉS DE VOCCS Y MUERTE CELULAR EN STIM1-KO.....	93
7.1. La ausencia de STIM1 incrementa los niveles de expresión del canal CACNA1C (Cav1.2).....	93
7.2. Las células STIM1-KO presentan una sobreactivación del canal Cav1.2.....	95
Capítulo 2	97
1. EL DÉFICIT DE STIM1 ALTERA EL POTENCIAL DE MEMBRANA INTERNA MITOCONDRIAL.....	99
1.1. Medida del potencial de membrana interna mitocondrial con JC-1.....	99
1.2. Análisis del potencial de membrana interna mitocondrial con TMRM.....	100
2. ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA MITOCONDRIAL CON RODAMINA 123.....	103
3. PERFIL DE PROTEÍNAS MITOCONDRIALES EN CÉLULAS WT/STIM1-KO.....	104
4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL COMPLEJO I MITOCONDRIAL.....	106
5. LA DEFICIENCIA EN STIM1 PROVOCA UN DESCENSO EN LA CONCENTRACIÓN DE Ca ²⁺ MITOCONDRIAL.....	107
6. ESTUDIO DE LA MITOFAGIA BASAL EN CÉLULAS WT Y STIM1-KO.....	109
6.1. Caracterización inicial de líneas mito-QC generadas.....	110
6.2. El déficit de STIM1 incrementa la mitofagia basal en células SH-SY5Y.....	110
7. EL DÉFICIT DE STIM1 ALTERA LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE IP ₃	112
7.1. La ausencia de STIM1 reduce los niveles de expresión del receptor IP ₃ R3.....	112
8. EL DÉFICIT DE RECEPTORES DE IP ₃ PROVOCA UNA DISMINUCIÓN DE LA [Ca ²⁺] BASAL EN CÉLULAS STIM1-KO.....	114
Capítulo 3	117
1. SILENCIAMIENTO DEL CANAL Cav1.2 EN CÉLULAS STIM1-KO Y RECUPERACIÓN DEL FENOTIPO SILVESTRE.....	120
1.1. Generación de una línea STIM1-KO/CACNA1C-KD.....	120
1.2. El silenciamiento del canal Cav1.2 restaura los niveles de senescencia en células STIM1-KO.....	121
1.3. El silenciamiento del canal Cav1.2 restaura la funcionalidad mitocondrial en células STIM1-KO.....	122
1.4. El silenciamiento del canal Cav1.2 normaliza los niveles de [Ca ²⁺] _{mito} en células STIM1-KO.....	124
2. LA SOBRE-EXPRESIÓN DEL CANAL ITPR3 NORMALIZA LA [Ca ²⁺] _{mito} EN CÉLULAS STIM1-KO.....	127
2.1. La sobre-expresión transitoria de ITPR3 normaliza parcialmente la [Ca ²⁺] _{mito} en células STIM1-KO.....	127
2.2. Generación de una línea estable para la expresión de ITPR3-Myc.....	129
2.3. La expresión estable de ITPR3 normaliza la [Ca ²⁺] _{mito} en células STIM1-KO.....	129
Discusión	131
Conclusiones/Conclusions	143
Materiales y Métodos	149
1. CULTIVOS CELULARES.....	151
1.1. Cultivo de la línea celular.....	151
1.2. Diferenciación de neuroblastos SH-SY5Y.....	151

2. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR.....	153
2.1. Ensayo de viabilidad celular en neuroblastos SH-SY5Y.....	153
3. CLONAJE MOLECULAR.....	154
3.1. Cuantificación del DNA.....	154
3.2. Transformación bacteriana.....	154
3.3. Obtención del DNA plasmídico.....	154
3.4. Construcciones de DNA, transfección y expresión ectópica de proteínas.....	155
3.4.1. Transfección estable por resistencia a G418.....	155
3.4.2. Transfección retroviral.....	156
4. CRISPR.....	159
4.1. Generación de una línea celular SH-SY5Y STIM1-KO con el sistema CRISPR/Cas9.....	160
5. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES E INMUNOBLOT.....	162
5.1. Preparación de extractos celulares.....	162
5.2. Medida de la concentración de proteína.....	163
5.3. Electroforesis en condiciones desnaturizantes y transferencia a membranas de nitrocelulosa.....	163
5.4. Inmunodetección.....	163
6. MORFOLOGÍA Y ACTIVIDAD MITOCONDRIAL.....	165
6.1. Medida del potencial de membrana mitocondrial en neuroblastos SH-SY5Y.....	165
6.1.1. Medida del potencial de membrana mitocondrial con JC-1.....	165
6.1.2. Medida del potencial de membrana mitocondrial con TMRM.....	166
6.2. Estudio de la morfología mitocondrial por tinción con rodamina123.....	167
6.3. Medida de la actividad del complejo I mitocondrial.....	167
6.4. Evaluación de mitofagia en neuroblastos SH-SY5Y.....	168
6.4.1. Generación de líneas mito-QC SH-SY5Y.....	168
6.4.2. Adquisición y análisis de imágenes: cuantificación de mitolisosomas.....	169
7. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR.....	170
8. ANALISIS DE ADHESIÓN CELULAR.....	172
8.1. Adhesión celular de neuroblastos SH-SY5Y en matrices extracelulares.....	172
8.2. Cinética temporal de adhesión celular en neuroblastos SH-SY5Y.....	172
9. ANÁLISIS DE LA SENESCENCIA CELULAR.....	173
10. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO LIBRE CITOSÓLICO.....	173
10.1. Carga con fura-2AM en células SH-SY5Y.....	174
10.2. Medida de los valores de fluorescencia.....	175
10.3. Calibración de la medida.....	175
10.4. Activación de la entrada de Ca ²⁺ mediante canales SOC.....	175
10.5. Ensayos de despolarización por KCl en neuroblastos SH-SY5Y.....	176
11. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO LIBRE MITOCONDRIAL.....	176
11.1. Transfección de 4mtD3-cpv y medida de [Ca ²⁺] _{mito} en neuroblastos.....	177
11.2. Medida de los valores de fluorescencia y calibración de la medida.....	177
12. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....	178
12.1. Extracción y purificación de RNA.....	178
12.2. Análisis por qPCR.....	179
Bibliografía.....	181
Anexo 1.....	195



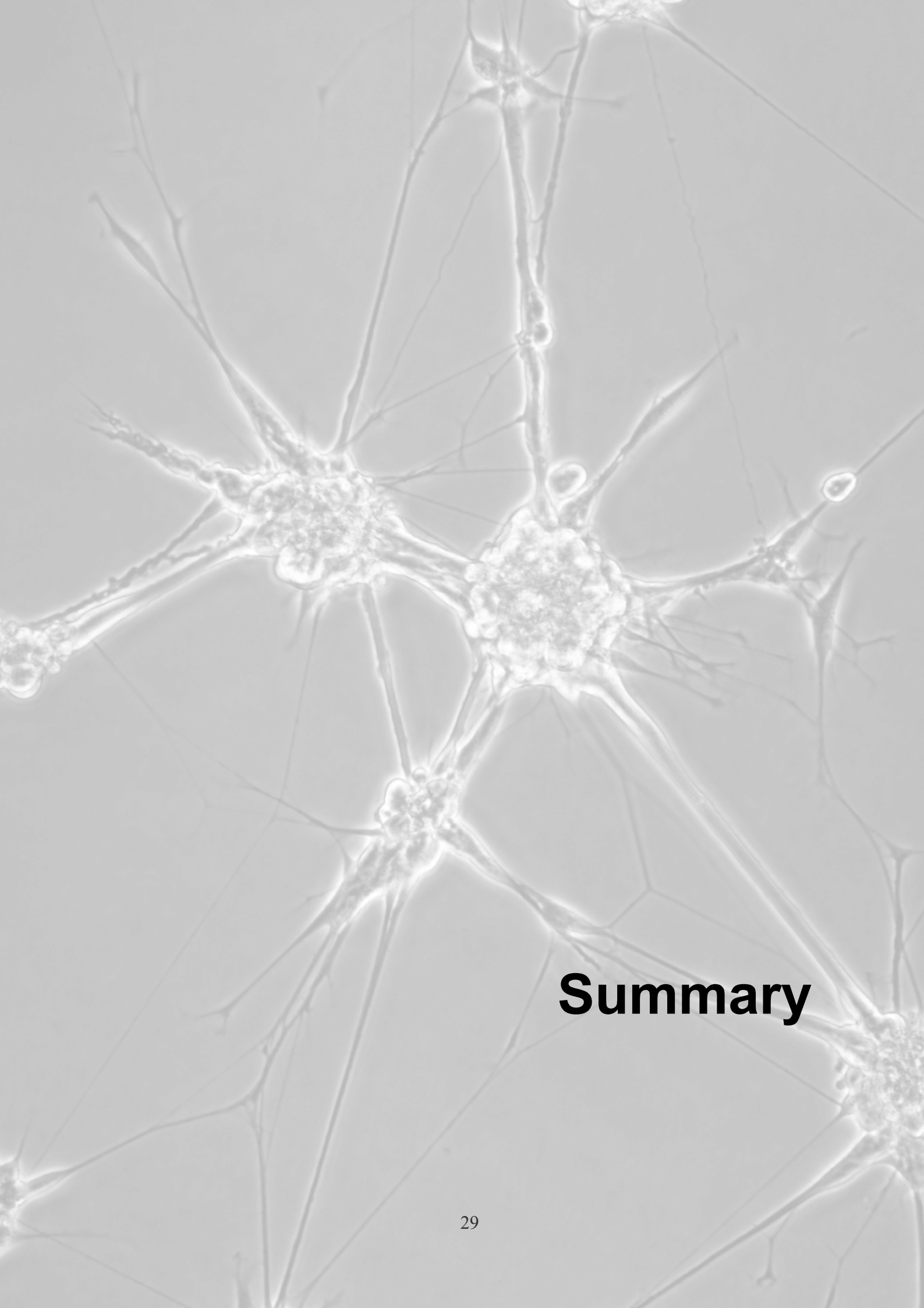
Resumen

La proteína STIM1 es el principal activador de canales SOC tras el vaciado de depósitos intracelulares de Ca^{2+} , principalmente el retículo endoplasmático (RE), desempeñando un papel esencial en la homeostasis del Ca^{2+} , que resulta esencial para la supervivencia celular ya que la desregulación de la movilización de Ca^{2+} se ha relacionado con numerosas enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas. De forma paralela al desarrollo de este trabajo se ha descrito una disminución del nivel de expresión de STIM1 en muestras de cerebro *post mortem* de pacientes evaluados clínicamente y diagnosticados como pacientes de Alzheimer esporádico, apoyando la hipótesis de que la desregulación de la homeostasis de Ca^{2+} se encuentra mediando procesos de neurodegeneración, lo que nos llevó a estudiar el papel de STIM1 en la función neuronal. Para ello, y empleando células de neuroblastoma SH-SY5Y, se generó una línea celular deficiente en STIM1, y por tanto en SOCE, utilizando el sistema de edición genómica CRISPR/Cas9. Nuestros resultados indican que a pesar de que es observable un incremento de expresión de STIM1 durante la diferenciación de las células SH-SY5Y inducida por ácido retinoico y BDNF, las células STIM1-KO adquirirían el mismo fenotipo neuronal diferenciado que las células parentales (wild-type), por lo que STIM1 no es esencial para esta diferenciación. No obstante, las células deficientes en STIM1 mostraron una importante disfunción mitocondrial y pérdida de viabilidad durante su diferenciación.

Con relación al estudio de la pérdida de viabilidad celular ante la ausencia de STIM1, las células STIM1-KO presentaron una mayor expresión y actividad del canal $\text{Ca}_v1.2$ (canal operado por voltaje, VOC, de tipo L), lo que concuerda con la actividad que se le ha adjudicado a STIM1 como regulador negativo de canales $\text{Ca}_v1.2$. La entrada desregulada de Ca^{2+} a través del canal $\text{Ca}_v1.2$ generó una alteración de la homeostasis de Ca^{2+} que desencadenó un incremento de la senescencia, pérdida del potencial de membrana interna mitocondrial y un descenso significativo de los niveles de Ca^{2+} intramitocondrial ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$) y de la actividad del complejo I del transporte electrónico mitocondrial. Por ello, se silenció la expresión del canal $\text{Ca}_v1.2$, mediante la generación de una línea knock-down para el gen *CACNA1C* (codifica para $\text{Ca}_v1.2$) en células STIM1-KO. El silenciamiento del canal $\text{Ca}_v1.2$ en células STIM1-KO permitió reducir los niveles de senescencia, normalizar el potencial de membrana interna mitocondrial, actividad del complejo I, y los niveles de Ca^{2+} intramitocondrial, lo cual indica que la sobreactivación del canal $\text{Ca}_v1.2$ es el principal desencadenante de la muerte celular y disfunción mitocondrial mostrada por las células SH-SY5Y diferenciadas deficientes en STIM1.

Por último, debido a la disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$ observada en las células STIM1-KO, se estudió la posible alteración de la transferencia de Ca^{2+} entre el RE y la

mitocondria, una ruta de vital importancia para un correcto tamponamiento de Ca^{2+} , así como para el mantenimiento de la señalización mediada por Ca^{2+} . En este sentido, las células STIM1-KO mostraron una fuerte disminución de expresión y actividad del receptor ITPR3 (también conocido como $\text{IP}_3\text{R3}$), así como una reducción de expresión del uniportador de Ca^{2+} mitocondrial MCU en células diferenciadas, que sugieren una disminución en la captación de Ca^{2+} por parte de la mitocondria. La sobre-expresión del receptor ITPR3 en células STIM1-KO contribuyó a la normalización de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$ de manera significativa, lo que demuestra que STIM1 controla, al menos de forma indirecta, los niveles de ITPR3, y por tanto, el nivel de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$. Así los estudios desarrollados en esta Tesis Doctoral establecen que las células STIM1-KO constituyen un modelo in vitro útil para estudiar el papel que juega la desregulación de la señalización y homeostasis del Ca^{2+} en enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, aunque se requiere más experimentación para determinar hasta qué punto este sistema STIM1-KO puede simular la neurodegeneración in vivo observada en pacientes.



Summary

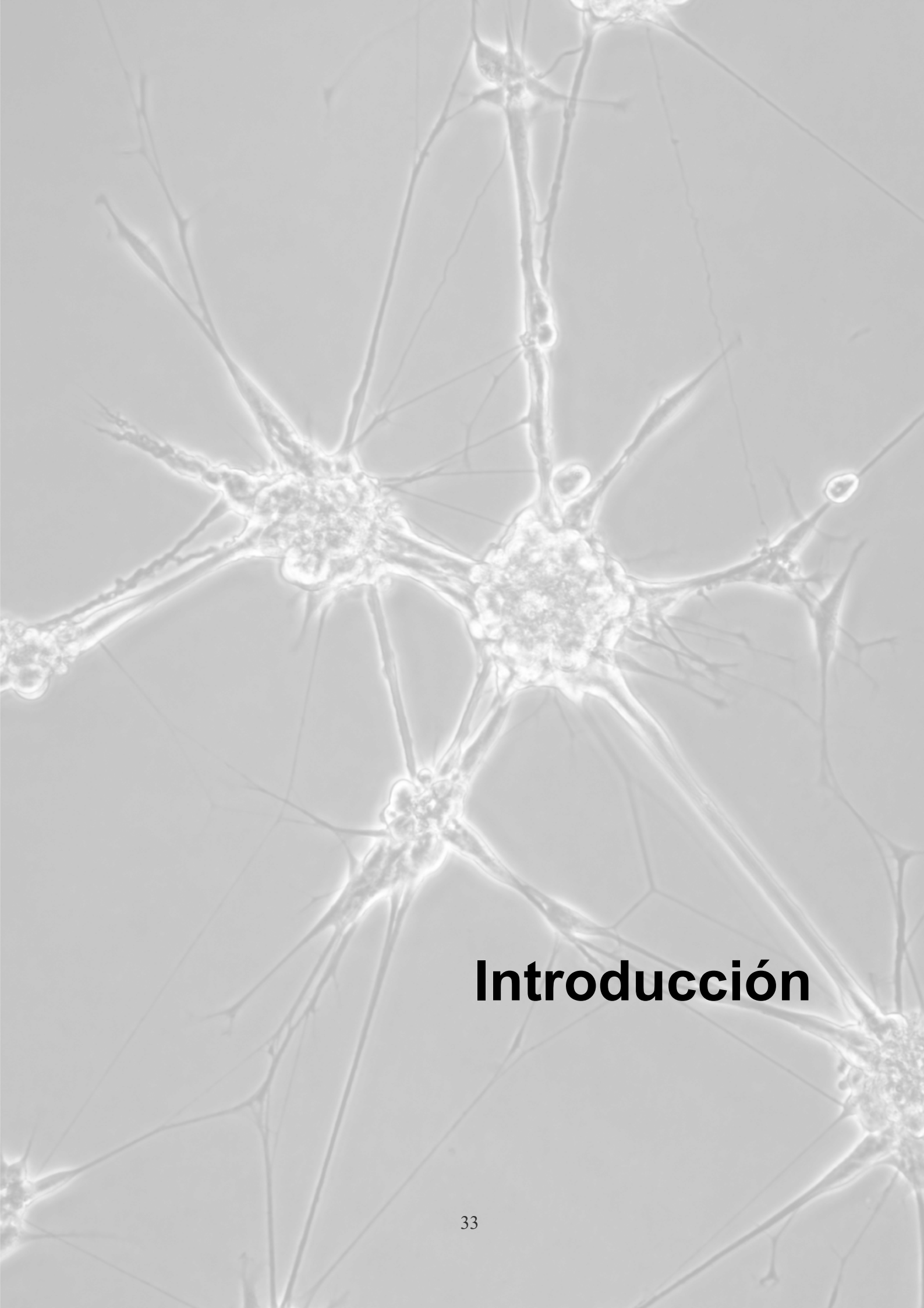
STIM1 protein is the main regulator of SOC channels after the emptying of intracellular Ca^{2+} , mainly the endoplasmic reticulum (ER), playing an essential role in Ca^{2+} homeostasis, which is required for cell survival since the dysregulation of Ca^{2+} mobilization has been linked to several autoimmune and neurodegenerative diseases. Concurrently to the development of this work, a significant decrease in the level of STIM1 expression had been described in post mortem brain samples from patients clinically evaluated and diagnosed with sporadic Alzheimer, supporting the hypothesis that the dysregulation of Ca^{2+} homeostasis mediates neurodegeneration, which led us to study the role of STIM1 in neuronal function. To this end, and using SH-SY5Y neuroblastoma cells, a cell line deficient in STIM1, and therefore in SOCE, was generated using the CRISPR/Cas9 genome editing system. Our results indicate that although an increase in STIM1 expression was observed during the differentiation of SH-SY5Y cells triggered by retinoic acid and BDNF, STIM1-KO cells acquired the same differentiated neuronal phenotype as wild-type cells, so STIM1 is not essential for this differentiation. However, STIM1-deficient cells showed significant mitochondrial dysfunction and loss of viability during differentiation.

Regarding the study of the loss of cell viability in the absence of STIM1, STIM1-KO cells showed a greater expression and activity of the $\text{Ca}_v1.2$ channel (voltage-operated calcium channel, VOCC, type L), which is consistent with the activity attributed to STIM1 as a negative regulator of $\text{Ca}_v1.2$ channels. The dysregulation of Ca^{2+} entry through the $\text{Ca}_v1.2$ channel generated an alteration of Ca^{2+} homeostasis that triggered an increase in senescence, loss of mitochondrial inner membrane potential and a significant decrease in intramitochondrial Ca^{2+} levels ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$) and in mitochondrial electron transport complex I activity. In this regard, the expression of the $\text{Ca}_v1.2$ channel was silenced by the generation of a knock-down cell line for the *CACNA1C* gene (which codes for $\text{Ca}_v1.2$) in STIM1-KO cells. The silencing of the $\text{Ca}_v1.2$ channel in STIM1-KO cells allowed the normalization of senescence levels, mitochondrial inner membrane potential, complex I activity, and intramitochondrial Ca^{2+} levels, which proved that the upregulation of $\text{Ca}_v1.2$ channel underlies cell death and mitochondrial dysfunction observed in differentiated SH-SY5Y cells deficient in STIM1.

Finally, because of the drop in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$ observed in STIM1-KO cells, we studied the possible alteration of the transfer of Ca^{2+} between ER and mitochondria, a pathway of vital importance for a correct buffering of Ca^{2+} , as well as for the maintenance of Ca^{2+} -dependent signaling. In this regard, STIM1-KO cells showed a strong decrease in expression and activity of the ITPR3 receptor (also known as $\text{IP}_3\text{R3}$), as well as a drop in the expression of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter (MCU) in differentiated cells, which suggested a decrease in the Ca^{2+} uptake by the mitochondria. The overexpression of the

Summary

ITPR3 receptor in STIM1-KO cells contributed to the regulation of $[Ca^{2+}]_{mito}$, which demonstrates that STIM1 controls, at least indirectly, the expression level of ITPR3, and therefore, the level of $[Ca^{2+}]_{mito}$. Thus, the studies developed in this Doctoral Thesis establish that STIM1-KO cells constitute a useful in vitro model to study the role of Ca^{2+} signaling and Ca^{2+} homeostasis dysregulation in neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease, although more experimentation is required to determine what extent this STIM1-KO model can mimic the neurodegeneration observed in patients.



Introducción

1. LA IMPORTANCIA DEL ION Ca^{2+} EN LA SEÑALIZACIÓN CELULAR.

Aunque es un término difícil de definir dada su complejidad e importancia en la supervivencia de la célula, se podría decir que la señalización celular es una red de reacciones e interacciones entre moléculas que permiten a la célula reaccionar y adaptarse ante un amplio rango de estímulos. Los componentes que abarcan esta red de señalización son múltiples y diversos: desde proteínas que actúan como receptores de estímulos externos para dar comienzo a una reacción o respuesta, hasta proteínas o iones que pueden actuar como señalizadores o cofactores tanto a nivel intracelular como extracelular.

En este aspecto, el ion Ca^{2+} es clave en la señalización celular, ya que se trata de un catión divalente que actúa como segundo mensajero en el control de múltiples funciones celulares y fisiológicas. Así las señales de Ca^{2+} citosólicas controlan desde respuestas a corto plazo, como la contracción de filamentos del citoesqueleto o la secreción de vesículas, hasta respuestas a largo plazo como la regulación de la transcripción, el crecimiento o la división celular (Berridge et al., 2003, Berridge et al., 2000). La concentración de calcio libre en el citosol ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) de una célula en reposo se encuentra en torno a 100 nM mientras que en el medio extracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$) es del orden de diez mil veces más alta (~1-2 mM). Sin embargo, la estimulación de las células, bien por despolarización de membranas, deformación mecánica o activación hormonal, desencadena un aumento transitorio y localizado de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Bootman et al., 2001).

El Ca^{2+} no puede ser degradado como ocurre con otras moléculas que actúan como segundos mensajeros. Por ello, las células deben regular estrictamente las concentraciones intracelulares de este ion (Clapham, 1995). Existen mecanismos para eliminar el exceso de Ca^{2+} libre del citosol, como son la extrusión al medio extracelular o al interior de algunos orgánulos subcelulares. Esta acción es llevada a cabo principalmente por bombas, canales y transportadores situados en la membrana plasmática y en el retículo endoplasmático (RE), considerado este último el principal reservorio intracelular de Ca^{2+} . Además, también existen proteínas que se unen con alta afinidad al ion Ca^{2+} , favoreciendo, junto a los otros mecanismos ya mencionados, que el interior celular mantenga una concentración de este ion en el intervalo nanomolar. Cuando se inicia un estímulo estos canales y bombas se activan permitiendo la entrada Ca^{2+} al interior celular y produciéndose, por tanto, un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que puede transmitirse en forma de ondas favoreciendo la activación de los efectores sensibles a Ca^{2+} , lo que supone una respuesta al estímulo. Tras la respuesta, las bombas y canales vuelven a extruir el Ca^{2+} del citosol para recuperar la concentración de las condiciones basales. Estos eventos espaciotemporales de entrada y salida de Ca^{2+} son los que

marcan la señalización celular del Ca^{2+} (Martin-Romero et al., 2018). También es importante tener en cuenta el nivel de Ca^{2+} extracelular, ya que éste es importante como señal fisiológica (Riccardi, 1999). Además, en casos particulares, la extrusión de Ca^{2+} desde el interior celular puede ser una señal extracelular para las células vecinas y generar en ellas una señal intracelular, coordinando así la actividad de las mismas (Hofer et al., 2000).

1.1. Activación de mecanismos que incrementan los niveles de Ca^{2+} citosólico.

En la mayoría de las células, la activación de receptores fisiológicos genera oscilaciones repetitivas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mediadas por la liberación de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático (RE) (Berridge et al., 2000, Putney and Bird, 2008). Estas señales de Ca^{2+} confieren a la célula una especificidad, sensibilidad y precisión únicas en la activación de cascadas de señalización con diversas funciones (Berridge, 2007). Los mecanismos que incrementan los niveles de Ca^{2+} citosólico en respuesta a un estímulo incluyen los canales localizados en el RE y en la membrana plasmática (Berridge et al., 2000).

Los depósitos intracelulares de Ca^{2+} más importantes están en el sistema de membranas del RE o su equivalente en células musculares, el retículo sarco(end)plasmático (RS). El vaciado de estos depósitos está regulado por varios canales, siendo los más estudiados el receptor del inositol-1,4,5-trisfosfato (IP_3R) y el receptor de rianodina (RyR) (Berridge, 1993, Clapham, 1995). El principal activador de estos canales es la propia $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en un proceso denominado vaciado de Ca^{2+} inducido por Ca^{2+} . Además, la apertura de los IP_3R es inducida por un segundo mensajero, el IP_3 . Dicha movilización de Ca^{2+} es generada por ligandos que actúan sobre receptores de la membrana plasmática acoplados a la fosfolipasa C ($\text{PLC-}\beta$ o $\text{PLC-}\gamma$). Estas fosfolipasas liberan IP_3 a partir de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP_2). El IP_3 se une entonces al IP_3R localizado en el RE donde desencadena la liberación de Ca^{2+} desde el lumen del RE al citosol (Streb et al., 1983, Berridge, 2005) (Figura 1).

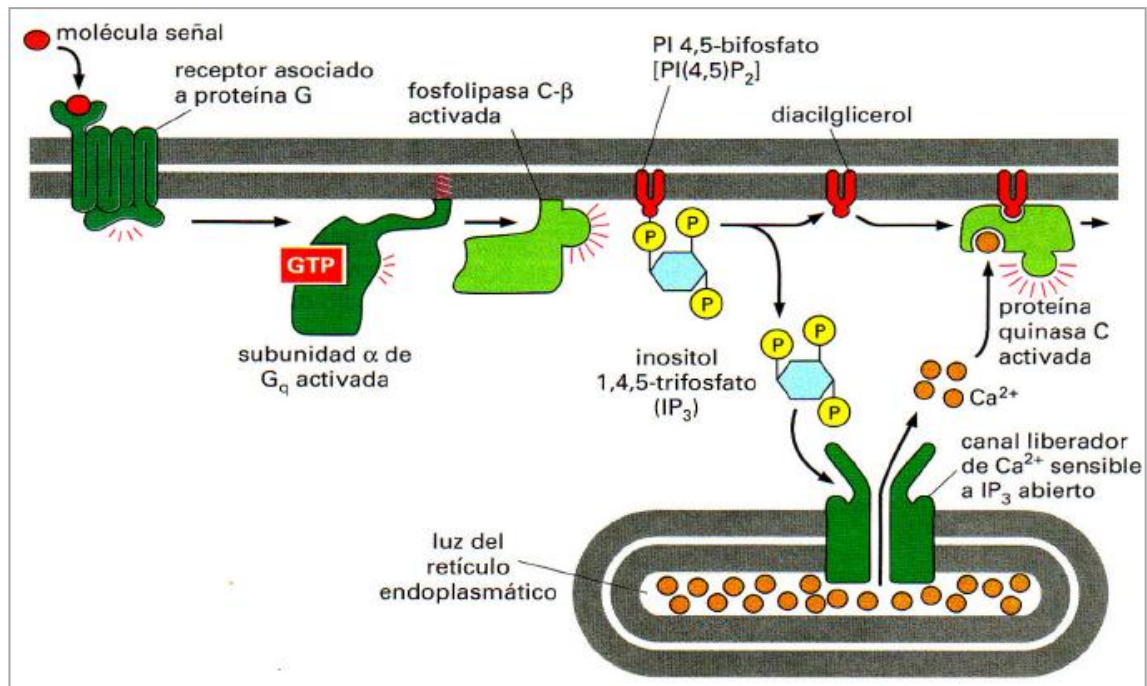


Figura 1. Vaciado de depósitos de Ca^{2+} por activación de los receptores de IP_3 . La interacción con una molécula señalizadora activa receptores de la membrana plasmática asociado a proteínas G triméricas. La subunidad α de la proteína G se disocia activando a la fosfolipasa C- β , que escinde el fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) en diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3). El IP_3 soluble en el citosol activa receptores de IP_3 en la membrana del RE, que actúan como canal de Ca^{2+} provocando el vaciado transitorio de los depósitos intracelulares.

En el caso de las células musculares, los canales RyR constituyen un sistema muy especializado responsable del vaciado de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} (RS) implicados en el proceso de contracción-relajación muscular (Meissner, 1994). En este caso, los canales de RyR se activan mediante un cambio conformacional de los canales sensibles a voltaje de tipo L (canales sensibles a dihidropiridinas) presentes en la membrana plasmática de la célula muscular y que se activan tras la despolarización de dicha membrana. Una vez activados, cambian su conformación, permiten la entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular e inducen la alteración conformacional del receptor de RyR por interacción directa entre ambos, permitiendo el vaciado del RS y consiguiendo un aumento en la concentración de Ca^{2+} citosólico (Meissner, 1994). En células no musculares, como es el caso de neuronas, se ha descrito que para la apertura de los canales RyR, éstos necesitan ser estimulados por ADP ribosa cíclica (cADPR) (Clapper et al., 1987, Berridge, 1998).

En cuanto a los canales que aumentan los niveles de Ca^{2+} libre intracelular localizados en la membrana plasmática, los más conocidos son los canales de Ca^{2+}

sensibles a voltaje (VOCCs, voltage-operated calcium channels) que se activan por la despolarización de la membrana (Catterall, 1998). Dentro de este grupo de canales se diferencian distintos tipos entre los que destacamos los canales de tipo L, N, P/Q (Antkiewicz-Michaluk, 1999). En neuronas, los canales VOC de tipo L se encuentran localizados principalmente en el soma de la célula en la zona proximal de las dendritas y se consideran los responsables de inducir señales de Ca^{2+} necesarias para la activación de genes (Miljanich and Ramachandran, 1995). Además, los canales VOC de tipo N y P/Q están localizados en las hendiduras sinápticas ya que su función principal es la de provocar cambios localizados en los niveles de Ca^{2+} que sirvan como señal para la liberación de los neurotransmisores (Berridge et al., 2000).

Se han descrito otros canales que son activados por la unión de un agonista al dominio extracelular del canal. Estos canales, denominados ROCs (receptor-operated calcium channels), son estructural y funcionalmente diferentes, siendo particularmente abundantes en células secretoras y terminales nerviosas. Los ROCs más conocidos son los activados por la unión de glutamato, ATP, serotonina y acetilcolina (Cavero and Spedding, 1983).

Otros canales que se activan por la unión ligando-receptor son los canales sensibles a diacilglicerol (DAG) (Hofmann et al., 1999) y ácido araquidónico (Broad et al., 1999, Mignen and Shuttleworth, 2000). Adicionalmente, en algunos tipos de células que responden a una deformación celular se han identificado canales de Ca^{2+} activados mecánicamente (Boitano et al., 1992).

En la membrana plasmática también se ha descrito la presencia de unos canales de Ca^{2+} activados por el vaciado de los depósitos intracelulares, llamados canales sensibles al vaciado de depósitos (SOCs, store-operated calcium channels), responsables del proceso conocido como entrada capacitativa de Ca^{2+} o entrada de Ca^{2+} regulada por depósitos intracelulares (SOCE, store-operated calcium entry) (Putney, 1986). Este proceso fue inicialmente estudiado en una amplia variedad de tipos celulares, principalmente células no excitables (Putney et al., 2001, Berridge, 1995, Parekh and Penner, 1997) y hoy en día se considera que el mecanismo de entrada de Ca^{2+} regulado por depósitos intracelulares (SOCE) es un modulador primario de la dinámica intracelular del ion Ca^{2+} . Posteriormente, se ha mostrado que SOCE desempeña un papel fisiológico importante en células excitables y se ha demostrado la existencia de dicho proceso en neuronas (Putney, 2003).

1.2. Mecanismos que restauran los niveles basales de Ca^{2+} intracelular.

Una vez que el Ca^{2+} ha desempeñado su función, éste es rápidamente eliminado del citosol hasta volver a los niveles de Ca^{2+} libre en reposo. Los principales mecanismos de restauración de la concentración de Ca^{2+} libre intracelular son las bombas de Ca^{2+} (Pozzan et al., 1994), como las Ca^{2+} -ATPasas de la membrana plasmática, que bombean Ca^{2+} desde el citosol al medio extracelular (Gill et al., 1981), y las Ca^{2+} -ATPasas del RE, que transportan Ca^{2+} desde el citosol al interior de dicho orgánulo (Hasselbach, 1964, Ebashi et al., 1969) y es sensible a tapsigargina. Además de estas enzimas, los intercambiadores iónicos de la membrana plasmática, como es el caso del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, desempeñan un importante papel en este proceso extruyendo Ca^{2+} al exterior celular (Blaustein, 1982, Blaustein and Lederer, 1999).

En la mitocondria también actúa otro mecanismo de restauración de los niveles de Ca^{2+} basales, ya que importa Ca^{2+} a su interior a través de un unitransportador de Ca^{2+} presente en la membrana mitocondrial (Budd and Nicholls, 1996, Jouaville et al., 1995, Duchon, 1999). En el aparato de Golgi encontramos la Ca^{2+} -ATPasa de vías secretoras tipo I (SPCA1), insensible a tapsigargina y reguladora de la frecuencia de oscilaciones de Ca^{2+} , como se ha descrito en células HeLa (Van Baelen et al., 2003). Esta Ca^{2+} -ATPasa desempeña un papel clave en el almacenamiento de Ca^{2+} en tejidos tan dispares como cerebro, aorta y testículos (Wootton et al., 2004). Además su ausencia conlleva alteraciones en el tráfico vesicular y puede ocasionar el fraccionamiento del aparato de Golgi (Micaroni et al., 2010). Por otra parte, su elevada presencia en cerebelo sugiere que contribuye potencialmente junto con la SERCA y PMCA a la regulación de los niveles de Ca^{2+} encargados del control de neurotransmisión en estas áreas con alta concentración de sinapsis (Sepulveda et al., 2005, Sepulveda et al., 2007).

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

2.1. Principios del mecanismo.

Las bases moleculares de este proceso se identificaron gracias a experimentos basados en el estudio de fotorreceptores de *Drosophila melanogaster*, en los cuales se observó un proceso de entrada de Ca^{2+} con propiedades similares a las asociadas con SOCE (Selinger et al., 1993, Hardie and Minke, 1993). Mediante estudios de biología molecular en *Drosophila* se comprobó que aquellas estirpes mutadas en genes *trp* (Transient Receptor Potential) presentaban deficiencias en la entrada de Ca^{2+} activada por estimulación luminosa (Phillips et al., 1992, Montell and Rubin, 1989, Wong et al.,



1989). Al mismo tiempo se ha observado que la expresión de algunos miembros de la familia de proteínas TRP en diferentes sistemas producen corrientes de Ca^{2+} cuando se induce el vaciado de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} mediante la inhibición de las Ca^{2+} -ATPasas de RE por tapsigargina (Tg). Ambos resultados sugieren que las proteínas TRP intervienen en la entrada rápida de Ca^{2+} desde el exterior celular activada por el vaciado de los depósitos intracelulares, es decir, que estas proteínas intervienen en SOCE (Petersen et al., 1995, Vaca et al., 1994). Sin embargo, hace una década se identificó a la proteína ORAI1 (también conocida como CRACM1) como el principal regulador de SOCE. ORAI1 es una proteína de membrana plasmática con cuatro dominios transmembranales que constituyen el canal CRAC (corriente de Ca^{2+} activada por liberación de Ca^{2+}) (Vig et al., 2006, Feske et al., 2006, Soboloff et al., 2006, Zhang et al., 2006) necesario tanto para activar SOCE como para activar la corriente I_{CRAC} , una corriente de Ca^{2+} muy selectiva a este ion y que no se encuentra influenciada por el potencial de membrana plasmática.

De forma previa al descubrimiento de la proteína ORAI1, se propuso a la proteína STIM1 (stromal interaction molecule 1) como un regulador clave en el mecanismo SOCE (Liou et al., 2005, Roos et al., 2005). Se ha demostrado que el vaciado de los depósitos intracelulares induce la oligomerización de STIM1 (Muik et al., 2008, Wu et al., 2006) y que posteriormente, se produce la relocalización de STIM1 en forma de agregados a regiones del RE que distan 10-25 nm de la membrana plasmática (yuxtaposiciones RE-MP), induciendo la apertura de canales SOC localizados en la MP (Wu et al., 2006). Además, se conoce que la oligomerización de STIM1 es el evento clave en su relocalización, pues permite de esta forma la activación y apertura de los canales de Ca^{2+} de membrana plasmática activados por depósitos intracelulares (Luik et al., 2008), hecho que culmina con la entrada de Ca^{2+} al interior celular.

2.2. Proteínas STIM.

En humanos hay dos genes que codifican para proteínas STIM: *STIM1* y *STIM2*. El gen *STIM1* presenta 3 variantes transcripcionales conocidas que generan las proteínas STIM1 (canónica), STIM1L (isoforma más larga), y STIM1S (la isoforma más corta). Para el gen *STIM2*, también se han descrito 3 variantes transcripcionales que codifican para las proteínas STIM2, STIM2.1 (o STIM2-beta), y STIM2.2 (o STIM2-alfa). En la Tabla I se reflejan los códigos de acceso a las secuencias de los genes y variantes transcripcionales de las proteínas STIM.

Gene	Transcript(s)	Protein	Protein official name*
ENSG00000167323	NM_001277961.1	NP_001264890.1	STIM1 isoform 1, or STIM1L
	NM_003156.3	NP_003147.2	STIM1 isoform 2 (canonical)
	NM_001277962.1	NP_001264891.1	STIM1 isoform 3, or STIMS
ENSG00000109689	NM_001169117.1	NP_001162588.1	STIM2 isoform 3
	NM_001169118.1	NP_001162589.1	STIM2.1, STIM2 β
	NM_020860.3	NP_065911.3	STIM2.2, STIM2 α

Tabla I. Códigos de acceso para los genes y secuencias de referencia para las variantes transcripcionales de STIM1 y STIM2. Tabla adaptada de (Martin-Romero et al., 2018).

Como se ha indicado anteriormente, la proteína STIM1 es un regulador positivo de SOCE (Roos et al., 2005, Zhang et al., 2005) y presenta una constante de disociación aparente (Kd) por Ca²⁺ de 250 μ M (Stathopoulos et al., 2006), de modo que descensos en la concentración de Ca²⁺ intraluminal por debajo de esta Kd son detectados por STIM1. STIM2 comparte más de un 60% de identidad con la secuencia de STIM1 y también detecta cambios en la concentración de Ca²⁺ intraluminal, pero con diferente sensibilidad ya que la constante de disociación para STIM2 es de \sim 500 μ M, unas 2 veces superior a la presentada por STIM1 (Zheng et al., 2008), es decir que STIM2 presenta una menor afinidad por Ca²⁺ y actúa principalmente como regulador de la concentración de Ca²⁺ en situaciones de reposo, mientras que STIM1 activa la entrada de Ca²⁺ en condiciones más severas apareciendo en mayor proporción en las yuxtaposiciones RE-MP en comparación con STIM2 (Brandman et al., 2007).

2.3. STIM1: estructura, localización y mecanismo de acción.

2.3.1. Dominios funcionales de la proteína STIM1.

STIM1 es una proteína de un sólo segmento transmembranal que presenta una construcción modular (Roos et al., 2005), con una secuencia primaria polipeptídica de 685 aminoácidos (Figura 2). Esta proteína presenta su extremo N-terminal hacia el lumen del RE, donde se encuentran el dominio EF y el dominio SAM (*sterile alpha motif*). Las proteínas que contienen el dominio EF pueden agruparse en dos categorías funcionales: estructurales y reguladoras. La unión del ion Ca²⁺ al dominio EF con función reguladora induce un cambio conformacional en la proteína que es comunicado a otras proteínas dianas. Sin embargo, cuando se produce la unión de Ca²⁺ a un dominio EF con función estructural no se induce un cambio conformacional significativo en la proteína, funcionando el dominio EF en este caso como tamponador de los niveles de Ca²⁺. En el

caso concreto de STIM1, el dominio EF es un dominio regulador pues está relacionado con la oligomerización de la proteína tras la depleción de los niveles de Ca^{2+} en el lumen del RE (Luik et al., 2006, Roos et al., 2005).

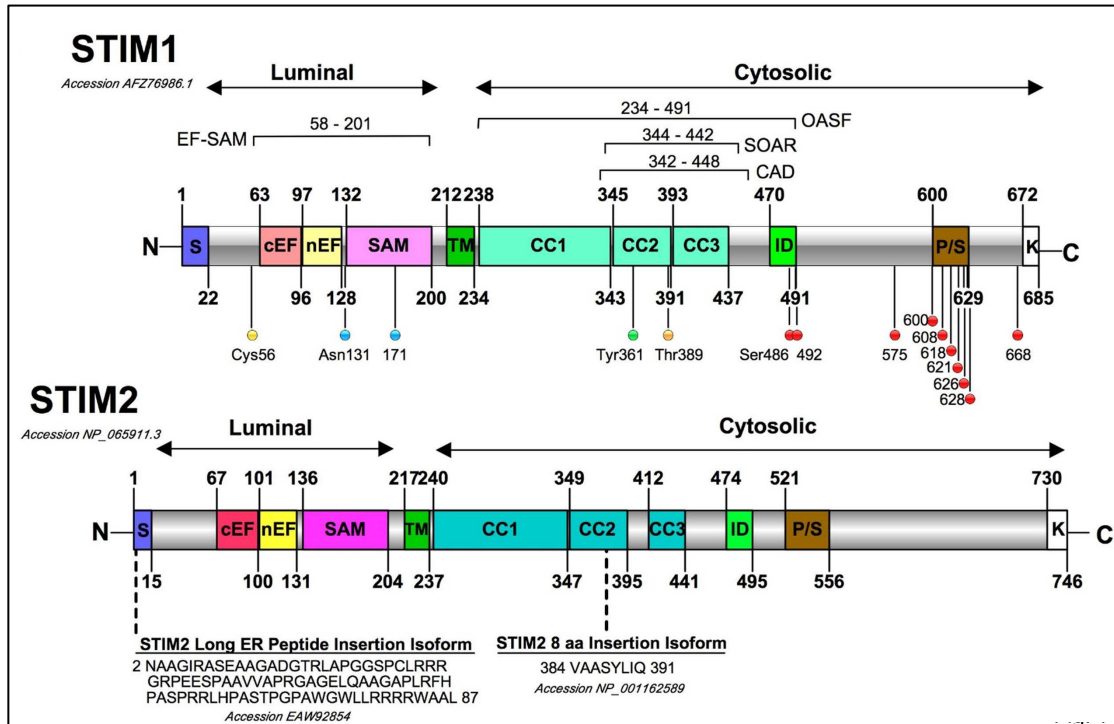


Figura 2. Distribución de dominios de las proteínas STIM1 y STIM2. En ambos paneles se observa el dominio luminal del RE (extremo N-terminal) y el dominio citosólico (extremo C-terminal). En el espacio luminal, ambas proteínas presentan los dominios EF y el dominio SAM. A continuación, se encuentra el dominio transmembrana (TM). En el dominio citosólico se encuentran los dominios CC (que constituyen el dominio SOAR de unión a ORAI1), además del dominio polibásico rico en prolina y serina (P/S). Figura extraída de (Novello et al., 2018).

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

La porción citosólica de STIM1 incluye dos dominios coiled-coil (CC), una región rica en prolinas y serinas, y una región rica en lisinas. El dominio coiled-coil está formado

por dos estructuras en alfa hélice que se encuentran cercanas a la zona transmembranal. Los dominios CC pueden interactuar entre sí formando homo-oligómeros o hetero-oligómeros. En esta región aparece un segmento de unos 100 aminoácidos que se unen directamente a ORAI1 para activar el canal de Ca^{2+} y que ha sido denominado CAD (*CRAC activation domain*) o SOAR (*STIM1-ORAI1 activation region*) (Park et al., 2009, Yuan et al., 2009).

En las regiones más cercanas al extremo C-terminal encontramos una región rica en residuos de prolina que incluye además múltiples residuos de serina (Williams et al., 2001) y próxima a esta región, una secuencia corta de cuatro aminoácidos que interacciona con la proteína de unión a microtúbulos EB1 (Grigoriev et al., 2008). Por último, en la región más próxima al extremo carboxilo terminal, se encuentra una región rica en lisinas que es crítica para la activación de canales de Ca^{2+} diferentes a ORAI1, como los TRPCs (Zeng et al., 2008).

2.3.2. Localización celular de STIM1.

Como se ha descrito antes, STIM1 es una proteína transmembranal tipo I localizada principalmente en el RE, donde desempeña su función fundamental de sensor de Ca^{2+} . Sin embargo, mediante experimentos de biotilación se ha detectado la presencia de STIM1 en la superficie celular (Manji et al., 2000, Spassova et al., 2006) en cantidades que no exceden del 20% del total de la proteína. Posteriormente, se describió mediante microscopía TIRF que STIM1 se aproxima a la membrana plasmática tras la depleción de los depósitos intracelulares por el tratamiento con tapsigargina, como resultado de la interacción directa de túbulos del RE que contienen STIM1 con dominios de rafts lipídicos (balsas lipídicas) de la membrana plasmática (Alicia et al., 2008).

2.3.3. Mecanismo de acción de STIM1.

El estudio y la caracterización de esta proteína confirma la hipótesis del “acoplamiento conformacional”, que propone que la activación de los canales SOC de la membrana plasmática está regulada por la interacción entre proteínas del RE y componentes proteicos de estos canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática (Berridge, 1995, Irvine, 1990). En estado de reposo, STIM1 se encuentra distribuido uniformemente en la membrana del RE, donde su dominio citosólico se encuentra en un estado conformacional cerrado debido a la interacción intramolecular de los dominios CC1a1 y CC3 (Muik et al., 2011). En su forma inactiva y de reposo, STIM1 es un dímero (Muik et al., 2009), pero tras la disminución de la concentración de Ca^{2+} en el interior del RE, la

disociación del Ca^{2+} del dominio EF se transmite al dominio SAM, lo que conlleva la activación de la proteína que se muestra en un estado conformacional más extendido y formando oligómeros (Liou et al., 2007).

La oligomerización va seguida de la relocalización de STIM1 en yuxtaposiciones discretas de RE-MP (Liou et al., 2007, Muik et al., 2008, Smyth et al., 2008). Este acercamiento que permite que STIM1 interaccione con canales SOC localizados en la membrana plasmática es dirigido por la proteína de unión a microtúbulos EB1 (Chang et al., 2018). En su estado inactivo, STIM1 se encuentra unido a EB1 y presenta gran movilidad en la superficie del RE, pero tras su oligomerización/activación y acercamiento a la membrana plasmática, STIM1 se disocia de EB1 presentando una escasa movilidad.

Por otro lado, estudios realizados por nuestro grupo de investigación con células HEK293 demuestran que la fosforilación de STIM1 en los sitios diana de ERK1/2 es necesaria para la activación de SOCE (Pozo-Guisado et al., 2010). Estos sitios diana Ser575, Ser608, y Ser621 son los únicos residuos de STIM1 para los que se conoce la quinasa responsable de su fosforilación *in vivo*. En este sentido, el mecanismo que conlleva la disociación de STIM1 de EB1 está regulado por la fosforilación de este grupo de serinas adyacentes al sitio de unión de EB1 (Pozo-Guisado et al., 2013). Además, esta modulación por fosforilación es reversible, ya que el rellenado de los depósitos intracelulares induce la defosforilación de estos residuos (Pozo-Guisado et al., 2013), permitiendo de nuevo la unión STIM1-EB1.

En último término, para la activación de la entrada de Ca^{2+} por SOCE se requiere la interacción física STIM1-ORAI1 y dicha interacción está mediada por el dominio CAD previamente nombrado (Park et al., 2009). La estequiometría del complejo STIM1-ORAI1 se encuentra en el centro de debate, aunque actualmente se acepta la propuesta de un ratio 1:1 o 2:1 para estimular la activación del canal (Hoover and Lewis, 2011, Stathopoulos et al., 2013).

2.3.4. Otros componentes implicados en la interacción STIM1-ORAI1.

Tras la activación del influjo de Ca^{2+} , un feedback negativo mediado por Ca^{2+} /calmodulina, controla la entrada excesiva de Ca^{2+} . Este control se lleva a cabo a través de una pequeña región de STIM1 (residuos 470-491) con siete aminoácidos acídicos y próximo al dominio de unión a CAD (Mullins et al., 2009). En ese mismo estudio se identificó otra región de ORAI1 próxima al extremo N-terminal (residuos 68-91) que une calmodulina (CaM) de manera dependiente de Ca^{2+} , apoyando el modelo que sugiere que Ca^{2+} /CaM se une al extremo N-terminal de ORAI1 para desencadenar su inactivación. Además, la Rab GTPasa CRACR2A compite por este sitio de unión en ORAI1 con el

complejo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. Ante bajos niveles de Ca^{2+} intracelular, CRACR2A estimula la unión de STIM1-ORAI1, pero cuando se alcanzan niveles altos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, CRACR2A se disocia de ORAI1 favoreciendo la inhibición de SOCE mediada por $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (Srikanth et al., 2010).

Otro regulador positivo de SOCE es la proteína STIMATE, la cual se encuentra en el RE y es codificada por el gen TMEM110 (Jing et al., 2015). Cuando el Ca^{2+} se disocia del dominio EF de STIM1, el cambio conformacional a una estructura más extendida de STIM1 facilita la unión entre STIMATE y su dominio CC1. En el contexto opuesto, encontramos a la proteína SARAF que también reside en el RE y que se ha descrito como un regulador negativo de SOCE de manera dependiente de Ca^{2+} (Palty et al., 2012). En este sentido, un dominio inhibitorio conservado en el extremo C-terminal de STIM1 (residuos 448-530) y denominado CTID es el responsable de esta inhibición, ya que facilita el acceso de la proteína SARAF a la región SOAR o CAD, inhibiendo SOCE.

Otros reguladores adicionales del complejo STIM1-ORAI1 son las septinas (Sharma et al., 2013), RASSF4 (Chen et al., 2017) y cortactina (Lopez-Guerrero et al., 2017b). Estas proteínas favorecen el acercamiento de la proteína STIM1 a los parches de membrana plasmática, donde STIM1 se une a ORAI1 y permite la activación de SOCE.

3. CANALES OPERADOS POR VOLTAJE EN LA SEÑALIZACIÓN POR Ca^{2+} .

Como su propio nombre indica, los canales operados por voltaje (VOCs) permiten la entrada de Ca^{2+} al citosol tras producirse un cambio en el potencial de membrana plasmática. En general, estos canales están cerrados cuando la membrana está hiperpolarizada y se activan tras la despolarización de la misma. La función esencial de estos canales es la transducción de los cambios de potencial de membrana en señales transitorias de Ca^{2+} intracelular que desencadenan multitud de procesos fisiológicos (Berridge, 2014).

Así, en células cardíacas y de músculo liso, la activación de estos canales de Ca^{2+} inicia la contracción de forma directa por el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y de forma indirecta por la activación de los canales de rianodina sensibles a Ca^{2+} del retículo sarcoendoplasmático (Reuter, 1979, Tsien, 1983, Bers, 2002). En células del músculo esquelético, los canales de Ca^{2+} operados por voltaje situados en los túbulos transversales de las membranas interaccionan directamente con el receptor de rianodina tipo I (RYR1), desencadenando la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoendoplásmico e iniciando la contracción rápida (Catterall, 1991, Tanabe et al., 1993). Estos mismos canales median una lenta conductancia de Ca^{2+} lo cual incrementa su concentración citosólica y permite regular la fuerza de contracción en respuesta a impulsos nerviosos

repetitivos (Catterall, 1991). En las células endocrinas, los VOCs median la entrada de Ca^{2+} permitiendo la secreción de hormonas (Yang and Berggren, 2006). Por otro lado, en las células neuronales estos son los canales responsables del inicio de la transmisión sináptica (Tsien et al., 1988, Dunlap et al., 1995, Catterall and Few, 2008). Además, en muchos tipos celulares esta entrada de Ca^{2+} al citosol a través de los VOCs regula no solo diferentes actividades enzimáticas sino que también se ve regulada la expresión génica (Flavell and Greenberg, 2008).

3.1. Clasificación de los canales de Ca^{2+} operados por voltaje (VOCs).

Generalmente los canales de Ca^{2+} operados por voltaje se dividen en tres familias: Ca_v1 , Ca_v2 y Ca_v3 . La familia Ca_v1 comprende a los denominados canales tipo L, que generan corrientes de Ca^{2+} de larga duración, características en células del músculo esquelético, cardíacas, neuronales y endocrinas. La familia Ca_v2 comprende a los canales tipo N, P/Q y R, que se localizan principalmente en el sistema nervioso y están involucrados en la transmisión sináptica. La familia Ca_v3 la constituyen los canales tipo T, que se caracterizan por cinéticas de Ca^{2+} más transitorias que las producidas por los canales tipo L. Los canales de tipo T generan corrientes que regulan funciones esenciales en el nódulo sinoatrial, además de intervenir en el control de la secreción en las células adrenales, la ritmicidad neuronal, la reacción acrosómica espermática y la proliferación celular (Berridge, 2014).

Todos estos canales presentan una cierta similitud estructural al ser todos ellos canales formados por un complejo multimérico donde el principal componente es el poro formado por la subunidad α_1 , que es codificada por 10 genes distintos, lo que permite generar diferentes isoformas, cada una asociada específicamente a uno de los diez canales operados por voltaje que se conocen (ver Tabla II). Además, esta subunidad α_1 se asocia a otras subunidades (α_2 , β , δ , γ) lo que también confiere una diversidad estructural y funcional a los distintos tipos de canales. Así, por ejemplo, la subunidad γ parece estar asociada predominantemente con los canales tipo L.

Aparte de sus propiedades moleculares, la mejor forma de distinguir estos canales es usar el criterio farmacológico, ya que algunos de ellos son muy sensibles a ciertas toxinas y fármacos. Esta sensibilidad específica presente en algunos VOCs refleja el hecho de la alta variabilidad estructural de estos canales al estar constituidos por diferentes subunidades moleculares (Berridge, 2014). La Tabla II recoge las diferentes familias y subtipos de canales de Ca^{2+} operados por voltaje.

Familia (gen)	Tipo de corriente	Isoforma α_1	Farmacología	Distribución
Cav1				
Cav1.1(CACNA1S)	L	α_{1S}	Dihidropiridina	Músculo esquelético y SNC
Cav1.2(CACNA1C)	L	α_{1C}	Dihidropiridina	Corazón, SNC y células endocrinas
Cav1.3(CACNA1D)	L	α_{1D}	Dihidropiridina	SNC células endocrinas
Cav1.4(CACNA1F)	L	α_{1F}	–	Retina
Cav2				
Cav2.1(CACNA1A)	P/Q	α_{1A}	ω -Agatoxina	SNC
Cav2.2(CACNA1B)	N	α_{1B}	ω -Conotoxina	Unión neuromuscular SNC
Cav2.3(CACNA1E)	R	α_{1E}	SNX-482	Unión neuromuscular SNC
Cav3				
Cav3.1(CACNA1G)	T	α_{1G}	Kurotoxina	SNC, corazón y músculo liso
Cav3.2(CACNA1H)	T	α_{1H}	Kurotoxina Mibefradil	SNC, corazón, hígado, riñón, zona glomerulosa
Cav3.3(CACNA1I)	T	α_{1L}	–	SNC

Tabla II. Clasificación de los distintos canales de Ca^{2+} operados por voltaje. Esta clasificación se hace en función de su familia, gen, tipo de corriente, tipo de subunidad α_1 , toxina/fármaco antagonista y distribución tisular. (*SNC: Sistema Nervioso Central). Tabla adaptada de (Berridge, 2014).

3.2. Familia de canales de Ca^{2+} operados por voltaje tipo L: canal $\text{Ca}_v1.2$.

Como se ha citado anteriormente, esta familia de canales se expresa ampliamente en células musculares, endocrinas y nerviosas. Una de las propiedades más importantes de estos canales es que son de lenta inactivación, es decir, mantienen la respuesta ante una despolarización sostenida o repetitiva. Por ello desempeñan un papel esencial en procesos como la contracción muscular, la secreción hormonal y la activación génica, en los que se requieren señales mantenidas de Ca^{2+} durante largos períodos de tiempo.

Los canales tipo L son activados con una despolarización de -30 mV, y una vez activados, estos canales muestran una alta conductancia (~25 pS), transportando ~1000 Ca^{2+} /ms. Dentro de esta familia de canales tipo L podemos diferenciar 4 tipos de canales codificados por distintas subunidades α_1 , presentando diferentes funciones y distribución tisular como se describe en la Tabla II.

Los canales tipo L $Ca_v1.2$ se localizan en el corazón, el músculo liso y las neuronas. A diferencia de los canales $Ca_v1.1$ que pertenecen a la misma familia y actúan en el músculo esquelético mediante un acoplamiento directo al receptor de rianodina tipo 1 (RYR1), la función de los canales $Ca_v1.2$ es permitir la entrada de Ca^{2+} que active diferentes rutas de señalización dependientes de Ca^{2+} . En las células del corazón, estos canales $Ca_v1.2$ juegan un papel central en el proceso de excitación-contracción al generar el breve pulso de Ca^{2+} requerido para la activación de los receptores de rianodina tipo 2 (RYR2) a través de un proceso denominado liberación de Ca^{2+} activado por Ca^{2+} (CICR, Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release).

Dada la relevancia de estos canales, una mutación de ganancia de función en el gen *CACNA1C* que codifica para la subunidad α_{1C} de $Ca_v1.2$, causa el síndrome de Timothy, que es una enfermedad multisensorial caracterizada por arritmias cardíacas, alteraciones en el desarrollo, deficiencia inmune y alteraciones en el comportamiento que lo asemejan al autismo. Además, *CACNA1C* es un gen asociado a la esquizofrenia y se ha vinculado con el desorden bipolar y otras alteraciones psiquiátricas.

3.3. Interacción STIM1- $Ca_v1.2$ en la regulación de la entrada de Ca^{2+} .

La entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular a través de canales SOC como ORAI1 y canales operados por voltaje como $Ca_v1.2$ es esencial para el desarrollo de muchos procesos celulares, pero la transducción de las señales de Ca^{2+} producidas por estos canales requiere de una modulación coordinada y, en este aspecto, la proteína STIM1 lleva a cabo un control recíproco de ambos canales (Park et al., 2010, Wang et al., 2010).

Ya hemos descrito que STIM1 es el principal activador de canales SOC tras el vaciado de depósitos intracelulares de Ca^{2+} como el RE, gracias a la interacción del dominio SOAR de STIM1 con ORAI1. Por medio de esta misma región (SOAR) STIM1 se une al extremo C-terminal del canal $Ca_v1.2$ inhibiéndolo de forma directa y potenciando además la internalización de este canal desde la membrana (Figura 3). Hasta ahora se desconoce si ORAI1 y $Ca_v1.2$ interaccionan de algún modo, pero sí parece estar claro el papel que desempeña STIM1 como agonista y antagonista en la regulación de la entrada de Ca^{2+} extracelular mediante este control coordinado de ambos canales (Park et al., 2010).

No obstante, esta no es la única interacción de STIM1 con canales VOC, ya que en cardiomiocitos, concretamente en células HL-1, se ha observado que la proteína STIM1 inhibe directamente al canal de tipo T $Ca_v3.1$ y reduce su expresión en la superficie de las células (Nguyen et al., 2013).

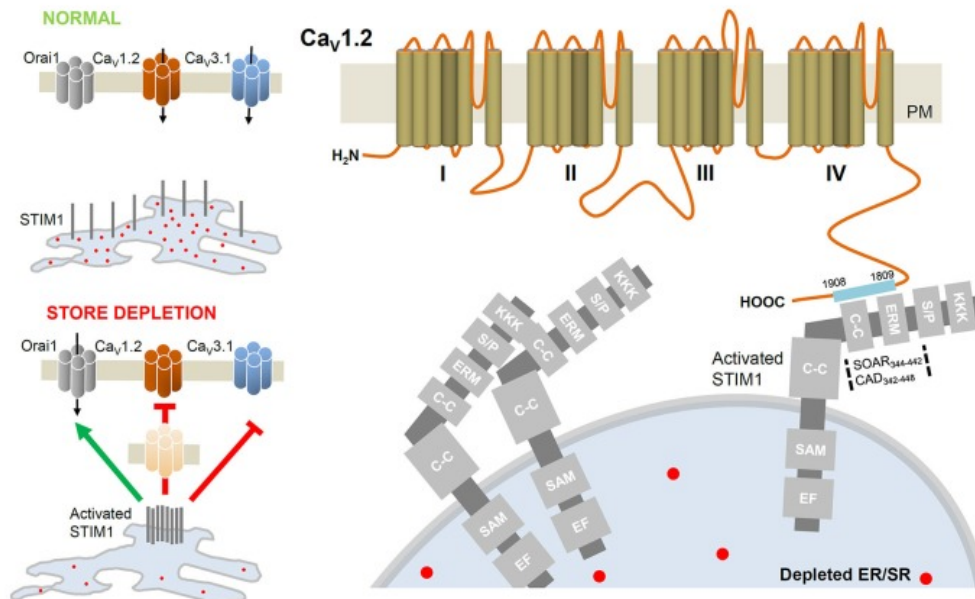


Figura 3. Regulación coordinada de los canales ORAI1 y Cav1.2. Panel izquierdo: modulación de la proteína STIM1 en condiciones basales (Ca^{2+} unido al dominio EF) en las que ORAI1 está inactivo y se permite la entrada de Ca^{2+} por los canales Cav1.2 y Cav1.3. Tras el vaciado del RE, STIM1 se aproxima a la membrana plasmática para activar el canal ORAI1 e inhibir la acción de los canales Cav1.2 y Cav1.3. Panel derecho: esquema de los sitios de interacción de STIM1 y la región C-terminal de Cav1.2. Las regiones CAD (residuos 342-448) o SOAR (344-442) de STIM1 interactúan con la región C-terminal (1809-1908) de Cav1.2. (Harraz and Altier, 2014).

4. LOS RECEPTORES DE IP_3 EN LA MOVILIZACIÓN DEL Ca^{2+} INTRACELULAR.

Los receptores de inositol-1,4,5-trisfosfato (IP_3Rs) constituyen el principal mecanismo de movilización de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares como el RE y su función es clave para la señalización por Ca^{2+} . En la activación de estos canales intervienen dos mensajeros, el IP_3 que genera la fosfolipasa C a partir de PIP_2 (como se indicó en el apartado 1.1 de esta Introducción) y la propia concentración de Ca^{2+} citosólico. Aunque estos receptores se localizan principalmente en la membrana del RE, también se encuentran en otras localizaciones celulares, como en las vesículas secretoras de células neuroendocrinas (Yoo et al., 2000) y en la membrana plasmática (Dellis et al., 2006).

Como hemos mencionado, los principales reguladores de estos receptores son el Ca^{2+} y el IP_3 , que cooperan por un mecanismo complejo y no totalmente descrito, aunque se conoce que la unión de IP_3 al sitio de unión específico de estos receptores provoca un cambio conformacional que facilita la exposición del sitio de unión para Ca^{2+} , siendo la consiguiente unión del Ca^{2+} la que activa el canal y desencadena su apertura. Este control dual de los receptores por IP_3 y Ca^{2+} implica su importancia en múltiples funciones de la

señalización celular. Estos receptores pueden aparecer como homo- o heterotetrámeros y en su estructura diferenciamos 3 regiones principalmente: la región transmembrana (TM) que presenta 6 dominios transmembranales, la región del poro del canal situado entre los dominios TM5 y TM6, y una larga región N-terminal que presenta un dominio de unión a IP_3 en la parte final y que conecta con el dominio TM1 por medio de un dominio regulador. Este último es el encargado de transmitir el cambio conformacional que se produce tras la unión de IP_3 y que permite la unión de Ca^{2+} previa a la apertura del canal. El efecto del Ca^{2+} como segundo mensajero en estos receptores es bimodal, ya que es estimulador frente a bajos niveles de Ca^{2+} pero es inhibidor a concentraciones superiores a 300 nM (Berridge, 2014).

Se conocen 3 isoformas de receptores de IP_3 : IP_3R1 , IP_3R2 e IP_3R3 , codificadas por distintos genes (*ITPR1*, *ITPR2* e *ITPR3*), y que aunque presentan similitud en la estructura y propiedades, muestran diferentes funciones en la señalización celular y se expresan en distinto grado en diferentes tipos celulares (Foskett et al., 2007). Las tres isoformas tienen capacidad de unión a IP_3 pero con diferente afinidad ($IP_3R2 > IP_3R1 > IP_3R3$), con una diferencia de más de 10 veces entre IP_3R2 e IP_3R3 . El responsable de esta diferencia de afinidad es el dominio supresor, ya que los centros de unión de las tres isoformas presentan la misma afinidad por IP_3 (Iwai et al., 2007). Por otro lado, las tres isoformas difieren en la cinética generada por el Ca^{2+} transportado y esta variabilidad está influenciada por moduladores endógenos como el IP_3 , el ATP y el propio Ca^{2+} . Así, el IP_3R1 se caracteriza por oscilaciones de Ca^{2+} rápidas y puntuales, mientras que la activación del IP_3R2 genera oscilaciones de Ca^{2+} más robustas y duraderas. El IP_3R3 no genera oscilaciones y se caracteriza por generar una única y sostenida señalización transitoria de Ca^{2+} (Miyakawa et al., 1999). Aunque las tres isoformas se distribuyen ampliamente por todos los tejidos, cabe destacar su mayor expresión en el cerebelo, en especial la isoforma IP_3R1 en el soma de las células de Purkinje. Esta isoforma se concentra también en las neuronas de la región CA1 del hipocampo, en el núcleo caudado, el putamen y la corteza cerebral (Matsumoto et al., 1996).

Por último, se debe reseñar que en la activación de los receptores de IP_3 además del propio IP_3 y el Ca^{2+} , pueden intervenir un gran número de reguladores fisiológicos y farmacológicos, tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional, así como una modulación por fosforilación, un evento complejo, ya que los efectos de esta fosforilación pueden resultar tanto en incrementos como descensos de la tasa de liberación de Ca^{2+} (Berridge, 2014).

5. EL PAPEL DE LA MITOCONDRIA EN LA SEÑALIZACIÓN POR Ca^{2+} .

En la señalización y movilización del Ca^{2+} intracelular algunos orgánulos subcelulares desempeñan una función fundamental actuando como reservorios de este ion y manteniendo unos niveles adecuados de Ca^{2+} citosólico, necesarios para la supervivencia celular. En este aspecto, el retículo endoplasmático (RE), por ser el principal reservorio de Ca^{2+} intracelular, y la mitocondria, por su estrecha relación con el RE en el tamponamiento de Ca^{2+} , son los dos orgánulos más importantes. En estado de reposo la $[\text{Ca}^{2+}]$ en el RE es $\sim 600 \mu\text{M}$ mientras que en la mitocondria es de $0.2 \mu\text{M}$, pero tras la activación de los canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática los niveles de Ca^{2+} mitocondrial se pueden incrementar hasta $10 \mu\text{M}$ en células excitables como las neuronas (Rizzuto and Pozzan, 2006). En la mitocondria encontramos principalmente dos transportadores de Ca^{2+} : el uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (MCU), un canal de Ca^{2+} activado por Ca^{2+} responsable de la captación de Ca^{2+} mitocondrial (De Stefani et al., 2011, Baughman et al., 2011) y el intercambiador mitocondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCLX), que media la salida de Ca^{2+} desde la mitocondria en un intercambio con Na^+ (Palty et al., 2010). Dado que la concentración de Ca^{2+} dentro de la matriz mitocondrial es muy próxima a la del citosol (100 nM), no existe un gradiente electroquímico para el transporte de Ca^{2+} . Sin embargo, la fosforilación oxidativa que se produce en la mitocondria y la consiguiente exportación de H^+ genera un importante potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$ de -180 mV) que provoca un incremento de la concentración de Ca^{2+} libre citosólico suficientemente largo y mantenido para activar el transportador MCU y favorecer así la captación de Ca^{2+} mitocondrial, pudiendo alcanzar por momentos una concentración de Ca^{2+} en el intervalo micromolar (Montero et al., 2000).

Por otro lado, la modulación por Ca^{2+} es clave en la respiración mitocondrial, ya que enzimas como la piruvato deshidrogenasa, la NAD^+ -isocitrato deshidrogenasa o la α -cetoglutarato deshidrogenasa, implicadas en el ciclo de Krebs, requieren Ca^{2+} para su activación (Denton, 2009). Además, la concentración de Ca^{2+} mitocondrial regula procesos como el intercambio ATP/ADP, el intercambio ATP/ P_i y la fosforilación de ADP por F_0/F_1 ATPasa (Tarasov et al., 2012). Finalmente, las mitocondrias pueden actuar como reguladores de las señales de Ca^{2+} citosólicas como se ha observado en linfocitos T, dónde no sólo actúan de tamponadoras frente al exceso de Ca^{2+} sino que modulan el ratio de la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos intracelulares o SOCE (Hoth et al., 2000). En este sentido, se ha observado que la captación de Ca^{2+} mitocondrial tras la activación de MCU es crítica para la activación de SOCE dependiente de STIM1-ORAI1 (Naghdi et al., 2010) al mantener las oscilaciones de Ca^{2+} citosólicas actuando como reservorio intracelular. Otro aspecto crítico en la modulación de SOCE por parte de la

mitocondria es la actividad del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, ya que un fallo en la extrusión de Ca^{2+} mitocondrial por parte de este transportador, favorece la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) que pueden oxidar la cisteína 195 de ORAI1 (C195) motivando la inactivación del canal (Figura 4) y por tanto, la inactivación de SOCE (Ben-Kasus Nissim et al., 2017).

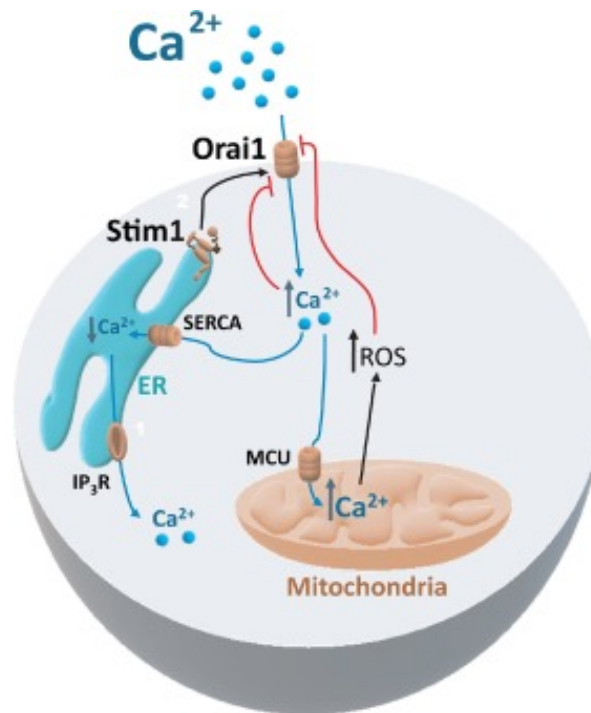


Figura 4. Control mitocondrial de la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos intracelulares.

La captación de Ca^{2+} mitocondrial por el transportador MCU y la extrusión de dicho Ca^{2+} por intercambio con Na^+ favorecen que tras el vaciado de los depósitos intracelulares STIM1 interaccione con ORAI1 y active la entrada de Ca^{2+} a través de SOCE. Sin embargo, esta entrada de Ca^{2+} se ve limitada cuando un exceso de captación de Ca^{2+} mitocondrial y un fallo en su extrusión por NCLX favorece la generación de ROS y la oxidación de la cisteína 195 de ORAI1 inactivando el canal (Villalobos et al., 2018).

Por otro lado, la interacción entre el RE y las membranas mitocondriales, que viene definida por una distancia entre orgánulos inferior a 30 nm, se encuentra involucrada en numerosos procesos fisiológicos, como la síntesis de lípidos, el tamponamiento o transferencia de Ca^{2+} por acoplamiento RE-mitocondria, la formación de autofagosomas, entre otros (Lombardi and Elrod, 2017). De todos ellos, la transferencia de Ca^{2+} o tamponamiento entre el RE y la mitocondria se considera la función más relevante por la importancia del Ca^{2+} en la señalización celular. Se estima que la liberación de Ca^{2+} desde el RE incrementa la concentración de Ca^{2+} local en las regiones de interacción RE-

mitocondria en más de 20 veces en comparación con el resto del citosol (Csordás et al., 1999).

Se han propuesto tres funciones fisiológicas diferentes en base a la transferencia de Ca^{2+} desde el RE a la mitocondria: 1) en la matriz mitocondrial se encuentran enzimas dependientes de Ca^{2+} que podrían requerir el Ca^{2+} captado por la mitocondria para su activación; 2) un exceso de Ca^{2+} en el citosol es considerado tóxico, por ejemplo tras la activación del receptor de IP_3 la mitocondria puede captar Ca^{2+} y actuar como tamponador evitando el exceso de Ca^{2+} citosólico; 3) un exceso de Ca^{2+} mitocondrial puede actuar como desencadenante de la muerte celular apoptótica debido a la apertura del poro mitocondrial de permeabilidad transitoria (Helle et al., 2013).

Así, la importancia funcional de los microdominios de Ca^{2+} es especialmente evidente en la regulación de la liberación de neurotransmisores durante la sinapsis para una correcta comunicación neuronal (Kwon et al., 2016, Heidelberger et al., 1994). Por ello, estructuras que intervienen en la interacción RE-mitocondria como el complejo proteico PDZD8 en mamíferos, y que es ortólogo al complejo ERMES de levaduras, se consideran de vital importancia para la captación de Ca^{2+} por parte de la mitocondria y la generación de microdominios de Ca^{2+} en las dendritas neuronales (Hirabayashi et al., 2017).

6. SEÑALIZACIÓN POR Ca^{2+} EN LA FUNCIÓN NEURONAL.

Como se ha indicado anteriormente, el ion Ca^{2+} desempeña un papel esencial en multitud de procesos celulares entre los que se incluyen la transmisión sináptica, la liberación de neurotransmisores y la señalización requerida para la generación del aprendizaje y la memoria. La desregulación del flujo de Ca^{2+} ha sido descrito como principal responsable en muchas enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas (Mukherjee and Brooks, 2014). Se encuentra aceptado que estas enfermedades pueden deberse principalmente a dos alteraciones o cambios en las vías de señalización por Ca^{2+} : (1) algunas enfermedades se han vinculado a mutaciones en componentes específicos de la señalización por Ca^{2+} , y (2) de forma alternativa se ha mostrado que hay cambios en la función neuronal que son causados por alteraciones fenotípicas que traen consigo un remodelado del sistema de señalización por Ca^{2+} .



6.1. STIM1 y SOCE en la función neuronal.

La proteína STIM1 se distribuye y expresa ampliamente en el cerebro. Además, es conocido que, al igual que ocurre en otros tipos celulares y tejidos, en el tejido cerebral STIM1 se activa tras el vaciado de depósitos intracelulares de Ca^{2+} (Klejman et al., 2009, Skibinska-Kijek et al., 2009). La primera relación de STIM1 con la función neuronal se propuso para neuronas de *Drosophila melanogaster*, y tras la descripción de esta proteína como el principal regulador de SOCE, se corroboró que STIM1 era requerido para el desarrollo de un vuelo normal y estaba asociado con los patrones de activación rítmica en motoneuronas que controlan el vuelo (Venkiteswaran and Hasan, 2009). Además, se estableció que SOCE regula la movilización espacial y temporal de Ca^{2+} en los conos fotoreceptores de vertebrados, sugiriendo un papel en la generación de señales excitatorias en la retina (Szikra et al., 2009).

Por otro lado, se conoce que el receptor metabotrópico de glutamato tipo 1 (mGluR1) es uno de los receptores más abundantes en el sistema nervioso de mamíferos, siendo especialmente abundante en las neuronas de Purkinje de la corteza del cerebelo (Lein et al., 2007). Estudios realizados en ratones demuestran que STIM1 es esencial en el llenado de los depósitos de Ca^{2+} y en la transmisión sináptica dependiente de mGluR1 de neuronas de Purkinje en reposo. Así, la delección del gen *Stim1* en estas neuronas impide la transmisión sináptica dependiente de mGluR1 (Hartmann et al., 2014a). En este mismo trabajo se estableció que STIM1 es el enlace clave entre los receptores mGluR1 y TPRC3, jugando un papel esencial en el control de la señalización por Ca^{2+} y en la transmisión sináptica (Hartmann et al., 2014a).

6.2. Desregulación de la homeostasis del Ca^{2+} y neurodegeneración.

6.2.1. La hipótesis del Ca^{2+} en la enfermedad de Alzheimer.

En 1907, el psiquiatra alemán Alois Alzheimer describió una enfermedad, que a posteriori llevaría su nombre, a partir de una paciente de 51 años con demencia presenil que mostraba atrofia cortical difusa, pérdida de células nerviosas, placas seniles y ovillos neurofibrilares (Alzheimer et al., 1995). En la actualidad, los pacientes de esta enfermedad se clasifican en tres grupos: Alzheimer de origen temprano (representa sobre un 5% de todos los pacientes de Alzheimer), de origen tardío o esporádico (la forma más común de la enfermedad), y Alzheimer familiar (FAD, por sus siglas en inglés *familial Alzheimer's disease*, y que corresponde a menos del 1% de los pacientes). El Alzheimer familiar está asociado a genes conocidos, como el gen de la proteína precursora beta-amiloide (APP, acceso OMIM 104760), el gen de la apolipoproteína E (APOE, acceso OMIM 107741), los

genes de las presenilinas 1/2 (PSEN1 y PSEN2, accesos 104311 y 600759) y el gen de la macroglobulina alfa-2 (A2M, acceso 103950). Además, la mayoría de los pacientes con enfermedad de origen temprano pertenecen al grupo de pacientes de Alzheimer familiar. A nivel patológico no hay diferencias significativas entre el Alzheimer esporádico y el familiar, aunque los síntomas progresan más rápidamente en este último grupo de pacientes (Hardy and Selkoe, 2002).

La mayoría de las mutaciones observadas en FAD están relacionadas con un procesamiento anormal del péptido β -amiloide, lo que supone información importante para estudiar y comprender la forma de origen esporádico de la enfermedad. De este modo, la base de la hipótesis del Ca^{2+} para explicar la etiología de la enfermedad de Alzheimer es que un metabolismo amiloide anormal o alterado podría inducir un cambio en la señalización y homeostasis del Ca^{2+} citosólico, lo cual desencadena un incremento de la muerte neuronal (Berridge, 2011). La formación y almacenamiento de memoria durante el día así como su consolidación y borrado por la noche vienen marcadas por dos fases: potenciación a largo plazo o duradera (LTP, por sus siglas en inglés *long-term potentiation*) y depresión a largo plazo o duradera (LTD, *long-term depression*). Las fluctuaciones en los niveles de Ca^{2+} juegan un papel clave en la consolidación de estas fases, al regular el almacenamiento de la información y su borrado, siendo ambas figuras esenciales en un desarrollo cognitivo normal. Por ello, es factible que la desregulación de la señalización mediada por Ca^{2+} provocada por una alteración del metabolismo amiloide potencie mecanismos de borrado de memoria y estimulación progresiva de la pérdida de la misma (Berridge, 2010).

En modelos animales para estudiar la enfermedad de Alzheimer se ha observado que la alteración de las vías neuronales de señalización por Ca^{2+} provocan un incremento de los niveles Ca^{2+} en estado de reposo. Así, se ha observado que la concentración basal de Ca^{2+} en las espinas y dendritas de neuronas piramidales del neocórtex era mayor en aquellas neuronas más próximas a los depósitos amiloides (Kuchibhotla et al., 2008). De forma similar en ratones 3xTg-AD, que mimetizan las patologías de la enfermedad de Alzheimer humana, se observaron unos niveles basales de Ca^{2+} dos veces superiores a los encontrados en individuos control (Lopez et al., 2008). Como consecuencia de la elevación sostenida de los niveles de Ca^{2+} en estado de reposo, se puede llegar al remodelado de las vías neuronales de señalización por Ca^{2+} como consecuencia de la formación y liberación de péptidos β -amiloides por la vía amiloidogénica (Figura 5).

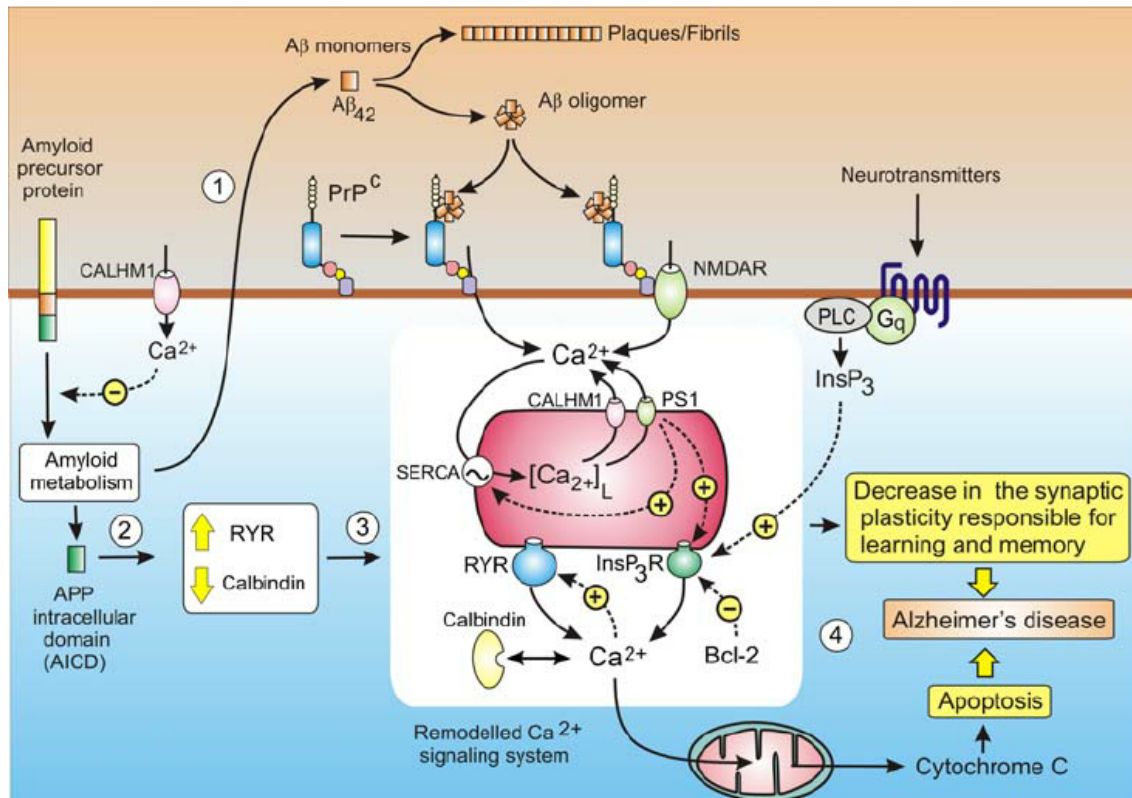


Figura 5. Metabolismo amiloide y remodelado de las vías de señalización por Ca^{2+} . La formación de monómeros β -amiloide ($\text{A}\beta$) puede potenciar la entrada de Ca^{2+} extracelular. Además, la liberación del dominio intracelular de la proteína precursora amiloide (AICD) puede actuar como un factor de transcripción remodelando el sistema de señalización por Ca^{2+} y generando una elevación de Ca^{2+} persistente, que se traduce en un descenso de la plasticidad sináptica y un incremento de la pérdida de memoria característica en la enfermedad de Alzheimer (Berridge, 2010).

Como se observa en la Figura 5, la escisión de la proteína precursora amiloide genera péptidos β -amiloide que se agregan para formar complejos de diferentes tamaños, desde dímeros y oligómeros hasta llegar a otros más complejos como las placas y protofibrillas. Tradicionalmente la investigación se había centrado en la formación de placas amiloideas durante la progresión de la enfermedad de Alzheimer; sin embargo, en los últimos años se ha comprobado que los péptidos pequeños juegan un papel más importante en la disrupción de la señalización por Ca^{2+} y el consiguiente deterioro de la memoria, ya que generan cambios en la entrada y liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares, además de potenciar de forma directa la entrada de Ca^{2+} desde el exterior (Bezprozvanny and Mattson, 2008, Kuchibhotla et al., 2008, Sanz-Blasco et al., 2008).

6.2.2. STIM1 en el daño y muerte celular neuronal.

Debido a su amplia distribución en tejidos neuronales y su importancia en la movilización y señalización por Ca^{2+} , no es sorprendente que las proteínas STIMs tengan una relación directa con funciones cognitivas. Además, la alteración de su expresión ha sido relacionada con diferentes daños neuronales, de modo que en ratones knock-out (KO) con deleciones condicionales de los genes *Stim1* y *Stim2* en el prosencéfalo se observó que la ausencia de la proteína *Stim1* producía un leve retraso en el aprendizaje de la memoria espacial, algo que no se observaba en los ratones *Stim2* KO, pero que se acentuaba en el doble KO de *Stim1/Stim2* (Garcia-Alvarez et al., 2015). Este efecto se explicó basándose en la regulación por fosforilación de (1) la subunidad GluA1 del receptor AMPA, en sitios diana para la proteína quinasa A (PKA), (2) el regulador transcripcional CREB y (3) el canal $\text{Ca}_v1.2$, proponiéndose que la desregulación de la ruta de señalización AMP cíclico/PKA altera la memoria espacial (Garcia-Alvarez et al., 2015). En relación con la propuesta anterior, en el trabajo de (Gruszczynska-Biegala et al., 2016) se establece que en células neuronales la proteína STIM1 puede controlar la entrada de Ca^{2+} activada por AMPA, basándose en la interacción física observada de STIM1 con las subunidades GluA1/GluA2 de estos receptores.

Por otro lado, la sobreexpresión de la proteína STIM1 en neuronas de ratones transgénicos repercutió en una reducción del período de depresión a largo plazo en regiones de hipocampo, así como una reducción de la ansiedad y una mejora en el aprendizaje espacial (Majewski et al., 2017), confirmando el papel de esta proteína en la modulación de la fuerza sináptica y la formación de la memoria. No obstante, también se ha observado en células neuronales del córtex cerebral de ratas que la muerte celular causada por lesión axonal difusa viene precedida por un incremento de expresión de STIM1 (Li et al., 2013), y en este sentido, en un modelo de lesión cerebral traumática que mostraba un significativo incremento de STIM1, el bloqueo de este incremento disminuyó la muerte celular apoptótica al reducir la desregulación de la señalización por Ca^{2+} dependiente del receptor mGluR1 (Hou et al., 2015).

6.2.3. Deficiencia de STIM1 y Alzheimer.

Defectos en la actividad de STIM1, ya sea por su nivel de expresión o por su mecanismo de acción, pueden desencadenar una alteración de la movilización del Ca^{2+} intracelular y una desregulación de la homeostasis del Ca^{2+} , provocando fallos en la función neuronal. En este sentido, un incremento descontrolado de la cantidad de Ca^{2+} liberado desde el RE es otra de las causas que conlleva a una alteración de la señalización por Ca^{2+} que se observa durante la enfermedad de Alzheimer (Supnet and

Bezprozvanny, 2010). Se han observado grandes incrementos en la liberación de Ca^{2+} desencadenada por IP_3 en neuronas de ratones que presentan mutaciones en la presenilina 1 (PSEN1-M146L y PSEN1-A246E) (Stutzmann et al., 2006, Cheung et al., 2008). Además, existen evidencias de que mutaciones en la PSEN1 (PSEN1-M146L) y en la PSEN2 (PSEN2-N141I) favorecen la interacción con el receptor de IP_3 potenciando su sensibilidad (Cheung et al., 2008), y en neuronas corticales de ratón con mutaciones en las presenilinas se incrementa la actividad de los receptores de IP_3 (Cheung et al., 2010). Esta hipersensibilidad en el mecanismo de liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares puede ser ocasionada por la vía amiloidogénica, principal causante del remodelado en la señalización por Ca^{2+} en la enfermedad de Alzheimer (Berridge, 2010) y que puede involucrar diferentes rutas de señalización por Ca^{2+} como se ilustraba en la Figura 5. Como hemos mencionado, los oligómeros solubles $\text{A}\beta$ se consideran moléculas tóxicas ya que se ha observado que la muerte neuronal está precedida por una hiperactivación aberrante de las vías neuronales de señalización por Ca^{2+} por parte de estos oligómeros (Busche and Konnerth, 2016). Así, por ejemplo, en neuronas de hipocampo de ratón se observa una sobrecarga de Ca^{2+} libre intracelular debido a la hiperactivación del receptor mGluR5 por parte oligómeros $\text{A}\beta$ (Zhang et al., 2015).

Con respecto a la proteína STIM1, se conoce que el complejo proteico gamma-secretasa (cuya subunidad catalítica es la presenilina) interacciona con STIM1 en células de neuroblastoma SH-SY5Y, en fibroblastos de piel de pacientes con Alzheimer familiar y en cultivos primarios de neuronas corticales de ratón (Tong et al., 2016). En este mismo estudio se demostró que cultivos de neuronas de hipocampo que expresan la mutación PSEN1-M146L muestran una reducción de las espinas dendríticas junto con una disminución de SOCE. Como los defectos anteriores se suprimieron al sobreexpresar la proteína STIM1 o al inhibir la actividad del complejo gamma-secretasa, los autores hipotetizaron que STIM1 podía constituir un sustrato para el complejo gamma-secretasa (Figura 6). Finalmente, estos investigadores demostraron que el dominio transmembrana de STIM1 presenta un sitio diana para la actividad proteolítica del complejo gamma-secretasa y que la atenuación de SOCE en las neuronas que presentan la mutación PSEN1-M146L podría ser debido a una elevada proteólisis de STIM1 (Tong et al., 2016).

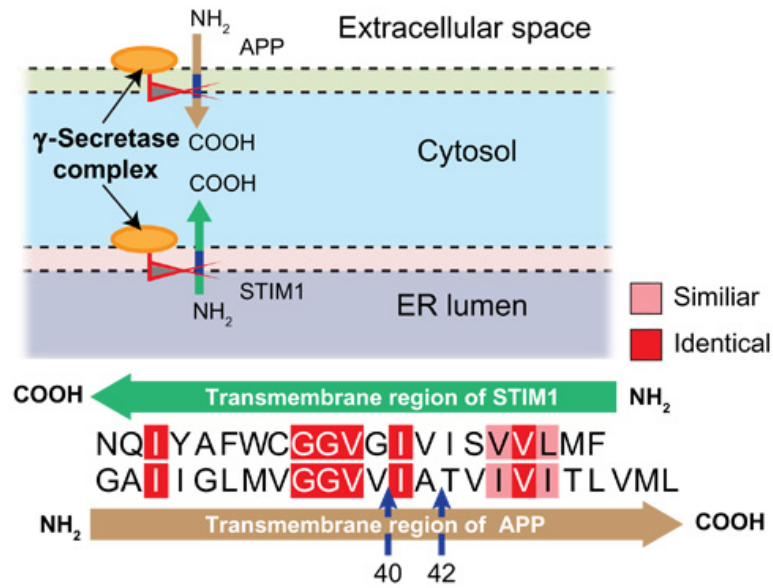


Figura 6. Mutaciones en la PSEN1 ligadas al Alzheimer familiar potencian la degradación de STIM1 por la γ -secretasa. Panel superior: ilustración esquemática de la localización y orientación celular de STIM1 y APP. Panel inferior: alineamiento de secuencias de los dominios transmembrana de STIM1 y APP, indicándose los aminoácidos idénticos (rojo) y similares (rosa), además de los sitios de corte para la formación de A β ₄₀ y A β ₄₂. La orientación de los dominios transmembrana refleja una topología nativa para ambas proteínas (Tong et al., 2016).

Por otro lado, se ha observado que en cultivos prolongados de neuronas de hipocampo, los cuales buscan mimetizar un modelo in vivo de envejecimiento neuronal, se produce una atenuación de SOCE y una menor expresión de las proteínas STIM1 y ORAI1 (Calvo-Rodríguez et al., 2016). Además, se ha observado una reducción en la expresión de STIM2 en linfocitos B de pacientes de Alzheimer familiar (Bojarski et al., 2009) y en neuronas de hipocampo de ratones que expresan la mutación M146V para la PSEN1, en lo que sería un modelo experimental de Alzheimer familiar (Sun et al., 2014). Debido a la depleción de STIM2, la entrada de Ca²⁺ por SOCE mediada por ORAI2/TRPC6 en el soma celular y especialmente en las espinas dendríticas fue sustancialmente atenuada (Zhang et al., 2016, Sun et al., 2014, Zhang et al., 2015). En este sentido, se conoce que STIM2 y la proteína quinasa dependiente de calmodulina CaMKII median la estabilización de las espinas dorsales. Esta disminución en los niveles de STIM2 podría explicar la pérdida de espinas dendríticas, así como defectos en el desarrollo de la memoria y la fase LTP observados en los pacientes de Alzheimer (Sun et al., 2014). La Figura 7 muestra un esquema ilustrativo de algunas alteraciones de las proteínas STIM y la consiguiente atenuación de SOCE dentro de las vías neuronales de señalización por Ca²⁺.

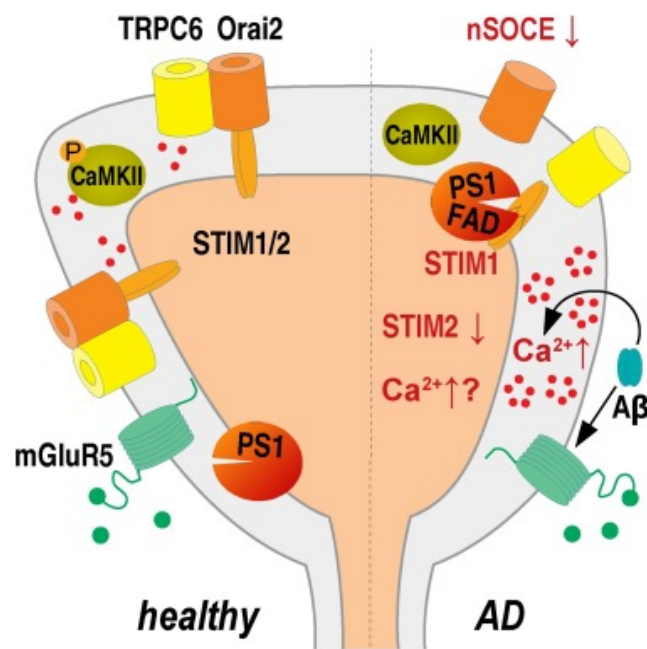


Figura 7. Disminución de SOCE en espinas dendríticas del hipocampo en pacientes de Alzheimer debido a bajos niveles de proteínas STIM funcionales. En la parte derecha de la imagen observamos diversas alteraciones de las proteínas STIM de pacientes de Alzheimer familiar como la reducción de los niveles de STIM2 y la inactivación de STIM1 por corte proteolítico en su región transmembranal. Al mismo tiempo, se muestra que oligómeros A β provocan un incremento en la concentración de Ca $^{2+}$ intracelular debido a la hiperactivación de mGluR5. Además, se produce un descenso de SOCE vía ORAI2/TRPC6 debido a la insuficiente activación de CaMKII lo que provoca la desestabilización de las espinas maduras.

Todos los modelos anteriores se centran en el estudio de los cambios producidos en las dinámicas de Ca $^{2+}$ durante el Alzheimer familiar, existiendo pocos estudios sobre el Alzheimer esporádico que es la forma más común de la enfermedad pero también la más compleja de estudiar mediante ensayos in vitro y clínicos. En este sentido, Jaworska y cols. analizaron la dinámica de Ca $^{2+}$ en cultivos de linfocitos B extraídos de pacientes con Alzheimer esporádico y pacientes con daño cognitivo leve, una condición que frecuentemente precede la diagnosis de la enfermedad de Alzheimer (Jaworska et al., 2013). Estos autores describieron que SOCE se encontraba significativamente potenciado en células procedentes de pacientes con daño cognitivo leve. Sin embargo, no se encontraron cambios en los niveles de SOCE en las células de pacientes con Alzheimer esporádico en comparación con los controles sanos, lo que sugiere que la sobreactivación de la entrada de Ca $^{2+}$ puede ser una característica transitoria de las

células periféricas durante la progresión del daño cognitivo de la enfermedad de Alzheimer.

6.2.4. Sobreactivación de VOCCs y neurodegeneración.

Los VOCCs, especialmente los de tipo L, han sido relacionados con el envejecimiento y la enfermedad de Alzheimer, ya que diversos estudios han reportado que una elevada actividad de estos canales contribuye al deterioro de la eficiencia sináptica (Gant et al., 2006, Landfield, 1994, Thibault et al., 2001). Dado que la señalización por Ca^{2+} se encuentra bien definida temporal y espacialmente, un exceso de entrada de Ca^{2+} por estos canales o un retraso en su aclaramiento desde el citosol, puede conducir a un desbalance entre los períodos de potenciación y depresión a largo plazo (LTP/LTD) y alterar el proceso de almacenamiento y consolidación de la memoria. De este modo, en el hipocampo de pacientes de Alzheimer se han observado mayores niveles de expresión de VOCCs tipo L en comparación con personas sanas (Coon et al., 1999). En este sentido, también se ha reportado una elevada entrada de Ca^{2+} a través de estos canales en neuronas piramidales de la capa CA1 procedentes del hipocampo de ratas envejecidas (Thibault et al., 2001), un efecto que puede distorsionar la plasticidad neuronal.

Uno de los primeros síntomas asociados a pacientes de Alzheimer familiar es la acumulación de péptidos β -amiloides ($A\beta$), un hecho que, como ya hemos mencionado, afecta directamente a la movilización de Ca^{2+} . Se ha propuesto que esta acumulación de péptidos $A\beta$ puede conducir a un incremento del influjo de Ca^{2+} a través de los canales $Ca_v1.2$ debido a un incremento en la fosforilación de estos canales por la PKA (Hall et al., 2007, Anekonda and Quinn, 2011). Para mimetizar las características de pacientes con Alzheimer familiar, se han diseñado ratones transgénicos que acumulan péptidos $A\beta$ y proteína tau (producto del gen MAPT) hiperfosforilada en neuronas piramidales de la capa CA1 (ratones 3xTgAD), y en estos ratones se ha descrito un incremento en las corrientes de Ca^{2+} generadas por los canales VOCCs tipo L en neuronas del hipocampo, lo que sugiere que la desregulación de estos canales juega un papel importante en la degeneración neuronal observada en pacientes de Alzheimer familiar (Wang and Mattson, 2014). Así, una alternativa en el tratamiento de esta enfermedad podría ser el uso de bloqueantes de este tipo de canales. En este sentido, Forette y cols. encontraron que el bloqueo de estos canales tipo L con dihidropiridinas, como la nitrendipina, reducía la demencia esporádica en algunos pacientes de Alzheimer (Forette et al., 2002). De forma similar, se ha descrito una disminución de la pérdida de memoria en ratas tratadas con nimodipina, un bloqueante de corrientes de Ca^{2+} a través del canal $Ca_v1.3$ (Veng et al.,

2003). Por último, el bloqueante isradipina atenuó la toxicidad por acumulación de péptidos A β y disminuyó tanto la expresión de Cav1.2 como el influjo de Ca²⁺ a través de este canal en células de neuroblastoma MC65 (Anekonda et al., 2011). Interesantemente, el efecto neuroprotector de israpidina también se ha observado en modelos de la enfermedad de Parkinson (Anekonda and Quinn, 2011) y de derrame cerebral (Lenhard et al., 2008).

Anteriormente se comentó en este trabajo que STIM1 inhibe la acción del canal Cav1.2 de forma directa y además potencia su internalización desde la membrana. (Park et al., 2010). Por ello, mientras un descenso en los niveles de STIM1 se considera deletéreo, en parte debido a la consecuente sobreactivación de canales VOC, altos niveles de STIM1 y SOCE podrían ejercer un efecto neuroprotector, como se sugirió tras observar una menor secreción de APP en células que expresaban el mutante de STIM1 D76A, un mutante constitutivamente activado (Zeiger et al., 2013). No obstante, la entrada de Ca²⁺ dependiente de STIM1 parece estar afectada por los niveles de APP, ya que el knock-down de transcritos de APP condujo a una disminución en la unión de STIM1 a ORAI1 en respuesta al vaciado de depósitos intracelulares (Gazda et al., 2017), y SOCE resultó notablemente atenuado en cultivos de astrocitos procedentes de ratones KO para la proteína APP (Linde et al., 2011).

7. DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL Y NEURODEGENERACIÓN.

Es conocido que la interacción RE-mitocondria se encuentra alterada en diversas neuropatologías, incluyendo Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica asociada a demencia frontotemporal (Paillusson et al., 2016). Así, en mitocondrias de diversas líneas celulares y neuronas que expresan las mutaciones humanas en PSEN2 típicas de pacientes de Alzheimer familiar, se observan mayores concentraciones o picos transitorios de Ca²⁺ en el interior mitocondrial aunque el contenido en Ca²⁺ del RE sea bajo. Este fenómeno se debe a un incremento en el número de contactos RE-mitocondria, algo que se observa para mutaciones en PSEN2, pero no en PSEN1 (Kipanyula et al., 2012, Hedskog et al., 2013).

En el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, la fase temprana de pérdida de memoria se ve acelerada por la muerte celular neuronal, la cual se ve incrementada por la desregulación de la homeostasis del Ca²⁺. Esta alteración en la red de señalización del Ca²⁺ no sólo afecta al período de depresión a largo plazo (LTD), sino que activa en la mitocondria la vía intrínseca de apoptosis inducida por Ca²⁺. Cuando el Ca²⁺ almacenado dentro del lumen del RE es liberado al citoplasma por el receptor de IP₃, una proporción del mismo es captada por la mitocondria que funciona como tamponador citosólico.

Posteriormente este Ca^{2+} es devuelto al citosol y puede ser captado de nuevo por el RE. Sin embargo, la disrupción de la homeostasis del Ca^{2+} que se experimenta durante la enfermedad de Alzheimer, provoca una alteración de la transferencia de Ca^{2+} entre RE-mitocondria, incrementándose la cantidad de Ca^{2+} captada por la mitocondria. Esto genera una mayor presión en la mitocondria, ocasionando la apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (MTP en inglés), el colapso del potencial de membrana mitocondrial y la liberación de citocromo c, que activa la vía de caspasas responsables de la apoptosis (Berridge, 2011).

Por otro lado, la toxicidad neuronal ocasionada por los agregados y oligómeros $\text{A}\beta$ se ha relacionado con la disfunción mitocondrial, ya que un exceso de estos agregados puede alterar la función bioenergética de la mitocondria (Ruan et al., 2017). A través de estudios in vitro se ha demostrado que la incubación de células o mitocondrias aisladas con $\text{A}\beta$ conduce a una disfunción mitocondrial (Crouch et al., 2005). Otros investigadores han descrito efectos deletéreos de estos oligómeros $\text{A}\beta$ en la membrana externa mitocondrial donde, al activar el poro apoptótico BAK, inducen la liberación de citocromo c y la muerte celular (Kim et al., 2014).

Los efectos tóxicos de los agregados β -amiloides en la mitocondria están mediados por una interacción directa e inhibición del complejo I de la cadena transportadora de electrones, inhibición de forma indirecta sobre el complejo IV por un incremento en la producción de ROS y por una permeabilización de la membrana mitocondrial debido a oligómeros $\text{A}\beta$ (Sanz-Blasco et al., 2008, Bobba et al., 2013). Estos péptidos $\text{A}\beta$ pueden ser importados a la mitocondria por translocasas de la membrana externa (TOM) (Hansson Petersen et al., 2008), receptores mitocondriales para productos glicosilados (Takuma et al., 2009), o por producción interna propia tras la escisión de APP por la γ -secretasa mitocondrial (Pavlov et al., 2011). Así se ha observado una acumulación intramitocondrial de péptidos $\text{A}\beta$ en ratones transgénicos para *App*, así como en cerebros de pacientes de Alzheimer (Du et al., 2010, Cha et al., 2012). En este sentido, la proteína PREP, encargada de la degradación de estos péptidos amiloideos, ve reducida su actividad en distintos modelos de la enfermedad de Alzheimer (Alikhani et al., 2011). Consecuentemente, el incremento de expresión de PREP en un modelo de Alzheimer en ratón disminuyó el estrés oxidativo, la neuroinflamación, y mejoró la función sináptica, el aprendizaje y la memoria (Fang et al., 2015). La incorrecta proteólisis de APP es también deletérea porque esta proteína ha sido relacionada con la maquinaria de importación de proteínas mitocondriales a través de su extremo C-terminal (Hansson et al., 2004).

Por último, cabe destacar que se ha observado una reducción en la captación de Ca^{2+} mitocondrial en linfocitos deficientes en STIM1 u ORAI1, un efecto que se debe a

una reducción en la expresión del uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (MCU en inglés). Análisis de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) y estudios de unión a promotores revelaron que el factor de transcripción CREB se une directamente al promotor de MCU, sugiriendo que SOCE regula la capacidad de captación de Ca^{2+} en la mitocondria al regular la activación de CREB dependiente de Ca^{2+} (Shanmughapriya et al., 2015).

A grayscale microscopic image of plant tissue. The image shows a network of large, thick-walled cells, likely sclerenchyma or collenchyma, with prominent cell walls. These cells are interconnected by a complex network of fibers. In the center and lower right, there are clusters of smaller, more delicate cells, possibly parenchyma or epidermal cells. The overall structure is highly organized and shows clear cellular boundaries.

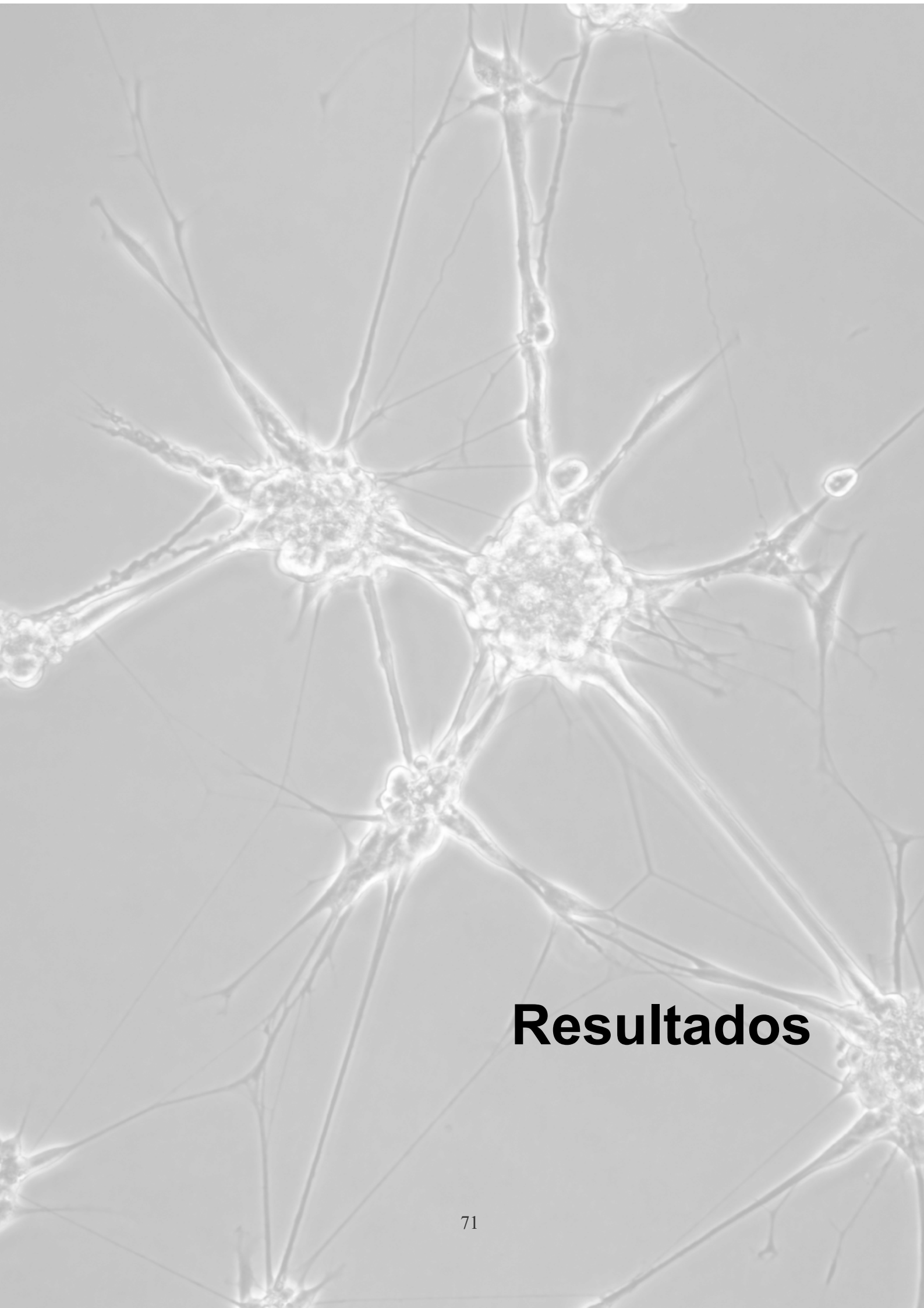
Objetivos/Objectives

La entrada de Ca^{2+} operada por depósitos intracelulares (SOCE) constituye una vía importante en la señalización dependiente de Ca^{2+} y en el mantenimiento de la homeostasis de Ca^{2+} en células eucariotas. La desregulación de la concentración de calcio libre citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) o la alteración de los mecanismos de influjo de Ca^{2+} extracelular durante la señalización neuronal, son factores implicados en el desarrollo de patologías neuronales, como Parkinson o Alzheimer. En este sentido, hay que recordar que la proteína STIM1 es el principal activador de SOCE y, por tanto, desempeña un papel fundamental en el control de la movilización de Ca^{2+} . Por ello, en esta Tesis Doctoral nos hemos planteado como objetivo general estudiar la función que desempeña la proteína STIM1 durante la diferenciación neuronal, así como evaluar los efectos de la deficiencia de dicha proteína en la homeostasis de Ca^{2+} y la viabilidad celular. Para llevar a cabo este estudio nos hemos planteado los siguientes objetivos específicos:

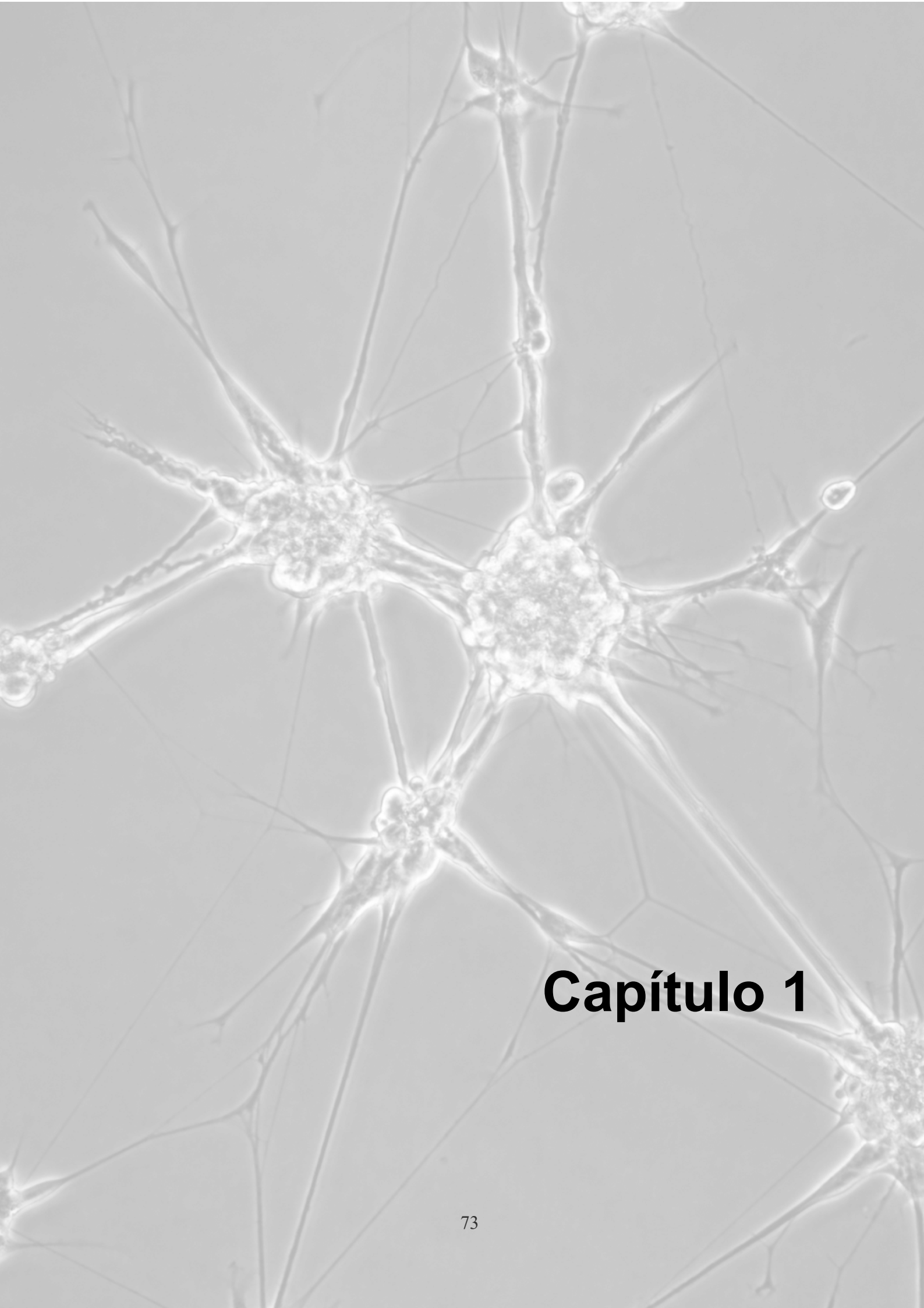
1. Análisis de la expresión de la proteína STIM1 durante la diferenciación neuronal de células SH-SY5Y estimuladas con ácido retinoico y BDNF.
2. Estudiar el papel de STIM1 en la diferenciación neuronal de neuroblastos SH-SY5Y.
3. Analizar la viabilidad celular de neuroblastos indiferenciados y diferenciados en líneas SH-SY5Y wild-type y STIM1-KO, evaluando los posibles mecanismos responsables de las alteraciones de la viabilidad ante la ausencia de STIM1.
4. Estudiar los mecanismos implicados en la alteración de la homeostasis del Ca^{2+} ante la ausencia de STIM1 en células SH-SY5Y.

Store-operated calcium entry (SOCE) is an important pathway in Ca^{2+} -dependent signaling and in the maintenance of Ca^{2+} homeostasis in eukaryotic cells. The dysregulation of the cytosolic free calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) or the alteration of the extracellular Ca^{2+} influx mechanisms during neuronal signaling are factors involved in the development of neuronal pathologies, such as Parkinson's or Alzheimer's disease. In this regard, it should be recalled that STIM1 protein is the main activator of SOCE and therefore plays an essential role in the control of Ca^{2+} mobilization. For this reason, in this Doctoral Thesis we have considered the general objective of studying the role played by the STIM1 protein during neuronal differentiation, as well as assessing the effects of the deficiency of this protein on Ca^{2+} homeostasis and cell viability. In order to carry out this study we have proposed the following specific objectives:

1. To evaluate STIM1 protein expression during neuronal differentiation of SH-SY5Y cells triggered with retinoic acid and BDNF.
2. To study the role of STIM1 in the neuronal differentiation of neuroblastoma SH-SY5Y cells.
3. To analyse the cell viability of undifferentiated and differentiated neuroblasts in wild-type and STIM1-KO SH-SY5Y cell lines, evaluating the possible mechanisms responsible for viability alterations in the absence of STIM1.
4. To study the mechanisms involved in the dysregulation of Ca^{2+} homeostasis triggered by the absence of STIM1 in SH-SY5Y cells.



Resultados



Capítulo 1

1. ESTUDIO DE LA DEFICIENCIA DE STIM1 EN CÉLULAS SH-SY5Y.

Un objetivo esencial de este trabajo es el estudio del efecto de STIM1 sobre la diferenciación de neuroblastos. Como hemos mencionado en la Introducción de esta memoria, STIM1 es junto al canal ORAI1 el principal regulador de la vía de influjo de Ca^{2+} conocida como SOCE. Alteraciones en este mecanismo pueden provocar una desregulación de la homeostasis de la concentración de Ca^{2+} citosólico, la cual se encuentra íntimamente vinculada a la neurodegeneración y muerte celular. Para analizar la función que desempeña STIM1 en la diferenciación neuronal hemos desarrollado un modelo celular in vitro a través de la generación de una línea celular de neuroblastoma en la que no se expresa esta proteína, utilizando para ello el sistema de edición genómica CRISPR/Cas9. Posteriormente, hemos llevado a cabo diferentes estudios para evaluar los efectos derivados de la ausencia de esta proteína. Para el desarrollo de este trabajo se ha empleado la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y, la cual es de amplio uso en estudios de neurobiología y enfermedades neurodegenerativas.

1.1. Generación de una línea celular SH-SY5Y STIM1-KO.

Utilizando el sistema de edición genómica CRISPR/Cas9 diseñamos una estrategia para modificar el locus del gen *STIM1* (ENSG00000167323) en la línea SH-SY5Y. Para reducir la posibilidad de cortes inespecíficos en el DNA, las células se transfectaron con plásmidos que expresaban la nucleasa Cas9 D10A (Cas9 nickase, o Cas9n) y 2 RNA guías específicos para actuar sobre el exón 5, común para las tres variantes transcripcionales conocidas de STIM1 humano: NP_001264890.1, NP_001264891.1, y NP_003147.2. En la Figura 8 se ilustra un esquema de esta estrategia.

Transcurridas 24 horas desde la transfección y dos días adicionales en medio de selección con puomicina, las células se dejaron crecer en medio fresco sin puomicina hasta obtener un cultivo al 80% de confluencia, momento en el que se analizó el cultivo celular para comprobar la eficiencia de la modificación genómica buscada. Para ello se llevó a cabo un análisis previo del nivel de expresión de STIM1 a partir del pool celular obtenido y utilizando como control una muestra de lisado de células SH-SY5Y wild-type (Figura 9).

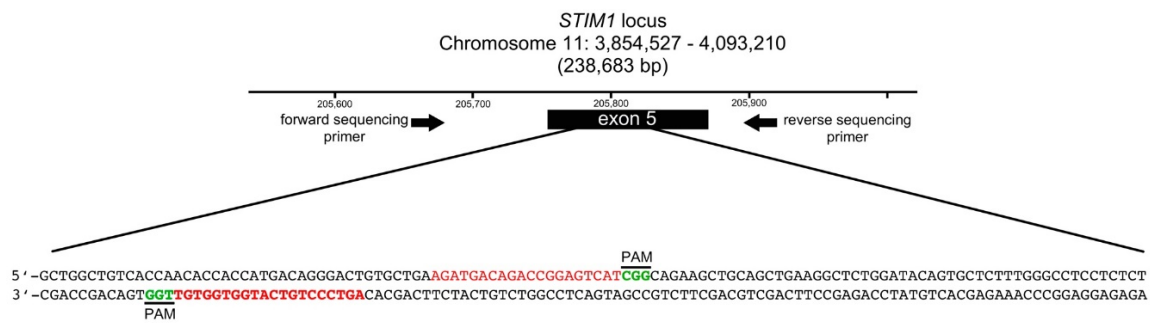


Figura 8. Estrategia para la obtención del knock-out (KO) para la expresión de STIM1 empleando el sistema CRISPR/Cas9. La secuencia de las dianas para los RNAs guías se han marcado en rojo, siendo secuencias que pertenecen al exón 5 del locus de *STIM1*. En verde se muestran las secuencias PAM de reconocimiento para la nucleasa

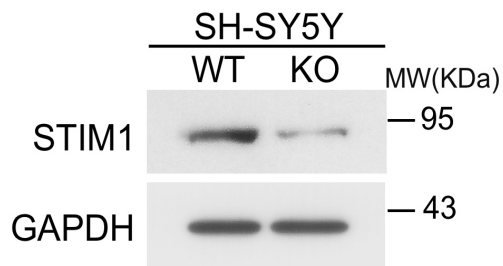


Figura 9. Análisis del pool inicial de células SH-SY5Y modificadas genómicamente. Las células SH-SY5Y se transfectaron para la expresión de la nucleasa Cas9 D10A y los RNAs guías específicos para la obtención de la línea STIM1-KO. Tras la selección con puromicina, las células se recrecieron y se obtuvo un lisado celular mixto que se analizó por inmunoblot para la expresión de STIM1 total, utilizando 30 µg de lisado y un anticuerpo anti-STIM1. Como control de carga de proteína se analizó el nivel de GAPDH.

El inmunoblot de la Figura 9 muestra un menor nivel de expresión de STIM1 en las células transfectadas (pool células KO) con respecto a la muestra control (células WT). La menor cantidad de STIM1 en la condición STIM1-KO se debe a que el lisado procede de un cultivo celular mixto, es decir, que tras la selección de células con el antibiótico puromicina, no todas las células supervivientes presentan inhibición de la expresión de STIM1. Sin embargo, este primer análisis demuestra que un alto porcentaje de la población celular es positivo para el KO de STIM1, y por ello el siguiente paso consistió en generar clones individuales a partir de este pool celular. Los clones se recrecieron en placas independientes y se dejaron crecer hasta obtener diferentes cultivos celulares. El

número de clones obtenidos fue 33. Estos clones se analizaron por inmunoblot para detectar el nivel de expresión de STIM1 y se observó que en la muestra procedente del clon 3D11 no se detectaba la expresión de esta proteína (Figura 10).

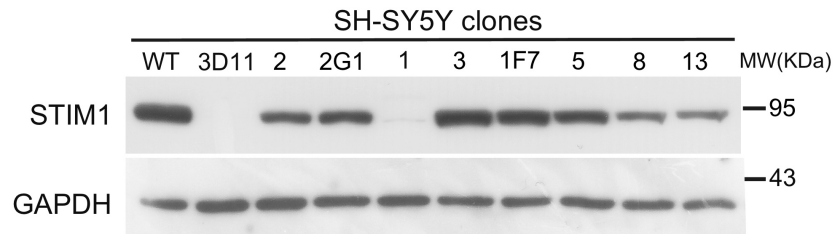


Figura 10. Selección de clones STIM1-KO. Las células SH-SY5Y procedentes del cultivo mixto se aislaron en clones individuales por citometría de flujo y se recriaron hasta la obtención de monocapas celulares. Lisados celulares de cada muestra (30 μ g proteína) se emplearon para el análisis de expresión de STIM1 mediante inmunoblot. La muestra del clon 1 presentaba una baja expresión de la proteína STIM1 y en la muestra del clon 3D11 la expresión de STIM1 fue indetectable. Como control se utilizó una muestra de un lisado de células wild-type (WT) y como control de carga se evaluó el nivel de GAPDH.

Para poder evaluar el papel de STIM1 durante la diferenciación neuronal seleccionamos un clon con una inhibición total de la expresión de la proteína. Por ello seleccionamos el clon 3D11 como posible línea celular STIM1-KO y caracterizamos en detalle la modificación llevada a cabo en la región diana mediante secuenciación genómica. A partir de 10 productos de PCR subclonados de esta región, la secuenciación mostró dos modificaciones: una inserción de 211 pb (pares de bases) para uno de los alelos y otra inserción de 318 pb para el otro alelo. Como resultado de estas modificaciones genéticas se produce un cambio en la fase de lectura ribosomal del mRNA y la aparición de un codón de parada prematuro en cada alelo, impidiéndose así la síntesis de la secuencia nativa de STIM1 (Figura 11).

Allele 1 frameshift + STOP

L A V T N T T M T G T V L K M T D R T G T V L N H H D R D C A E D D R P D R D
GCTGGCTGTCACCAACACCACCATGACAGGGACTGTGCTGAAGATGACAGACCGGACAGGGACTGTGCTGAACCACCATGACAGGGACTGTGCTGAAGATGACAGACCGGACAGGGA
C A E D D R P E S T M T G T V L K M T D R T G T V L N H H D R D C A E D D R P
CTGTGCTGAAGATGACAGACCGGAGTCCACCATGACAGGGACTGTGCTGAAGATGACAGACCGGACAGGGACTGTGCTGAACCACCATGACAGGGACTGTGCTGAAGATGACAGACC
D R D C A E D D R P E S S A E A A A E G S G Y S A L W A S S L D S P STOP
GGACAGGGACTGTGCTGAAGATGACAGACCGGAGTTCATCGGCAGAAGCTGCAGCTGAAGGCTCTGGATACAGTGTCTTTGGCCCTCCTCTTGACTCGCCA**TGA**

Allele 2 frameshift + STOP

L A V T N T T M T G T V L K M T D R S T M T G T V L K M T D R S P P STOP
GCTGGCTGTCACCAACACCACCATGACAGGGACTGTGCTGAAGATGACAGACCGGAGTACCATGACAGGGACTGTGCTGAAGATGACAGACCGGAGTCCACCA**TGA**

Figura 11. Secuenciación del DNA genómico del clon 3D11. El clon 3D11 seleccionado tras el análisis de inmunoblot se analizó mediante secuenciación del DNA genómico. La secuencia diana se amplificó mediante PCR empleando los primers indicados en Materiales y Métodos. Este producto de PCR se empleó para transformar bacterias y la secuenciación de los productos subclonados permitió la detección de dos inserciones: 211 pb + 318 pb. En la figura se muestra parte de la inserción indicando el codón de parada prematuro (STOP). La secuencia de aminoácidos parental se indica en negro, mientras que la secuencia tras el cambio de fase de lectura se indica en rojo.

1.2. Caracterización de la línea celular SH-SY5Y STIM1-KO.

Tras la caracterización genómica del clon knock-out para STIM1, se evaluó la expresión de la proteína STIM1 utilizando dos anticuerpos comerciales que reconocen diferentes epítomos, localizados en las regiones C- y N-terminal de la proteína. La Figura 12 muestra que no se detectó expresión de STIM1 con ninguno de los anticuerpos, resultado que confirma la generación de la línea SH-SY5Y STIM1-KO.

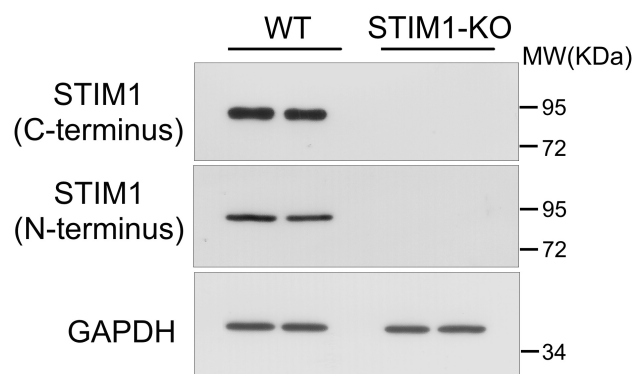


Figura 12. Análisis de la expresión de STIM1. La expresión de la proteína STIM1 se evaluó mediante inmunoblot utilizando dos anticuerpos comerciales que reconocen dos epítomos diferentes de STIM1, uno en el extremo C-terminal y el otro en el extremo N-terminal. Con ninguno de los anticuerpos se detectó la expresión de STIM1 en la condición KO. Como control del experimento se utilizó un lisado total de una muestra SH-SY5Y WT y como control de carga proteica se evaluó el nivel de expresión de GAPDH.

Al ser STIM1 un regulador esencial de SOCE y con el fin de evaluar la funcionalidad de la línea STIM1-KO, analizamos el influjo de Ca^{2+} en respuesta al vaciado de depósitos con objeto de comprobar si existía alguna disminución en esta ruta de entrada de Ca^{2+} extracelular. La medida de SOCE se llevó a cabo siguiendo el protocolo detallado en los puntos 10.1-10.4 de Materiales y Métodos. Así, las células SH-SY5Y se cargaron con fura-2 y tras la carga se trataron con thapsigargina (Tg) 1 μM en HBSS libre de Ca^{2+} para inducir el vaciado de depósitos intracelulares. Transcurridos 6 minutos de tratamiento con Tg se añadió CaCl_2 2 mM al medio extracelular y se cuantificó el incremento de la concentración de Ca^{2+} en el citosol ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Como control del experimento también se realizó la medida en presencia de BTP2 (también conocido como YM58483) un inhibidor de SOCE (Figura 13).

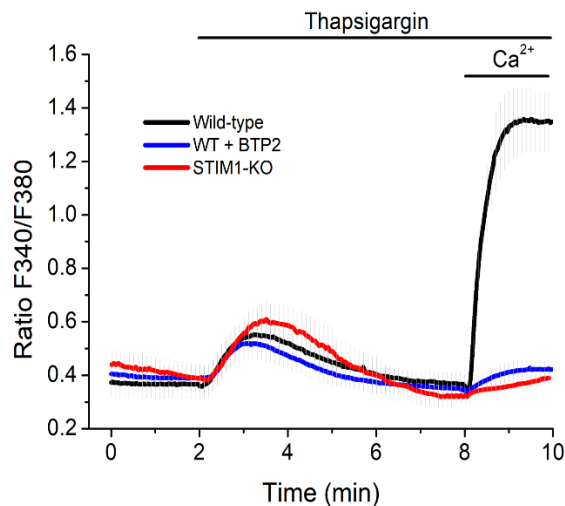


Figura 13. Medida de SOCE en células SH-SY5Y wild-type y STIM1-KO. Las células cargadas con fura-2 se emplearon para monitorizar el ratio de fluorescencia F_{340}/F_{380} . Las células se trataron con Tg 1 μM en medio HBSS libre de Ca^{2+} y tras 6 min de incubación se añadió CaCl_2 2 mM al medio extracelular. Cuando fue requerido, se añadió el inhibidor BTP2 (3 μM) junto a Tg. Los datos representan la media \pm desviación estándar (s.d.) de 3 ensayos independientes para células WT (línea negra, n = 75 células), células STIM1-KO (línea roja, n = 80 células) y células WT + BTP2 (línea azul, n = 42 células).

El tratamiento con Tg (minuto 2 del experimento) produjo un incremento transitorio en el ratio F_{340}/F_{380} , indicativo de la salida de Ca^{2+} desde el RE. La rápida disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hasta niveles basales se debe a la extrusión de Ca^{2+} al medio extracelular por medio de la PMCA (Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPase), la cual es insensible a Tg. El incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ observado tras la adición de CaCl_2 al medio extracelular (minuto

8 del experimento) se debe principalmente a la apertura de canales SOCs, aunque también otros canales de Ca^{2+} contribuyen al nivel de $[Ca^{2+}]_i$ alcanzado, tales como bombas, intercambiadores y moléculas tamponadoras.

En la Figura 13 podemos observar como tras añadir Ca^{2+} extracelular, el ratio F_{340}/F_{380} registrado en la células STIM1-KO (línea roja) es muy inferior al registrado en las células WT (línea negra). Estos resultados indican que la línea SH-SY5Y deficiente en STIM1 presenta una baja actividad de SOCE, es decir que no se están activando los canales SOCs en respuesta al tratamiento con Tg. Por ello, la línea STIM1-KO es una herramienta de gran utilidad para evaluar cómo afecta la pérdida de STIM1 y SOCE a la diferenciación neuronal de la línea SH-SY5Y.

Por otro lado, se llevó a cabo un análisis del ciclo celular para conocer si existía alguna alteración en la distribución de células como consecuencia de la modificación generada en el locus de *STIM1*. Para ello, las células STIM1-KO se sembraron y se dejaron crecer, un mínimo de 48 horas (superando así el tiempo de un ciclo celular completo para la línea SH-SY5Y), hasta alcanzar una confluencia del 60-70%. Posteriormente, las células se fijaron con etanol al 70% a 4°C, se incubaron con yoduro de propidio y RNasa, y se analizaron por citometría de flujo. Como control del experimento también se analizaron células SH-SY5Y wild-type.

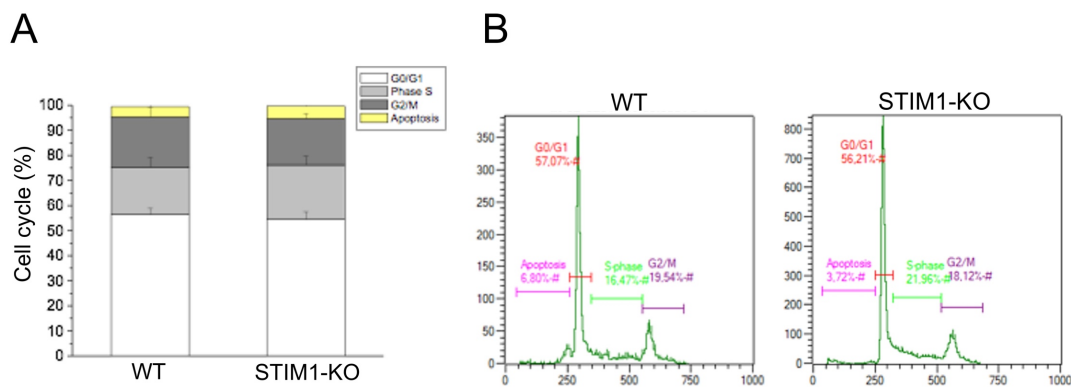


Figura 14. Distribución de células SH-SY5Y wild-type y STIM1-KO en las diferentes etapas del ciclo celular. Las células STIM1-WT y STIM1-KO se cultivaron durante 48 horas, se fijaron con etanol al 70% y se tiñeron con yoduro de propidio para su detección por fluorescencia. Mediante citometría de flujo se analizó la distribución de células en las distintas fases del ciclo celular y el número de células apoptóticas. *Panel A:* Los datos obtenidos en el análisis se representan mediante una gráfica de columnas apiladas. *Panel B:* Representación mediante histograma del número de células (eje y) y la intensidad de fluorescencia (eje x) para células WT y STIM1-KO en las distintas fases del ciclo celular. Los datos representan la media \pm s.d. de 3 ensayos independientes por condición experimental, con un triplicado de muestras por ensayo ($n = 9$), utilizándose >20.000 células por muestra.

Los resultados mostrados en la Figura 14 indican que no existen diferencias significativas en la distribución del ciclo celular entre células parentales (wild-type) y STIM1-KO.

1.3. La adhesión celular de neuroblastos se ve afectada por la deficiencia de STIM1.

Tras confirmar que la ausencia de STIM1 provocaba un importante déficit en la entrada de Ca^{2+} extracelular por canales SOC buscamos evaluar si esta alteración en la señalización por Ca^{2+} podía afectar a la adhesión celular de neuroblastos SH-SY5Y. Esto es debido a que es conocido que los procesos de adhesión y motilidad celular se ven afectados por alteraciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Sheng et al., 2013, Hartzell et al., 2016). Para ello, se trataron placas con distintas concentraciones de colágeno y fibronectina con el fin de generar matrices extracelulares que favorecieran la adhesión celular.

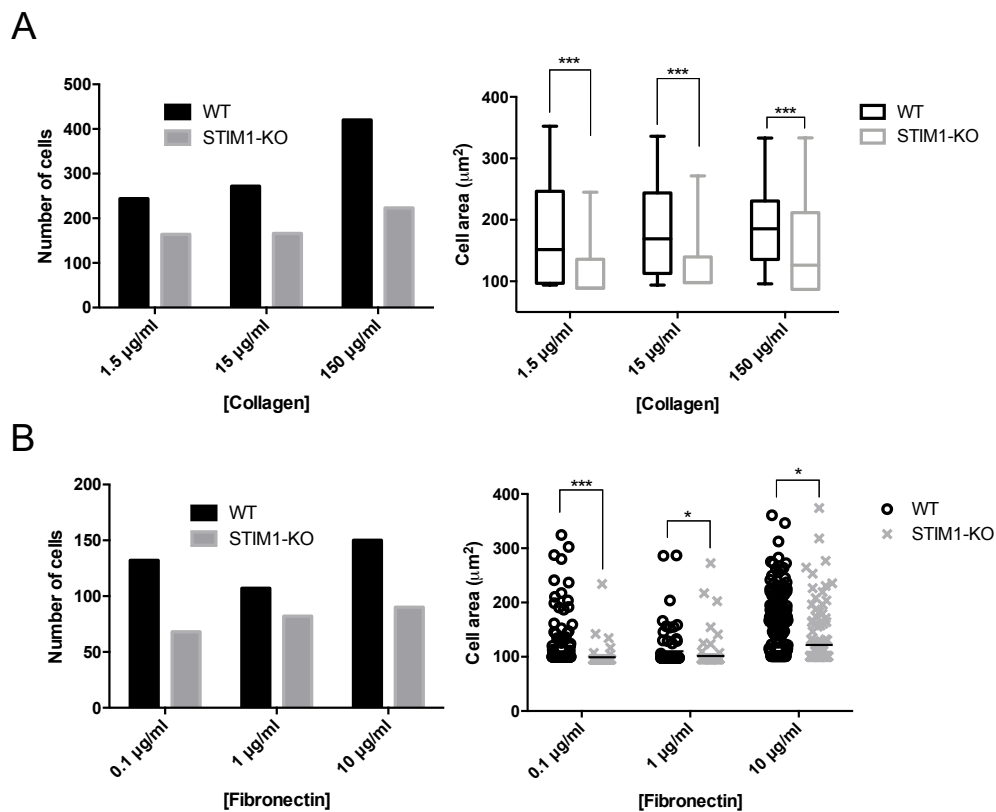


Figura 15. Cuantificación de la adhesión celular en matrices extracelulares de colágeno y fibronectina. Células de las líneas SH-SY5Y WT (símbolos negros) y STIM1-KO (símbolos grises) se sembraron sobre matrices de colágeno (1.5 $\mu\text{g/ml}$, 15 $\mu\text{g/ml}$, 150 $\mu\text{g/ml}$) (*Panel A*) y fibronectina (0.1 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$) (*Panel B*) y se cultivaron durante 2 horas en medio de crecimiento. Tras este tiempo, se adquirieron imágenes de ambas líneas celulares para las distintas condiciones. A la izquierda se representa el número de células adheridas en las distintas matrices. A la derecha se muestra el área celular media de las células adheridas. (** $p < 0.001$; * $p < 0.05$).

Para ello, se sembraron células SH-SY5Y parentales y STIM1-KO en placas tratadas con las distintas concentraciones de colágeno y fibronectina previamente indicadas. A continuación, se incubaron en medio de crecimiento durante 2 horas a 37°C y transcurrido este tiempo se capturaron 10 imágenes por condición. El número de células adheridas y el área celular media para cada línea en cada condición se representa en la Figura 15.

El experimento anterior sugiere que las células parentales presentan una mejor adhesión que las STIM1-KO tanto en matrices de colágeno como de fibronectina. A continuación, pasamos a evaluar qué tiempo requería cada tipo celular para adherirse completamente y extender prolongaciones (neuritas). Para ello, llevamos a cabo un análisis de la cinética de adhesión celular, sembrando ambos tipos celulares sobre matrices de colágeno de 15 $\mu\text{g/ml}$ y captando imágenes de las células a diferentes intervalos de tiempo. Posteriormente, se evaluó el perímetro celular en intervalos de 15 minutos en ambas líneas celulares (Figura 16).

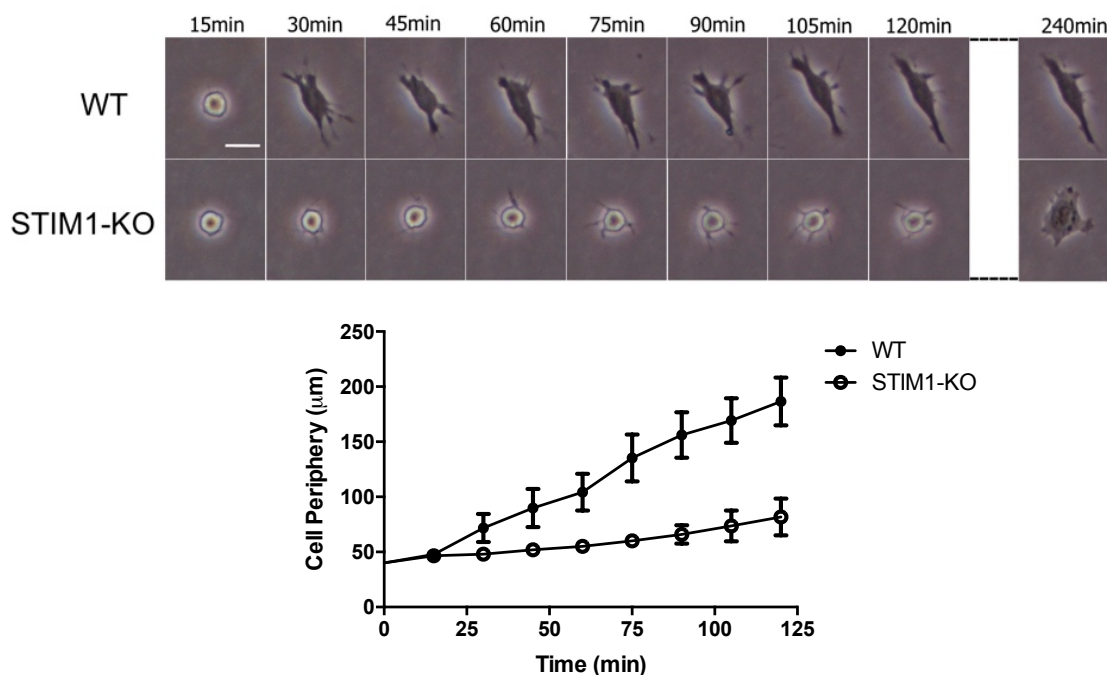


Figura 16. Cinética de adhesión celular en neuroblastos SH-SY5Y WT y STIM1-KO. Ambas líneas celulares se sembraron sobre matrices de colágeno (15 $\mu\text{g/ml}$) y se monitorizaron para capturar imágenes a distintos intervalos de tiempo. En la parte superior, se observan células de ambas líneas en intervalos de 15 minutos, y una imagen final a los 240 minutos (escala = 20 μm). En la parte inferior se representa el perímetro celular medio para cada una de las líneas en los distintos intervalos mostrados arriba. En cada intervalo se representa la media \pm s.d. obtenida a partir de la medida de 10 células por cada condición.

2. LA SOBREPRESIÓN DE STIM1 EN LA LÍNEA CELULAR SH-SY5Y STIM1-KO PERMITE LA RECUPERACIÓN DEL FENOTIPO SILVESTRE.

Dado que las células STIM1-KO presentan una disminución significativa de la entrada extracelular de Ca^{2+} en respuesta al vaciado de depósitos intracelulares, nos planteamos sobre-expresar la proteína STIM1 de manera ectópica en la línea STIM1-KO con el fin de comprobar si los resultados obtenidos eran específicos de la pérdida de expresión de STIM1. Para ello, transfectamos células SH-SY5Y STIM1-KO para la expresión transitoria de STIM1-mCherry, y a continuación se llevó a cabo una medida de SOCE en respuesta a Tg. La Figura 17 muestra que en las células transfectadas con STIM1-mCherry se observa un nivel de SOCE similar al de las células parentales (wild-type), de modo que existe una recuperación completa de la entrada de Ca^{2+} extracelular. Estos resultados confirman que la deficiencia de SOCE en las células KO se debe a la ausencia de la proteína STIM1 y no a otros efectos causados de forma inespecífica sobre otras dianas que pudieran haberse visto alteradas durante la modificación genómica con CRISPR/Cas9.

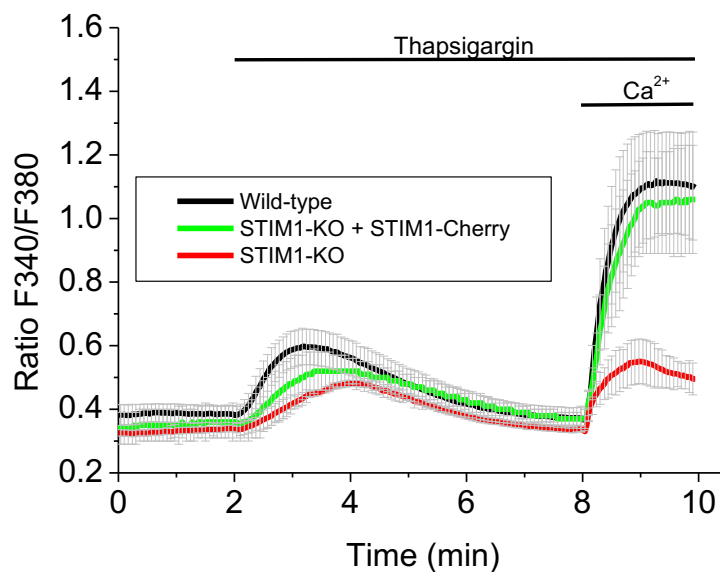


Figura 17. Medida de SOCE en células STIM1-KO transfectadas con STIM1-mCherry. Las células cargadas con fura-2 se monitorizaron por epifluorescencia midiendo el ratio F_{340}/F_{380} , primero tras la adición de Tg $1 \mu\text{M}$ en medio libre de Ca^{2+} y posteriormente tras la adición de Ca^{2+} extracelular. Línea negra: células wild-type; línea verde: células STIM1-KO transfectadas para la expresión de STIM1-mCherry; línea roja: células STIM1-KO. Los datos representan la media \pm s.d. de 2 ensayos independientes ($n > 20$ células por cada condición).

3. DIFERENCIACIÓN NEURONAL DE CÉLULAS SH-SY5Y Y EXPRESIÓN DE STIM1.

Como se ha indicado anteriormente en esta memoria, la línea de neuroblastoma SH-SY5Y es muy utilizada para llevar a cabo estudios celulares relacionados con enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer o Parkinson, así como para estudios de neurogénesis. Como neuroblastos, estas células carecen de un fenotipo neuronal, así para que las células adquirieran características de células neuronales en este trabajo seguimos un protocolo de diferenciación neuronal in vitro (apartado 1.2 de Materiales y Métodos) para que las células adquirieran características de células neuronales diferenciadas.

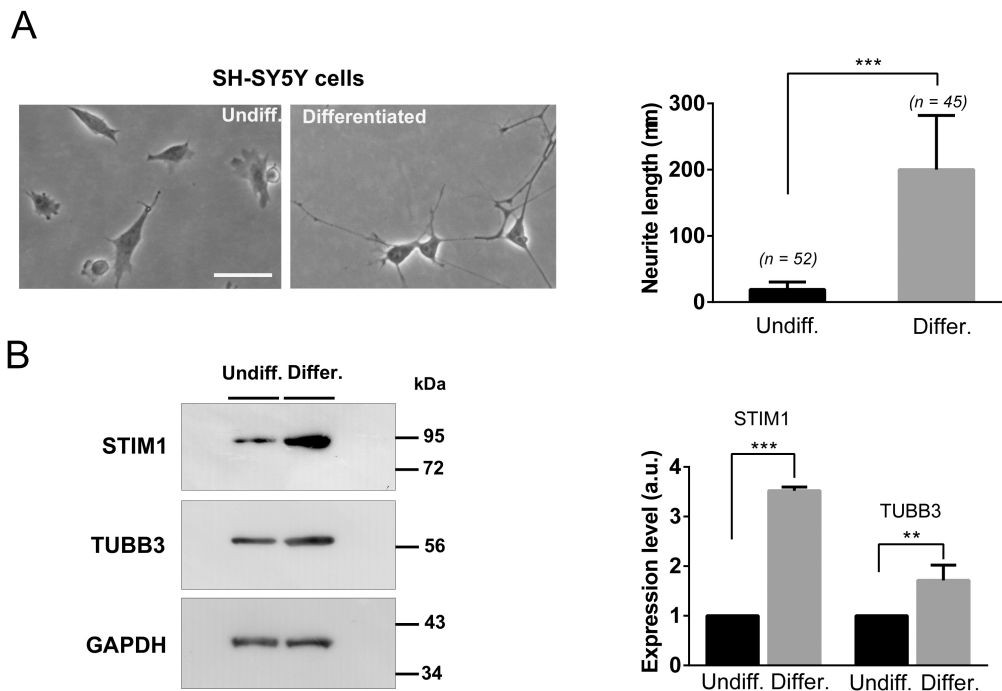


Figura 18. La diferenciación neuronal de células SH-SY5Y induce un incremento en la expresión de STIM1. Las células SH-SY5Y se diferenciaron con ácido retinoico y BDNF hasta los 9 días in vitro (DIV). *Panel A:* a la izquierda observamos imágenes de microscopía de campo claro de neuroblastos indiferenciados y diferenciados tras 9 DIV (escala = 100 μ m); el panel derecho muestra la longitud de las neuritas en células indiferenciadas (n = 52) y células diferenciadas (n = 45), a partir de dos cultivos independientes. *Panel B:* la expresión de STIM1 y TUBB3 se evaluó mediante inmunoblot a partir de lisados celulares obtenidos de células indiferenciadas y diferenciadas (panel izquierdo). El nivel de expresión de GAPDH fue analizado como control de carga del inmunoblot. El panel derecho muestra la cuantificación de los niveles de expresión de STIM1 y TUBB3 de tres ensayos independientes (***p<0.001; **p<0.01).

Para la diferenciación neuronal las células SH-SY5Y se cultivaron en DMEM con suero y se sometieron a un tratamiento con ácido retinoico 10 μM durante 5 días. Posteriormente este medio fue sustituido por un medio DMEM/F-12 libre de suero que contenía el factor neurotrófico BDNF 50 ng/ml (Encinas et al., 2000). Esta diferenciación se evaluó mediante el análisis de expresión por inmunoblot del marcador neuronal β -tubulina III (TUBB3) (Figura 18.B). Además, como medida alternativa del nivel de diferenciación, se midió la longitud de las neuritas tanto en neuroblastos indiferenciados como diferenciados (figura 18.A).

Tal y como esperábamos, los neuroblastos diferenciados presentaron un incremento de expresión de β -tubulina III así como un aumento en la longitud de las neuritas, por lo que este protocolo se estableció como método de diferenciación en el resto de los experimentos. A partir de estos mismos cultivos se analizó el nivel de expresión de STIM1 y se observó que existía un notable incremento en la expresión de esta proteína en células SH-SY5Y diferenciadas (Figura 18.B). Sin embargo, este aumento de expresión de la proteína STIM1 observado en células diferenciadas no se correlacionó con un incremento en la actividad SOCE (Figura 19). Por el contrario, se observó un significativo descenso de SOCE en células diferenciadas sugiriendo que el incremento de STIM1 durante la diferenciación debe estar relacionado con eventos celulares independientes de SOCE.

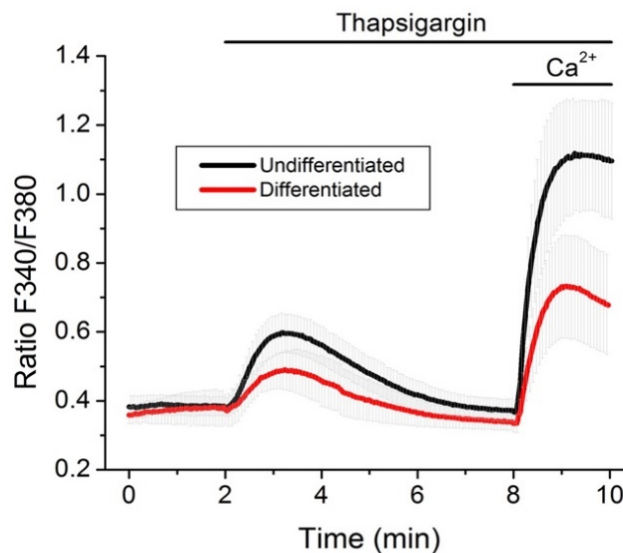


Figura 19. Medida de SOCE en células SH-SY5Y indiferenciadas y diferenciadas. Las células se cargaron con fura-2 (línea negra: indiferenciadas; línea roja: diferenciadas tras 9 DIV) y se monitorizaron por epifluorescencia midiendo el ratio F_{340}/F_{380} tras la adición de Tg 1 μM en medio libre de Ca^{2+} y tras la adición de Ca^{2+} extracelular. Los datos representan la media \pm s.d. de 3 ensayos independientes ($n > 60$ células por condición).

3.1. STIM1 no es esencial para la diferenciación de células SH-SY5Y.

Como nuestro trabajo se centra en comprender los posibles efectos derivados de los bajos niveles de STIM1 en neurodegeneración y dado que durante la diferenciación de neuroblastos SH-SY5Y se incrementó notablemente el nivel de expresión de STIM1, nos propusimos evaluar si la ausencia de esta proteína alteraba de alguna forma la diferenciación de estas células (Figura 20).

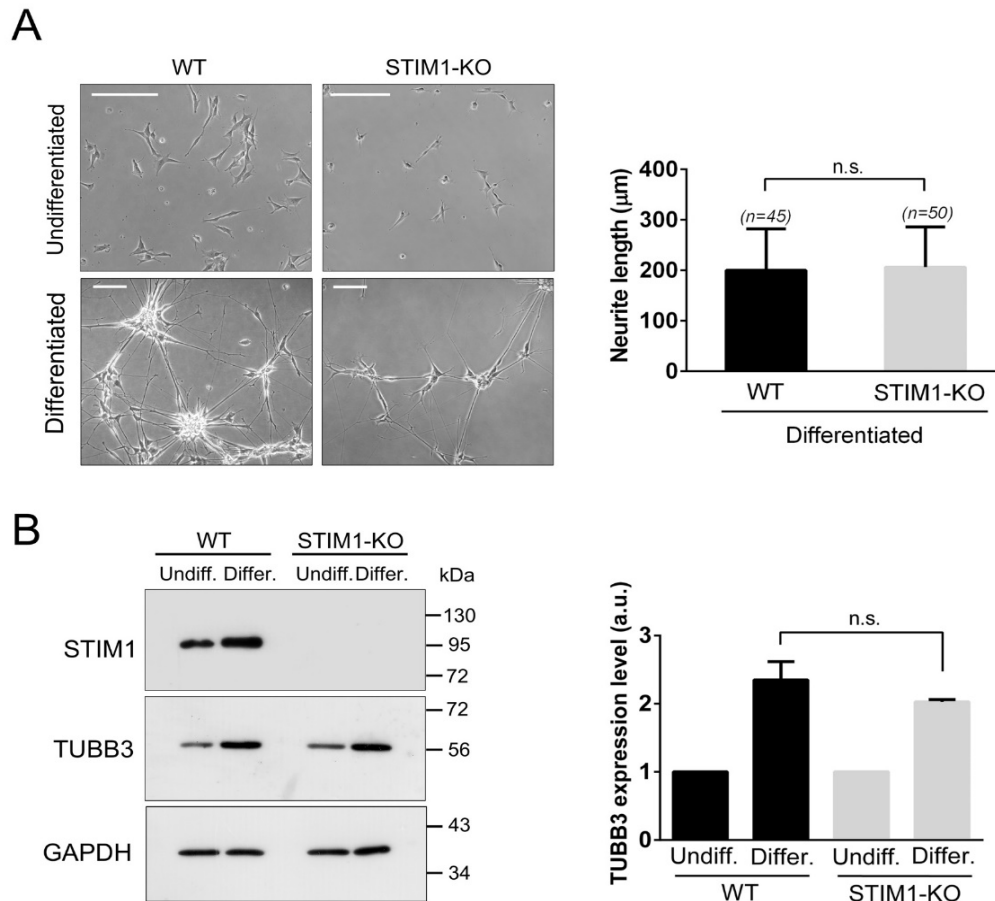


Figura 20. STIM1 es prescindible para la diferenciación neuronal. *Panel A:* las imágenes de la izquierda muestran neuroblastos indiferenciados y diferenciados tras 12 DIV (escala = 200 µm) capturadas para la medida de longitud de las neuritas. El panel derecho muestra la cuantificación de la longitud de las neuritas en células wild-type (n=45 células) y STIM1-KO (n=50 células) diferenciadas. Los datos se representan como media ± s.d. de 2 cultivos independientes. *Panel B:* la expresión de TUBB3 se evaluó mediante inmunoblot a partir de lisados celulares obtenidos de células indiferenciadas y diferenciadas (9 DIV) de ambas líneas celulares. El nivel de expresión de GAPDH fue analizado como control de carga del inmunoblot. El panel derecho muestra la cuantificación del nivel de expresión para TUBB3 a partir de 3 ensayos independientes.

Para ello, se cultivaron en paralelo células SH-SY5Y wild-type y STIM1-KO y se trataron con ácido retinoico y BDNF, como está establecido en el protocolo de diferenciación. A continuación, se evaluaron los mismos marcadores neuronales que en el apartado anterior, observándose que la longitud de las neuritas de células parentales y células STIM1-KO diferenciadas alcanzaban valores similares (Figura 20.A). Además, el nivel de expresión de TUBB3 se analizó por inmunoblot y no se observaron diferencias significativas entre las dos líneas celulares (Figura 20.B).

En conclusión, estos resultados indican que la proteína STIM1 no es esencial para la diferenciación neuronal de neuroblastos SH-SY5Y.

4. LA AUSENCIA DE STIM1 DISMINUYE LA VIABILIDAD EN CÉLULAS EN DIFERENCIACIÓN.

Aunque la diferenciación neuronal en células SH-SY5Y no resultaba afectada por la ausencia de la proteína STIM1, sí se observó un descenso en la viabilidad de las células STIM1-KO durante la diferenciación. Esta observación tuvo lugar tras llevar a cabo un ensayo de viabilidad celular por reducción de MTT en células parentales y STIM1-KO (Figura 21). Las células se cultivaron en DMEM con suero y se llevaron a cabo medidas de reducción de MTT en distintos días *in vitro*. Los neuroblastos WT y STIM1-KO indiferenciados mostraron una viabilidad celular similar durante los distintos días en cultivo (Figura 21.A). Sin embargo, en las células STIM1-KO diferenciadas se observó un notable descenso de la viabilidad celular a medida que avanzaba la diferenciación (Figura 21.B).

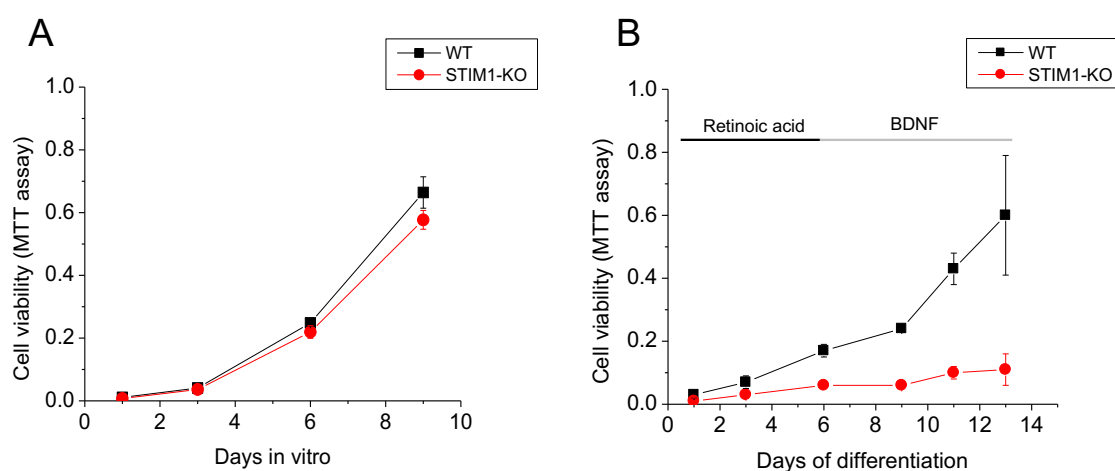


Figura 21. Viabilidad celular de neuroblastos y células diferenciadas. Células SH-SY5Y wild-type y STIM1-KO se cultivaron en medio de crecimiento (*Panel A*) o en medio de diferenciación neuronal (*Panel B*). El ensayo de viabilidad celular por MTT se llevó a cabo a distintos tiempos de cultivo. Los datos corresponden a la media y s.d. de 3 ensayos independientes.

Como se puede observar en la Figura 21, la ausencia de STIM1 disminuye considerablemente la viabilidad de células SH-SY5Y durante la diferenciación neuronal y en los siguientes apartados de este trabajo abordaremos las posibles causas que derivan en esta pérdida de la viabilidad en células STIM1-KO diferenciadas. Dado que las medidas del ensayo de MTT a partir del día 9 de diferenciación presentan un mayor error experimental, y debido a la complejidad que supone trabajar con células STIM1-KO diferenciadas de 9-12 DIV, tomamos como modelo de trabajo células diferenciadas hasta 6 DIV para el desarrollo de nuestros experimentos. En las Figuras 21.B y 22 observamos que en células SH-SY5Y STIM1-KO diferenciadas hasta 6 DIV ya se observa que la disminución de la viabilidad celular es estadísticamente significativa y, por tanto, estimamos que este es un punto temporal óptimo para llevar a cabo nuestros ensayos.

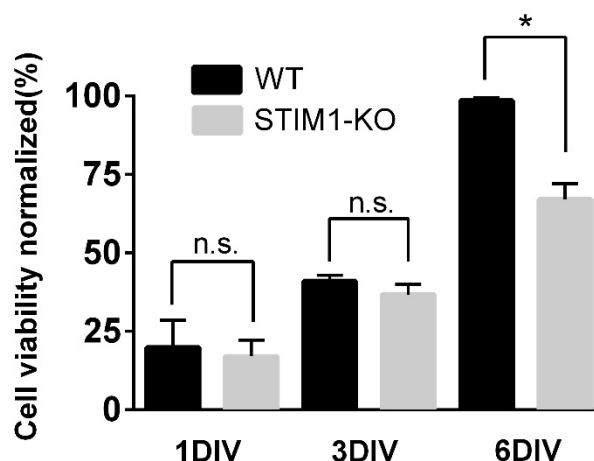


Figura 22. La viabilidad de las células STIM1-KO se reduce durante la diferenciación. La viabilidad de las células SH-SY5Y WT (barras negras) y STIM1-KO (barras grises) se evaluó mediante un ensayo de reducción de MTT en diferentes fases de la diferenciación: células indiferenciadas con 24 h en medio de crecimiento (1DIV); 24 h en medio de crecimiento + 2 días en medio de diferenciación (3DIV); 24 h en medio de crecimiento + 5 días en medio de diferenciación (6 DIV). Los datos se presentan como media \pm s.d. de 3 experimentos independientes, y los resultados están normalizados con respecto a los valores de absorción obtenidos para células wild-type de 6DIV (* $p < 0.05$).

4.1. Alteración del ciclo celular durante la diferenciación de células STIM1-KO.

Tras evaluar la muerte celular que se produce en las células STIM1-KO durante la diferenciación neuronal, nos planteamos estudiar en profundidad las causas que rodean a este proceso. Por ello examinamos si había alguna alteración en el ciclo celular de las células en diferenciación, lo cual podría explicar la disminución de la viabilidad en las

células STIM1-KO diferenciadas. En la caracterización de la línea SH-SY5Y STIM1-KO ya comprobamos que no existían diferencias significativas en la distribución del ciclo celular entre neuroblastos parentales y STIM1-KO (Figura 14). Por otro lado, durante el proceso de diferenciación se observó una acumulación de células en la fase G0/G1 (Figura 23), la cual es una característica común observada en diferentes tipos celulares tras el tratamiento con ácido retinoico (Dimberg et al., 2002, Herault et al., 2004). A pesar de que este incremento en la fase G0/G1 fue similar para ambas líneas celulares, la reducción en el número de células en la fase S fue mayor en células STIM1-KO diferenciadas que en células WT. El resultado anterior viene complementado con una mayor cantidad de células en la fase G2/M en el caso de células STIM1-KO diferenciadas (Figura 23), resultado que sugiere un enlentecimiento en esta fase del ciclo celular ante la ausencia de STIM1.

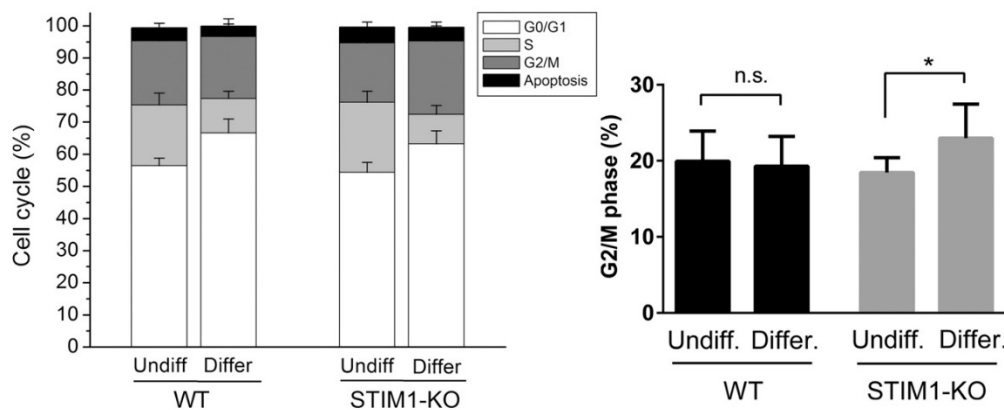


Figura 23. Ciclo celular en células SH-SY5Y WT y STIM1-KO indiferenciadas y diferenciadas.

El análisis del ciclo celular se llevó a cabo en neuroblastos indiferenciados (48 h en cultivo) y diferenciados (6 DIV) de ambas líneas celulares. Transcurridos estos tiempos, las células se fijaron en etanol 70% a 4°C, se tiñeron con yoduro de propidio y se analizó su distribución en ciclo por citometría de flujo (panel izquierdo). En el panel de la derecha se representa el porcentaje de células en la fase G2/M, observándose un incremento estadísticamente significativo de esta fase para las células STIM1-KO diferenciadas. En ambos paneles los datos representan la media \pm s.d. de 3 experimentos independientes, con un triplicado de muestras por experimento ($n = 9$), utilizándose >20.000 células por muestra ($*p < 0.05$).

5. INCREMENTO DE LOS NIVELES DE SENESCENCIA EN CÉLULAS STIM1-KO DIFERENCIADAS.

La pérdida de viabilidad celular observada en las células STIM1-KO diferenciadas (Figuras 21.B y 22) podría deberse en parte a la acumulación de células en fase G2/M para esta condición celular, pero también podría radicar en un proceso con mayor porcentaje de muerte celular. En este sentido, nuestro siguiente paso fue plantear y evaluar la hipótesis de que la muerte celular observada en las células STIM1-KO diferenciadas podía ser consecuencia de un incremento en el nivel de senescencia, que constituye una respuesta clave frente al estrés y daño celular, con el fin de mantener un balance celular óptimo. Las células senescentes se caracterizan por presentar un mayor acortamiento de los telómeros, un aumento del tamaño celular y un incremento de la actividad β -galactosidasa. En consecuencia medimos la senescencia mediante la incubación de las células con 5-dodecanoilaminofluoresceína di-beta-D-galactopiranosido (C12FDG), un sustrato fluorogénico para la actividad de la β -galactosidasa asociada a senescencia (Debacq-Chainiaux et al., 2009). Ambas líneas celulares se cultivaron para evaluar la senescencia en neuroblastos indiferenciados (48 h de cultivo en medio de crecimiento) y en neuroblastos diferenciados (6 DIV, con cinco días de tratamiento con ácido retinoico). Los resultados indicaron un incremento significativo en el nivel de senescencia en las células STIM1-KO diferenciadas (Figura 24), lo cual explica la disminución de la viabilidad celular mostrada en la Figura 21.B.

Aunque la senescencia celular puede estar desencadenada por un amplio número de factores de estrés, es ampliamente aceptado que el inhibidor 1 de las quinasas dependientes de ciclina (producto del gen CDKN1A, también conocido como p21CIP1 o p21) es un regulador esencial de este proceso celular, y por lo tanto las células senescentes presentan un mayor nivel de expresión de p21 (Gire and Dulic, 2015). Por ello, evaluamos los niveles de p21 por inmunoblot, utilizando lisados celulares de cultivos de neuroblastos indiferenciados y diferenciados de ambas líneas celulares (Figura 25.A). La cuantificación de los niveles de p21 permitió concluir que las células STIM1-KO diferenciadas presentan un incremento significativo de expresión de p21 con respecto a las células parentales (Figura 25.B).

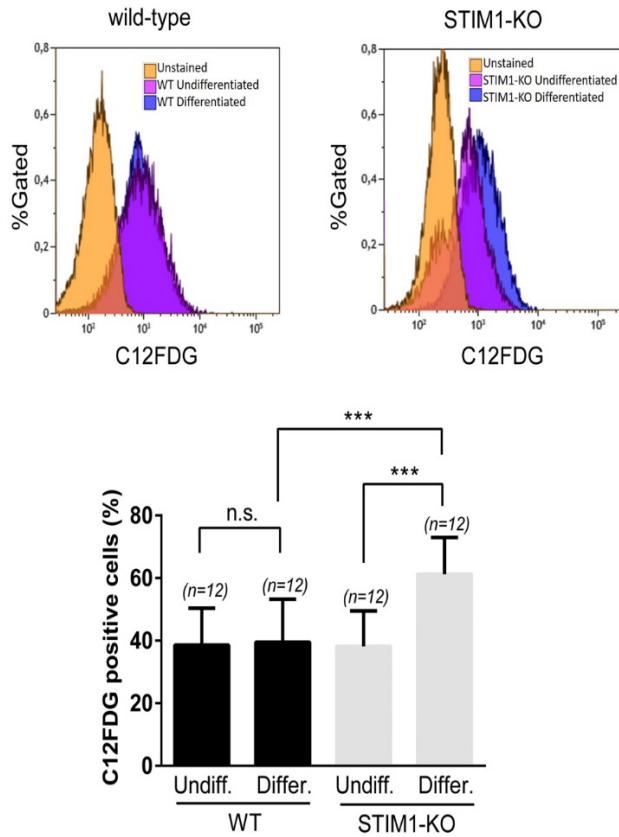


Figura 24. Medida de la senescencia celular con C12FDG en células SH-SY5Y WT y STIM1-KO. Ambas líneas celulares, indiferenciadas y diferenciadas (6 DIV) se incubaron con C12FDG 1 μ M y se analizaron por citometría de flujo para evaluar la senescencia celular. Los paneles de la parte superior muestran histogramas de datos representativos de células sin teñir como control negativo (naranja), células indiferenciadas (violeta) y células diferenciadas tras 6 DIV (azul). El eje y representa el número de células normalizado, y el eje x muestra la intensidad de fluorescencia emitida por el producto de la β -galactosidasa. El panel inferior muestra los datos de 4 experimentos independientes (media \pm s.d.; *** p <0.001).

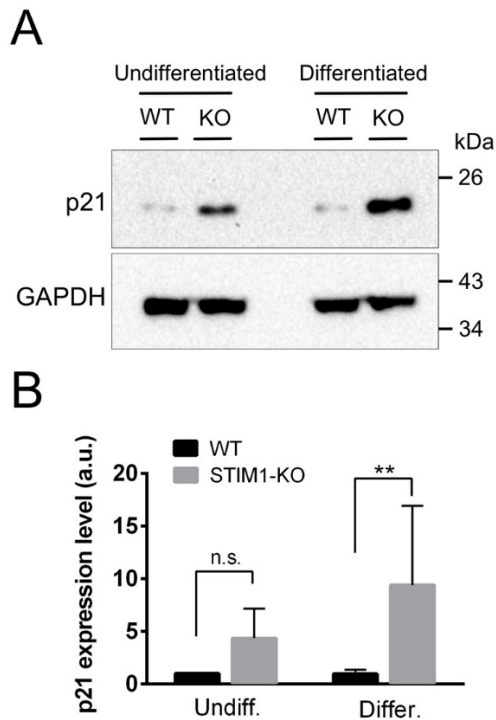


Figura 25. Incremento de expresión de p21 en células STIM1-KO. En el panel A se muestra un inmunoblot de p21 realizado a partir de lisados de células SH-SY5Y WT y STIM1-KO indiferenciadas (48 h en medio de crecimiento) y diferenciadas (6DIV), utilizando GAPDH como control de carga. En el panel B se presentan los datos de la cuantificación de la expresión de p21 a partir de 4 experimentos independientes (media \pm s.d.; (** p <0.01).

6. CONCENTRACIÓN DE Ca^{2+} LIBRE CITOSÓLICO EN CÉLULAS STIM1-KO.

Tras observar que la ausencia de la proteína STIM1 provocaba un notable déficit en la actividad SOCE de los neuroblastos SH-SY5Y, además de incrementar los niveles de senescencia durante la diferenciación neuronal, nos planteamos estudiar los niveles de concentración de Ca^{2+} citosólico basal para comprobar el efecto de la ausencia de STIM1 sobre este importante parámetro. En este sentido, células SH-SY5Y WT y STIM1-KO se cultivaron durante 48 horas, se cargaron con fura-2 y se monitorizaron por epifluorescencia, primero en medio con Ca^{2+} (1.26 mM) y posteriormente en medio libre de Ca^{2+} para evaluar la entrada de Ca^{2+} extracelular en condiciones de reposo (Figura 26). Los resultados indicaron que la ausencia de STIM1 provocaba un descenso en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, variando desde $77.1 \text{ nM} \pm 10 \text{ nM}$ para células WT hasta $44 \pm 4.4 \text{ nM}$ en células STIM1-KO, demostrando un impacto directo de STIM1 en el control de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal en este tipo celular.

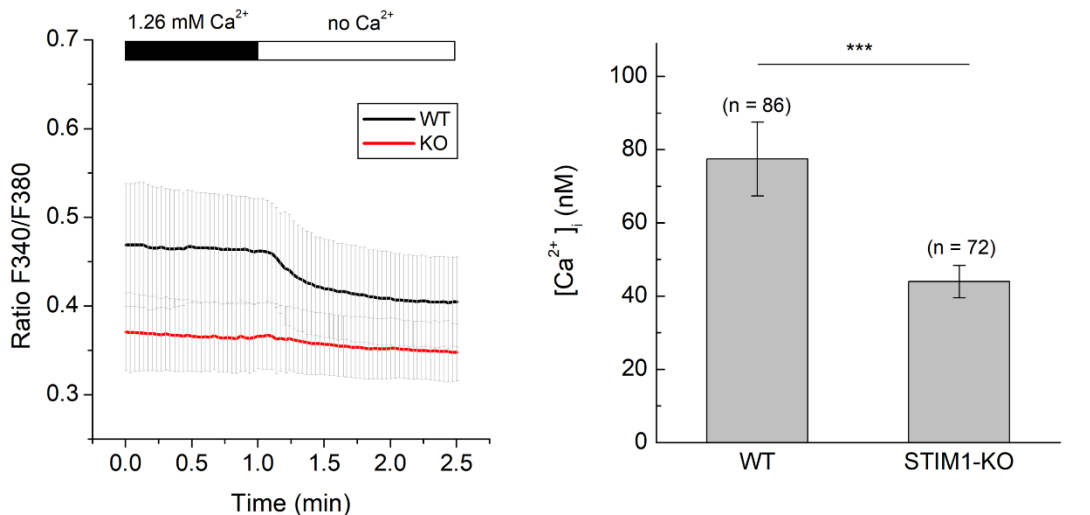


Figura 26. Concentración de Ca^{2+} libre citosólico basal en células WT y STIM1-KO. En el panel de la izquierda se muestra el registro del ratio F_{340}/F_{380} de células cargadas con fura-2 e incubadas en medio HBSS con Ca^{2+} (1.26 mM) en primer lugar y a continuación en medio HBSS libre de Ca^{2+} . En el panel de la derecha se representan los valores de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en condiciones de reposo en HBSS con Ca^{2+} para células WT ($77.1 \text{ nM} \pm 10 \text{ nM}$) y células STIM1-KO ($44 \pm 4.4 \text{ nM}$). Los datos se representan como la media \pm s.d. de 3 experimentos independientes ($n = 86$ células wild-type; $n = 72$ células STIM1-KO) (***) $p < 0.001$).

7. ENTRADA DE Ca^{2+} A TRAVÉS DE VOCCS Y MUERTE CELULAR EN STIM1-KO.

En la Introducción de esta memoria explicamos que la proteína STIM1 es un regulador esencial de SOCE al activar canales SOCs como ORAI1, pero además funciona como regulador negativo de canales VOCCs tipo L como el $\text{Ca}_v1.2$ (Park et al., 2010) y tipo T como el $\text{Ca}_v3.1$ (Nguyen et al., 2013), inhibiendo la entrada de Ca^{2+} a través de estos canales y promoviendo su proteólisis. Así, es plausible la hipótesis de que ante la ausencia de la proteína STIM1 se podría perder este control recíproco de canales responsables de la entrada Ca^{2+} extracelular y estimular algún proceso que condujera finalmente a la muerte celular. Por ello, buscando el mecanismo molecular responsable del descenso en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal y de la senescencia y muerte celular observadas tras la pérdida de STIM1. De este modo, nos planteamos que podría existir una alteración en la movilización del Ca^{2+} debido a una alteración en los niveles de expresión y/o actividad de estos canales de Ca^{2+} operados por voltaje.

7.1. La ausencia de STIM1 incrementa los niveles de expresión del canal CACNA1C ($\text{Ca}_v1.2$).

Por todo ello evaluamos los niveles de expresión del canal $\text{Ca}_v1.2$ (producto del gen *CACNA1C*) en la línea celular STIM1-KO, a nivel de mRNA y a nivel proteico. A partir de cultivos celulares parentales y STIM1-KO realizamos una extracción de RNA total y seguidamente se analizó la abundancia relativa de transcritos del gen *CACNA1C* en cada línea celular mediante PCR cuantitativa (qPCR). Como control del experimento se analizó el número de transcritos para los genes *GAPDH*, *HPRT1* y *GUSB* (*housekeeping genes*) (Figura 27).

El análisis de qPCR permitió certificar que la ausencia de STIM1 conducía a un incremento en la cantidad de transcritos para el gen *CACNA1C*, cuyo producto es el canal $\text{Ca}_v1.2$. El siguiente paso, fue evaluar si este incremento de expresión a nivel de mRNA se producía también a nivel proteico. Mediante inmunoblot analizamos los niveles de expresión de $\text{Ca}_v1.2$ en células WT y STIM1-KO, utilizando lisados totales obtenidos a partir de cultivos celulares de células indiferenciadas y diferenciadas. Como control de carga se evaluó el nivel de expresión de GAPDH. Los datos mostrados en la Figura 28 demuestran que existe un mayor nivel de $\text{Ca}_v1.2$ en células STIM1-KO, en consonancia con el incremento en el nivel de mRNA observado en la figura anterior.

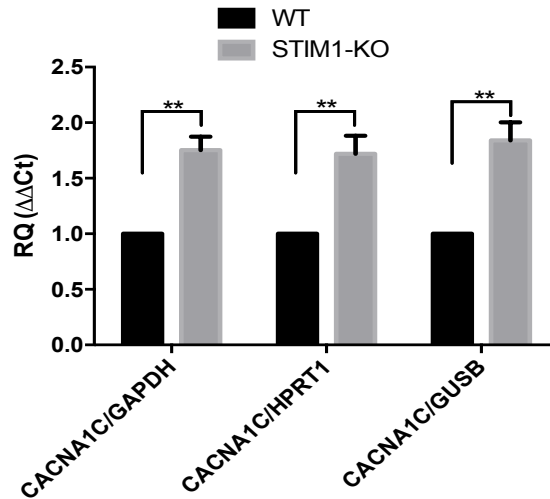


Figura 27. Las células **STIM1-KO** presentan mayores niveles de mRNA para el gen **CACNA1C** que las células **WT**. Las muestras de RNA total procedentes de neuroblastos wild-type y **STIM1-KO** se analizaron por qPCR utilizando primers específicos para los transcritos del gen **CACNA1C**. La gráfica muestra la cantidad relativa de transcritos de **CACNA1C** en células **WT** (negro) y **STIM1-KO** (gris) normalizados respecto al número de transcritos de tres genes control como **GAPDH**, **HPRT1** y **GUSB**. Los datos representan la media \pm s.d. de 2 experimentos independientes, cada uno de ellos con muestras analizadas por triplicado (** $p < 0.01$).

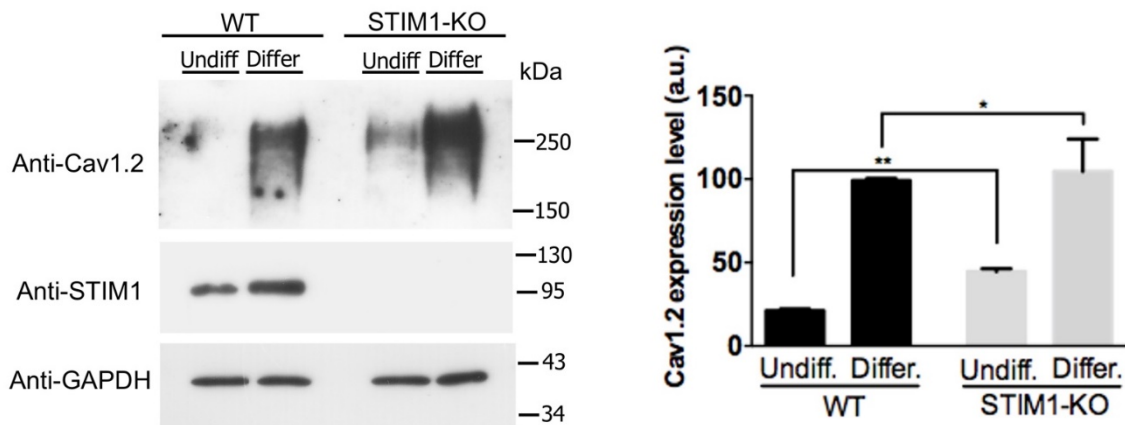


Figura 28. Incremento de expresión de **Cav1.2** en células **STIM1-KO**. En el panel izquierdo se muestra el nivel de expresión de **Cav1.2**, en neuroblastos parentales y **STIM1-KO**, evaluado mediante inmunoblot a partir de lisados celulares obtenidos de células indiferenciadas y diferenciadas (9 DIV) y utilizando 40 μ g de proteína total. Se analizó el nivel de expresión de **GAPDH** como control de carga del inmunoblot. En el panel derecho se muestra la cuantificación de los niveles de expresión de **Cav1.2** para las distintas condiciones. Los datos representan la media \pm s.d. (normalizada con respecto a los valores de células **WT** diferenciadas) de 2 ensayos independientes (** $p < 0.01$; * $p < 0.05$).

7.2. Las células STIM1-KO presentan una sobreactivación del canal Cav1.2.

Tras comprobar que el déficit de STIM1 en neuroblastos SH-SY5Y provoca un incremento de expresión del canal Cav1.2 tanto a nivel de mRNA como de proteína, pasamos a evaluar si la actividad de este canal también se encontraba alterada en células STIM1-KO con respecto a las células parentales. Este hecho podría desencadenar una disrupción de la homeostasis del Ca^{2+} , que podría explicar el incremento de la senescencia y muerte celular observado en las células SH-SY5Y deficientes en STIM1. Para comprobar esta hipótesis, medimos la entrada Ca^{2+} extracelular en respuesta a la despolarización, empleando 1 minuto de despolarización inducida por KCl 90 mM (Figura 29) en células WT y STIM1-KO cargadas con fura-2. Adicionalmente, determinamos el nivel de entrada de Ca^{2+} inhibible por nifedipina 10 μM , una concentración del inhibidor que bloquea la entrada de Ca^{2+} a través de los VOCCs tipo L (Gutierrez-Martin et al., 2002, Garcia-Bereguain et al., 2008), con objeto de valorar el nivel de entrada de Ca^{2+} de forma específica a través de esta familia de canales de Ca^{2+} . Así los resultados mostrados en la Figura 29 reflejaron que la entrada de Ca^{2+} sensible a nifedipina era tres veces superior en las células STIM1-KO con respecto a la línea parental.

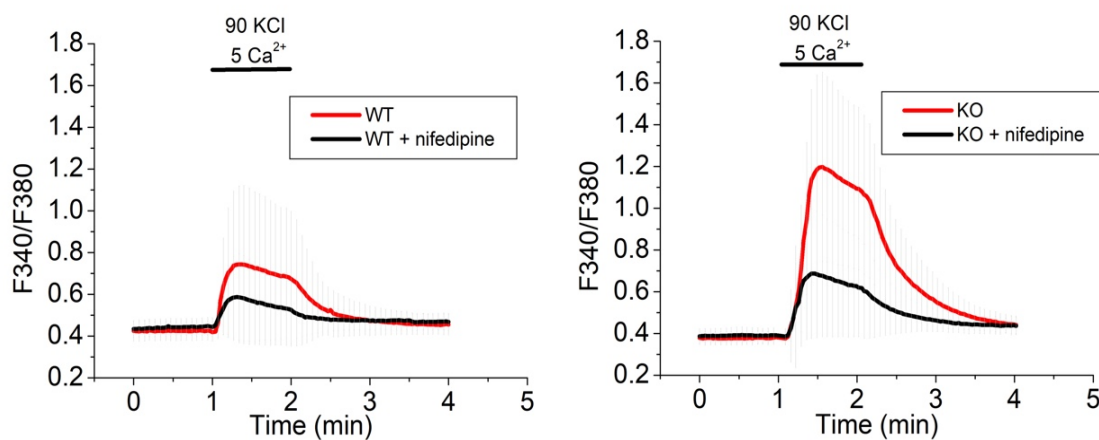


Figura 29. Incremento de entrada de Ca^{2+} a través de VOCCs tipo L en neuroblastos. Medida de la concentración de Ca^{2+} libre citosólico en células WT (panel izquierdo) y STIM1-KO (panel derecho). Las células cargadas con fura-2 se monitorizaron en medio HBSS con Ca^{2+} 1.26 mM induciendo una despolarización por KCl 90 mM durante 1 minuto (línea roja). La concentración de CaCl_2 en el medio HBSS se incrementó hasta 5 mM durante la despolarización para favorecer el registro de la entrada de Ca^{2+} . Cuando se requirió se añadió nifedipina 10 μM al medio de ensayo (línea negra). Los datos se representan como media \pm s.d. de 4 experimentos independientes (con un mínimo de 70 células por condición experimental).

Por otro lado, evaluamos la contribución de otros canales VOC a la entrada de Ca^{2+} en células STIM1-KO. Para ello, realizamos el mismo experimento de despolarización con KCl 90 mM en presencia de diferentes inhibidores conocidos de VOCCs. Ni ω -conotoxina MVIIC (un inhibidor de canales tipo N-, P- y Q-), ni ML218 (inhibidor específico para canales tipo T), suprimieron el incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ observado en células STIM1-KO en respuesta a despolarización por KCl 90 mM (Figura 30), lo que sugiere que el incremento del influjo de Ca^{2+} en células STIM1-KO en respuesta a la despolarización se debe solamente a canales VOC tipo L.

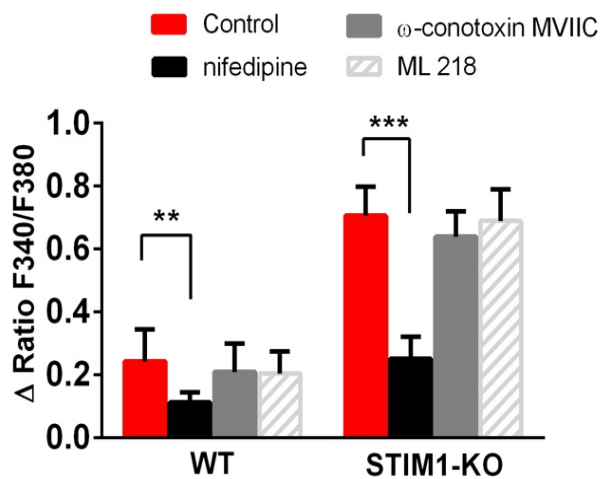
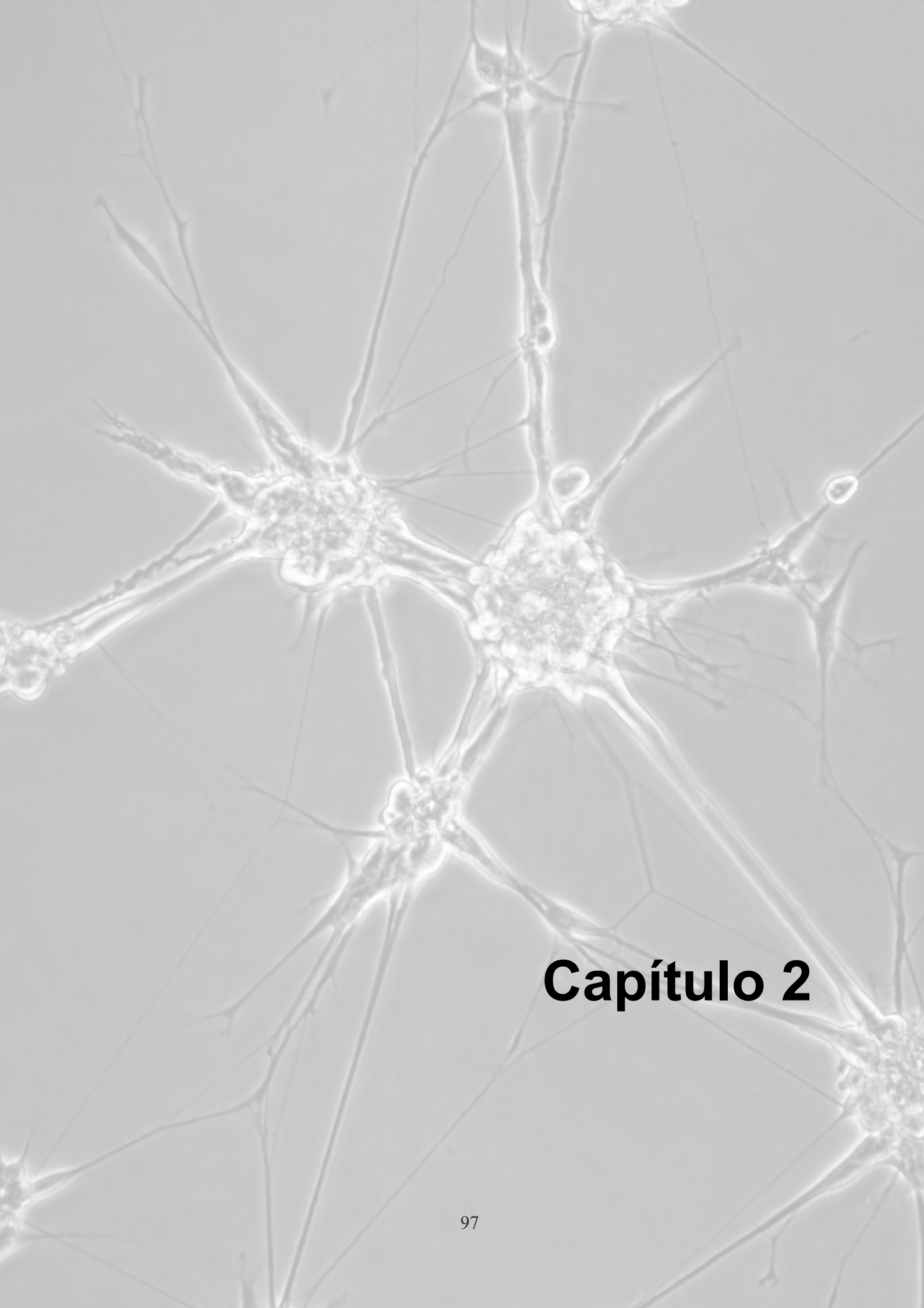


Figura 30. Sensibilidad del influjo de Ca^{2+} estimulado por despolarización a inhibidores de VOCCs. Se muestra el incremento del ratio $\text{F}_{340}/\text{F}_{380}$ en células WT y células KO tras despolarización mediada por KCl 90 mM en el medio de ensayo, y en presencia de distintos inhibidores de VOCCs: nifedipina (10 μM), ω -conotoxina MVIIC (1 μM), ML218 (3 μM), así como una condición sin inhibidor (barras rojas). Los datos se representan como media \pm s.d. de 3 experimentos independientes (con un mínimo de 50 células por condición experimental) (** $p < 0.01$); (** $p < 0.001$)).

Por tanto, todos los resultados mostrados hasta ahora sugieren que la deficiencia de STIM1 en células SH-SY5Y no sólo reduce el influjo de Ca^{2+} extracelular a través de los canales SOC, sino que también está relacionada con una alteración en la homeostasis de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Nuestros resultados muestran que la ausencia de STIM1 no afecta a la viabilidad de neuroblastos SH-SY5Y; sin embargo, en células STIM1-KO diferenciadas se observó un notable descenso de la viabilidad y un incremento en senescencia, que podría estar relacionado con un incremento en la expresión del canal $\text{Ca}_v1.2$, una hipótesis que se evalúa en un capítulo posterior de esta Tesis Doctoral.



Capítulo 2

En la Introducción de este trabajo hemos mostrado que orgánulos subcelulares como el RE y la mitocondria desempeñan un papel muy importante en la movilización y mantenimiento de la homeostasis de Ca^{2+} . Además, alteraciones funcionales en estos reservorios intracelulares de Ca^{2+} se han relacionado con diversas patologías neurodegenerativas. Por otro lado, el principal ensayo de viabilidad celular utilizado en este estudio (reducción de MTT) se basa en la actividad de enzimas deshidrogenasas, en su mayoría mitocondriales. La baja actividad de estas enzimas en células deficientes en STIM1 sugiere que una disfunción mitocondrial podría ser desencadenante de la muerte celular observada durante la diferenciación neuronal de células SH-SY5Y STIM1-KO, hipótesis que se estudia en este capítulo.

1. EL DÉFICIT DE STIM1 ALTERA EL POTENCIAL DE MEMBRANA INTERNA MITOCONDRIAL.

La disfunción mitocondrial conlleva a menudo la alteración del potencial de membrana interna de este orgánulo, comprometiendo la viabilidad celular. La despolarización provoca la incapacidad de generar altas tasas de ATP, lo que conlleva la liberación de factores que inducen muerte celular. En este trabajo hemos evaluado el potencial de membrana mitocondrial mediante el uso de diversas sondas específicas cuya carga positiva permite su acumulación en el interior electronegativo mitocondrial.

1.1. Medida del potencial de membrana interna mitocondrial con JC-1.

En un primer lugar se determinó el potencial de membrana en células parentales y células STIM1-KO empleando la sonda JC-1, que en mitocondrias activas es detectable en forma de agregados de color anaranjado, mientras que en aquellas mitocondrias dañadas, con disminución del potencial de membrana, la sonda se presenta como monómeros con fluorescencia verde. Ambas líneas celulares se cultivaron en medio de crecimiento durante 48 horas, y a continuación se incubaron con JC-1 5 μM durante 30 minutos a 37°C en medio Leibovitz's L-15 libre de bicarbonato con FBS 10% y se monitorizaron para capturar imágenes por epifluorescencia. Posteriormente se cuantificó el número de agregados y monómeros de JC-1 para cada línea celular (Figura 31), observándose un menor número de agregados de JC-1 en las células STIM1-KO, lo que sugería una pérdida del potencial de membrana mitocondrial en estas células.

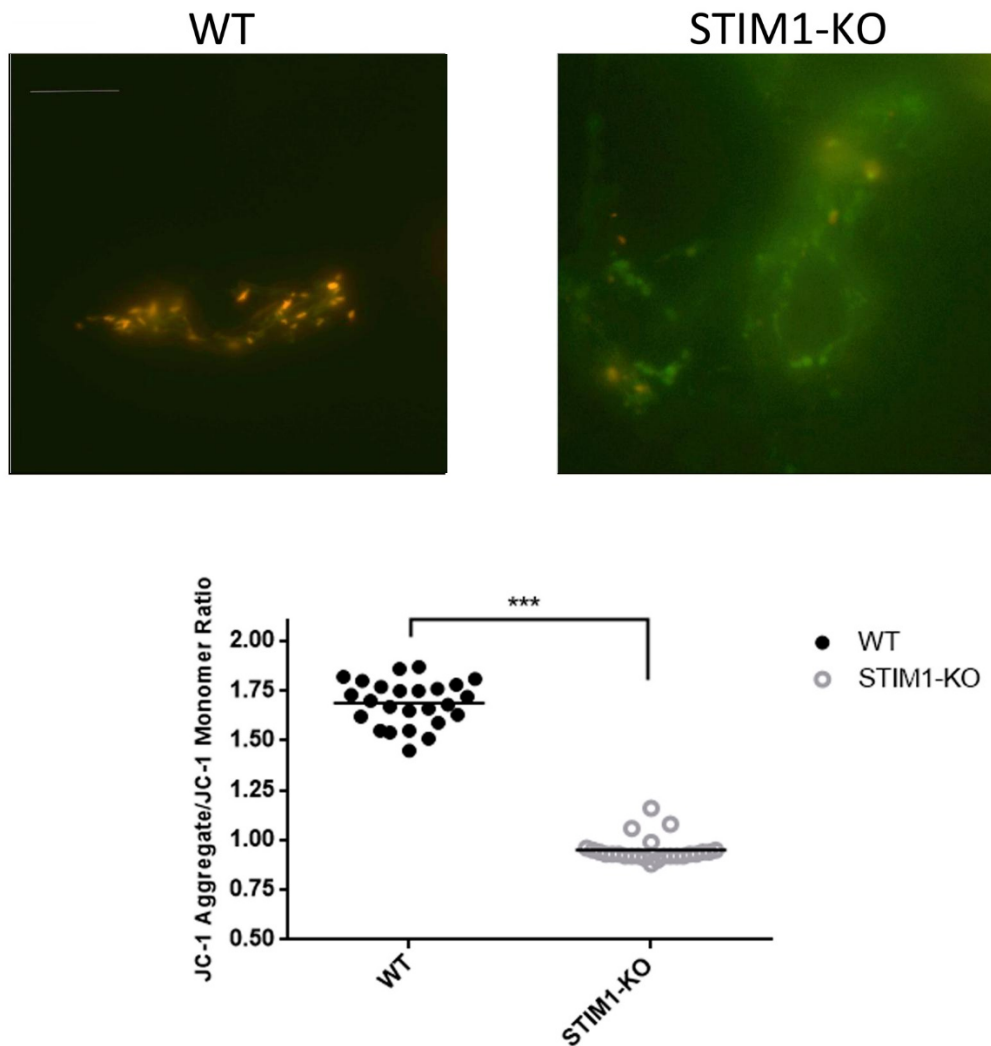


Figura 31. Medida del potencial de membrana interna mitocondrial con JC-1. Las células SH-SY5Y wild-type (WT) y STIM1-KO se cultivaron durante 48 h en medio de crecimiento, se incubaron con JC-1 5 μ M en medio Leibovitz's L-15 con suero y se monitorizaron por epifluorescencia. En la parte superior, se observan imágenes de células WT (izquierda) y STIM1-KO (derecha) teñidas con JC-1 (escala = 10 μ m). En el panel inferior, se evaluó el ratio agregado/monómero de JC-1 (eje y) para las imágenes de células WT y STIM1-KO. Cada punto de la gráfica representa el ratio de una célula (n = 25 células por condición experimental, ***p<0.001).

1.2. Análisis del potencial de membrana interna mitocondrial con TMRM.

Tras comprobar que las células STIM1-KO tienen alterado el potencial de membrana interno mitocondrial, evaluamos este potencial de membrana con un método alternativo: la sonda tetrametilrodamina metil éster (TMRM). Células WT y STIM1-KO indiferenciadas y diferenciadas (6 DIV) se incubaron con TMRM 2 nM durante 30 minutos a 37°C en PBS con BSA 1%, y se tiñeron con Hoechst 33258 1 μ M con el fin de excluir las células muertas de la evaluación posterior. Estas células se analizaron por citometría

de flujo y se cuantificó el porcentaje de células positivas para la fluorescencia de TMRM en cada condición experimental. Los resultados indicaron un descenso significativo en el porcentaje de células positivas para TMRM en la condición STIM1-KO diferenciadas (Figura 32), lo cual indica una fuerte disminución del potencial de membrana mitocondrial en células diferenciadas y deficientes en STIM1.

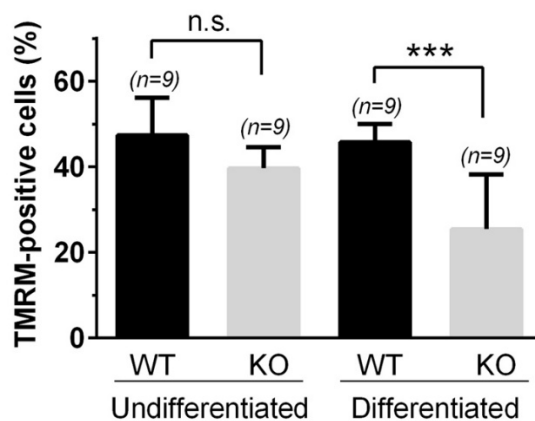


Figura 32. Análisis del potencial de membrana mitocondrial con TMRM.

Células WT (barras negras) y STIM1-KO (barras grises) indiferenciadas y diferenciadas (6 DIV) se tiñeron con TMRM 2 nM en PBS con BSA 1% y se analizaron por citometría de flujo para cuantificar la fracción de células positivas para TMRM (eje y). Los datos representan la media \pm s.d. de 3 experimentos independientes (** $p < 0.001$), con un triplicado de muestras por experimento ($n = 9$), utilizándose >20.000 células por muestra.

Además, para evaluar la especificidad de tinción con TMRM, ambas líneas celulares se analizaron en presencia del desacoplante mitocondrial FCCP ($10 \mu\text{M}$) tanto por citometría de flujo como con microscopía confocal. Para el análisis de citometría de flujo (Figura 33B) se utilizaron las mismas condiciones que en el ensayo anterior, mientras que para el ensayo de microscopía confocal las células se cultivaron en cubreobjetos, se incubaron con TMRM 10 nM durante 30 minutos a 37°C en PBS con BSA 1% y se tiñeron Hoechst 33342 $1 \mu\text{M}$ para facilitar la visualización de los núcleos. Finalmente, se adquirieron imágenes durante 5-10 minutos con intervalos de 2 minutos (Figura 33A). Los resultados de ambos experimentos confirmaron un descenso en la polarización de la membrana interna mitocondrial cercano al 45% en las células STIM1-KO con respecto a las WT, lo que nos indica que el déficit de STIM1 viene acompañado de una notable disfunción mitocondrial en estas células.

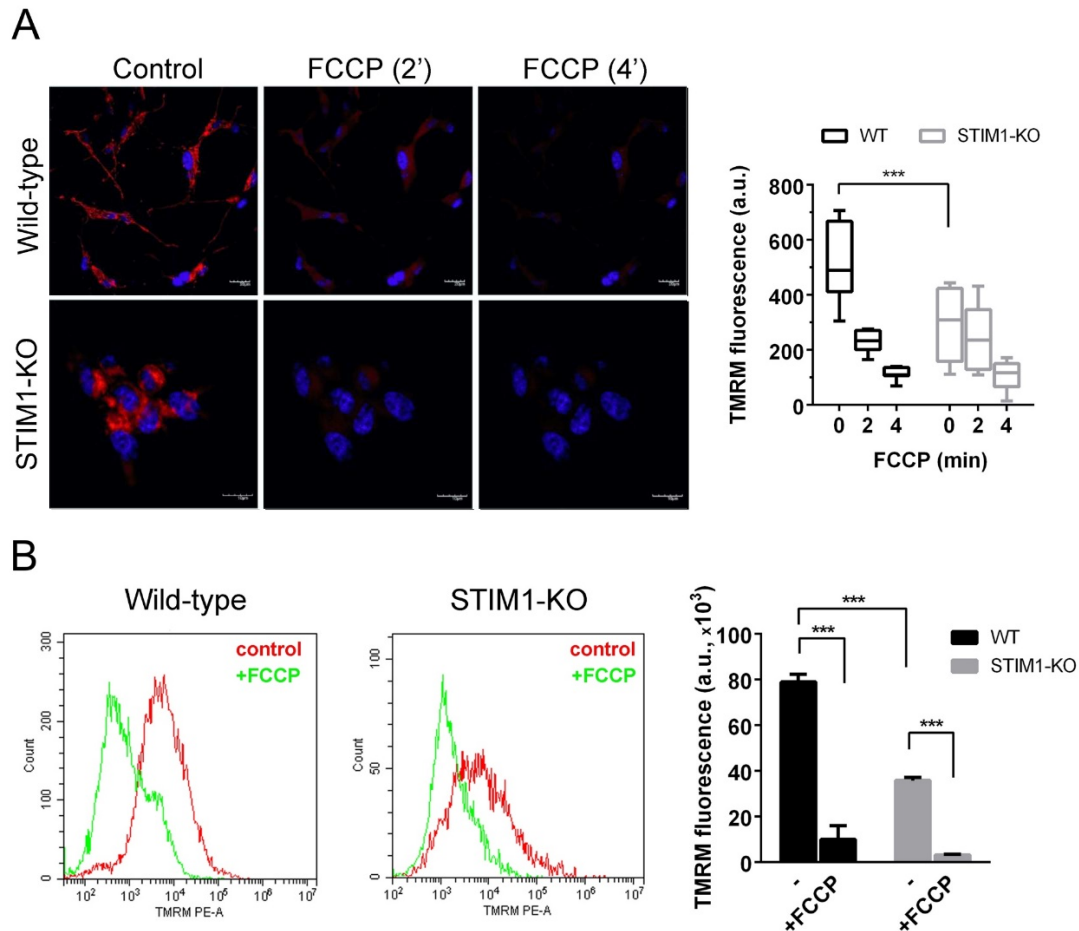


Figura 33. Medida de la polarización mitocondrial con TMRM. Células WT y STIM1-KO diferenciadas (6 DIV) se tiñeron con TMRM 10 nM (microscopía confocal, panel A) o TMRM 2 nM (citometría de flujo, panel B). *Panel A:* células cultivadas en cubreobjetos y teñidas con TMRM se visualizaron por microscopía confocal para evaluar la intensidad de tinción con TMRM. A continuación, se añadió FCCP 10 μ M para examinar la tinción no específica y la pérdida de señal debida a despolarización mitocondrial tras 2 y 4 minutos. Se utilizó Hoechst 33342 para la tinción de núcleos (azul) (panel izquierdo, escala = 20 μ m). Se cuantificó la intensidad de fluorescencia por TMRM en distintas regiones y los datos se muestran en el panel derecho (media \pm s.d. de 2 experimentos independientes, *** p <0.001). *Panel B:* células teñidas con TMRM se analizaron por citometría de flujo en condiciones basales y 10 minutos después de la adición de FCCP 10 μ M. En el panel izquierdo, los histogramas reflejan el número de células (eje y) y la intensidad de fluorescencia (eje x) para células WT y STIM1-KO antes y después de la adición de FCCP. Los datos de fluorescencia total (eje y) se muestran en el panel derecho (media \pm s.d. para 2 experimentos independientes, *** p <0.001).

2. ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA MITOCONDRIAL CON RODAMINA 123.

Tras comprobar con los experimentos anteriores que las células STIM1-KO diferenciadas presentan una pérdida significativa de la polarización en la membrana interna mitocondrial, nos planteamos examinar la morfología de las mitocondrias de ambas líneas celulares y de este modo evaluar si la alteración del potencial de membrana mitocondrial se traduce también en un cambio morfológico. Para ello, empleamos rodamina 123, una sonda que presenta una base química similar a las sondas empleadas en los ensayos anteriores y que nos permite la visualización de las mitocondrias por epifluorescencia.

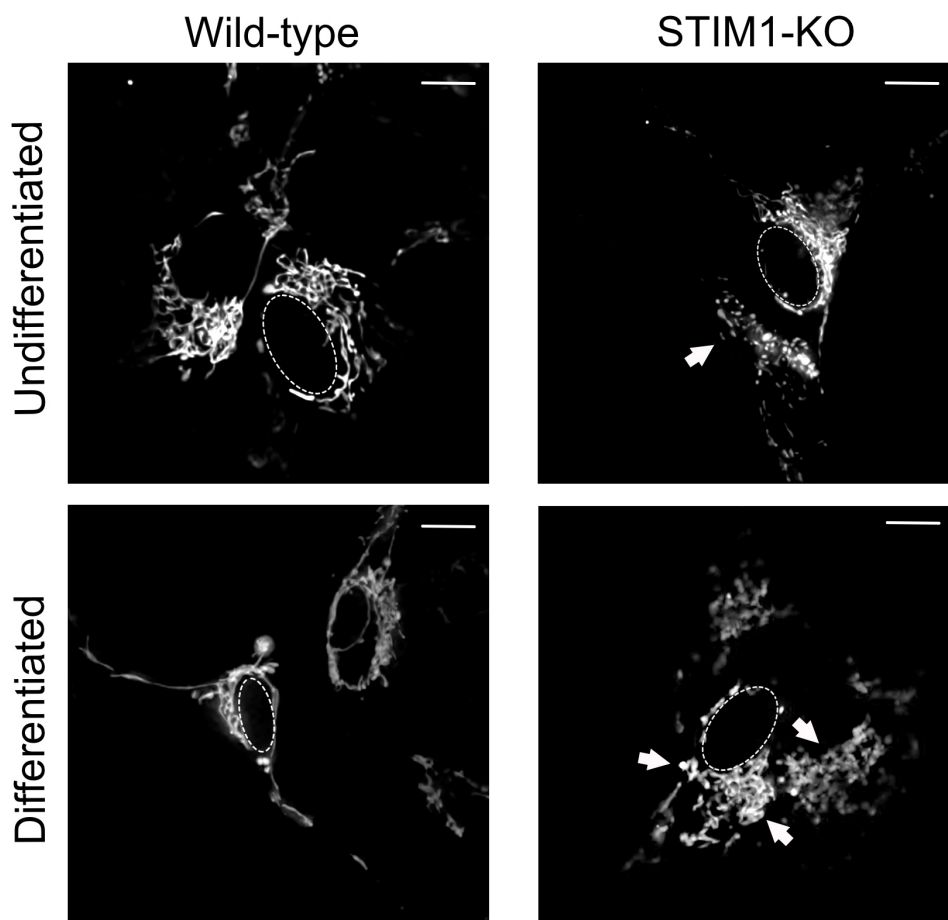


Figura 34. Análisis de la morfología mitocondrial por tinción con rodamina 123. Células WT y STIM1-KO indiferenciadas (paneles superiores) y diferenciadas (paneles inferiores) se tiñeron con rodamina 123 5 μM en medio Leibovitz's L-15 y se monitorizaron por epifluorescencia a través de un objetivo Plan Achromat 100x (NA 1.45) de aceite de inmersión. Las imágenes adquiridas en secciones del eje z de 0.2 μm , se deconvolucionaron y se realizó la proyección total de las mismas. Se muestran imágenes representativas (escala = 10 μm) de dos experimentos independientes (> 20 células por condición). Las líneas discontinuas marcan la localización de la envoltura nuclear de las células.

Células WT y STIM1-KO indiferenciadas y diferenciadas (6 DIV) se sembraron en cubreobjetos y se incubaron con rodamina 123 5 μ M en medio Leibovitz's L-15 libre de bicarbonato durante 10 minutos a 37°C y se visualizaron por epifluorescencia para la adquisición de imágenes (Figura 34).

Con el análisis de las imágenes de la Figura 34 podemos confirmar que las células deficientes en STIM1 muestran una extensiva fisión mitocondrial (las zonas de fisión se indican en la figura con flechas blancas), siendo esta fisión más notable en las células STIM1-KO diferenciadas.

3. PERFIL DE PROTEÍNAS MITOCONDRIALES EN CÉLULAS WT/STIM1-KO.

Puesto que todos los ensayos anteriores indican que las células SH-SY5Y STIM1-KO presentan un notable daño mitocondrial, analizamos la expresión de diferentes proteínas mitocondriales para valorar posibles explicaciones a la muerte celular observada. De este modo, a partir de lisados totales de células WT y STIM1-KO no diferenciadas (48 h en medio de crecimiento) y diferenciadas (6 DIV) se analizó por inmunoblot la expresión de proteínas de membrana interna mitocondrial (ATPB, COXIV), membrana externa (MFN2, OPA1, Tom20) o matriz mitocondrial (HSP60, PDH). A partir de este análisis (Figura 35), comprobamos que no existían diferencias significativas en la expresión de las proteínas analizadas en células WT y STIM1-KO, indiferenciadas o diferenciadas, exceptuando que en células STIM1-KO diferenciadas se observaba una pequeña disminución en la expresión de la proteína COXIV, que constituye una de las subunidades del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial.

Debido al descenso de expresión de COXIV observado en células STIM1-KO, nos planteamos evaluar si existía alguna alteración en los niveles de expresión de otras proteínas pertenecientes a los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial. Para ello, se analizaron por inmunoblot lisados totales de células WT y STIM1-KO no diferenciadas y diferenciadas (6 DIV) utilizando el cocktail de anticuerpos "Total OXPHOS" (AbCam#110413) (Figura 36). Esta mezcla de anticuerpos reconoce subunidades proteicas de los diferentes complejos de la cadena respiratoria mitocondrial: NDUFB8 (complejo I, CI), SDHB (complejo II, CII), UQCRC2 (complejo III, CIII), MTCO1 (complejo IV, CIV) y ATP5A (complejo V, CV).

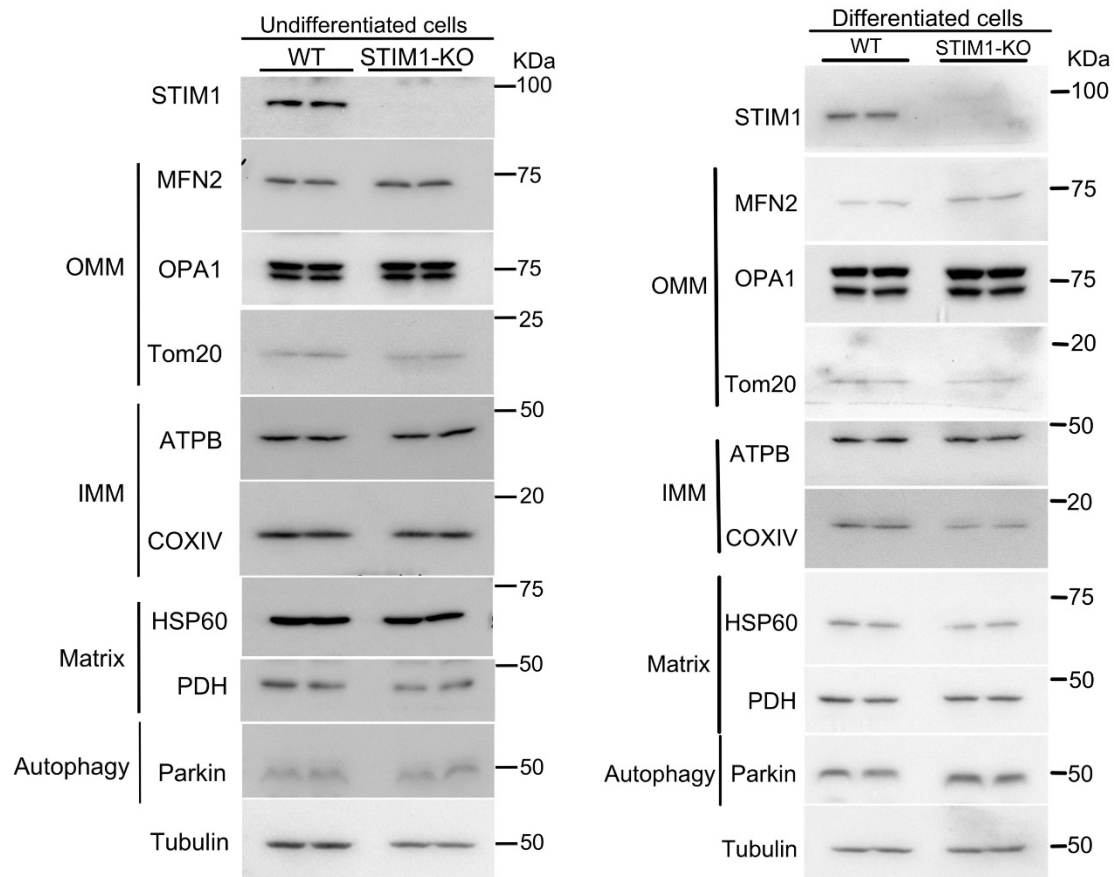


Figura 35. Análisis de expresión de proteínas mitocondriales en células SH-SY5Y wild-type y STIM1-KO. El nivel de expresión de proteínas mitocondriales de membrana externa (OMM = MFN2, OPA1, Tom20), membrana interna (IMM = ATPB, COXIV), matriz mitocondrial (Matrix = HSP60, PDH), así como de Parkin, implicada en procesos autofágicos, se evaluó mediante inmunoblot a partir de lisados celulares obtenidos de células indiferenciadas (panel izquierdo) y diferenciadas (6 DIV; panel derecho) de ambas líneas celulares. El nivel de expresión de tubulina fue analizado como control de carga de los inmunoblots.

A partir de los resultados mostrados en la Figura 36 podemos concluir que sólo existen diferencias en la expresión proteica para NDUFB8, una subunidad accesoria del complejo NADH deshidrogenasa (o complejo I) y que muestra una menor expresión en células STIM1-KO diferenciadas. Debido a la relevancia de este dato nos planteamos determinar la actividad del complejo I a partir de lisados celulares de las dos condiciones experimentales.

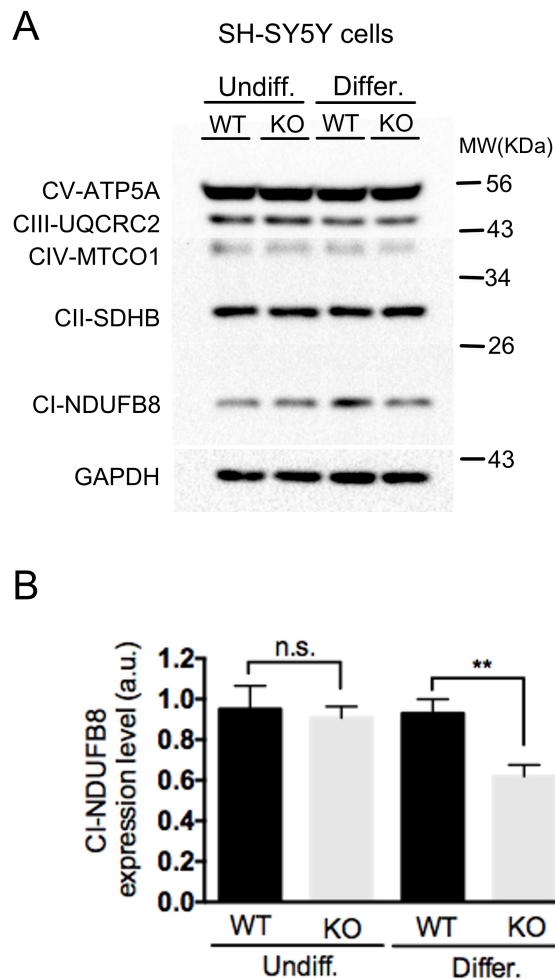


Figura 36. Análisis de proteínas de los complejo I-V de la cadena respiratoria mitocondrial. *Panel A:* Los niveles de expresión de proteínas pertenecientes a los distintos complejos de la cadena respiratoria mitocondrial (NDUFB8 (CI), SDHB (CII), UQCRC2 (CIII), MTCO1 (CIV) y ATP5A (CV) se evaluaron por inmunoblot a partir de lisados celulares obtenidos de células SH-SY5Y indiferenciadas y diferenciadas (6 DIV), utilizando el anticuerpo comercial Total OXPHOS. El nivel de expresión de GAPDH fue empleado como control de carga del inmunoblot. *Panel B:* Cuantificación del nivel de expresión para NDUFB8 (subunidad del complejo I) a partir de 3 ensayos independientes (media \pm s.d.; ** $p < 0.01$).

4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL COMPLEJO I MITOCONDRIAL.

Una adecuada polarización de la membrana interna mitocondrial es debida a un transporte eficiente de electrones dentro de la cadena respiratoria mitocondrial. Por ello, tras observar que las células deficientes en STIM1 muestran una alteración del potencial de membrana mitocondrial y un descenso en la expresión de la subunidad NDUFB8 del complejo I de la cadena de transporte, decidimos evaluar la actividad de este complejo (NADH ubiquinona oxidorreductasa), ya que representa la actividad NADH oxidasa más importante de la mitocondria. Para esta medida se empleó la quinona CoQ1 (50 μ M) como aceptor de electrones, en presencia de NADH 75 μ M como donador de electrones. A continuación, se añadieron lisados de células WT o STIM1-KO diferenciadas (6 DIV) y se registró la absorbancia a 340 nm durante 10 minutos. Finalmente, se añadieron 10 μ g de rotenona, inhibidor del complejo I, y se registró la absorbancia durante 10 minutos adicionales para comprobar la actividad sensible e insensible a rotenona. Los resultados de esta medida nos indican que existe una disminución de actividad del complejo I,

superior al 50%, en células STIM1-KO diferenciadas con respecto a células WT diferenciadas (Figura 37).

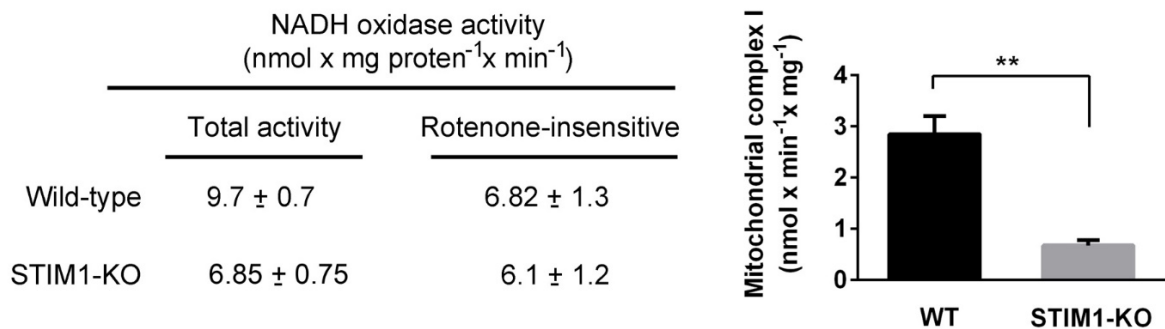


Figura 37. Medida de la actividad del complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. La actividad total e insensible a rotenona de la NADH oxidasa se determinó a partir de lisados de células SH-SY5Y WT y STIM1-KO diferenciadas (6 DIV). En el panel de la izquierda, se representan los datos como media ± s.d. a partir de 2 experimentos independientes. En el panel de la derecha, se muestra la diferencia entre la actividad total y la actividad remanente tras la adición de rotenona al ensayo, es decir, la actividad NADH oxidasa sensible a rotenona que es dependiente del complejo I (**p<0.01).

5. LA DEFICIENCIA EN STIM1 PROVOCA UN DESCENSO EN LA CONCENTRACIÓN DE Ca²⁺ MITOCONDRIAL.

La carga negativa del potencial de membrana viene establecida por la cadena respiratoria mitocondrial y modula a otros procesos importantes, como la captación de Ca²⁺ a través del uniportador de Ca²⁺ mitocondrial (MCU) (Patron et al., 2013). En este sentido y en base a los resultados mostrados en las anteriores figuras, nos planteamos determinar la concentración de Ca²⁺ mitocondrial ([Ca²⁺]_{mito}), así como los niveles de expresión de MCU en ambas líneas celulares. Para la medida de la [Ca²⁺]_{mito} seguimos el método de (Palmer and Tsien, 2006). Las células WT y STIM1-KO se transfectaron con el sensor de Ca²⁺ 4mtD3-cpv, que combina los fluoróforos CFP/YFP. Las células se sembraron en cubreobjetos y transcurridas 48 horas desde la transfección se registró la fluorescencia emitida por los canales CFP, FRET e YFP en medio HBSS con CaCl₂ 1.26 mM. Tras la evaluación de la señal máxima y mínima para cada experimento, y siguiendo los cálculos indicados en el punto 11.2 de Materiales y Métodos, se determinó la [Ca²⁺]_{mito} (Figura 38).

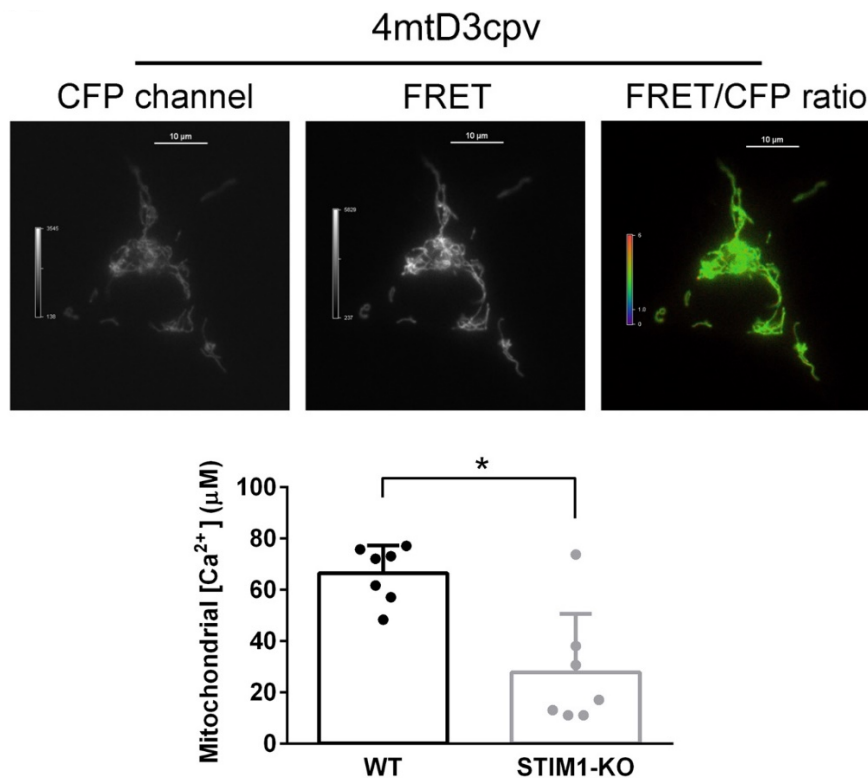


Figura 38. Medida de la concentración de Ca²⁺ mitocondrial. Células SH-SY5Y WT y STIM1-KO se transfectaron de manera transitoria para la expresión del sensor de Ca²⁺ 4mtD3cpv y 48 h después se registró la emisión de fluorescencia de los canales CFP, FRET (imagen izquierda y central en la figura) e YFP, para monitorizar la transferencia de energía. En la parte inferior, se representa la [Ca²⁺]_{mito} para ambas líneas celulares. Para ello, se registró la señal del ratio FRET/CFP en células en medio HBSS con Ca²⁺ durante 4-5 minutos. La calibración del ratio FRET/CFP para calcular la R_{min} y R_{max} se llevó a cabo de manera individual para cada ensayo. En la gráfica los datos se muestran como media ± s.d. de 7 experimentos independientes (*p<0.05).

La Figura 38 muestra que las células deficientes en STIM1 presenta una [Ca²⁺]_{mito} aproximadamente un 60% inferior a la observada en células wild-type (27.8 ± 22.8 μM para STIM1-KO frente a 66.4 ± 10.9 μM de las WT). Tras comprobar que las células STIM1-KO presentaban un notable déficit en la [Ca²⁺]_{mito}, evaluamos el nivel de expresión de MCU por inmunoblot a partir de lisados totales de células WT y STIM1-KO indiferenciadas (48 h en medio de crecimiento) y diferenciadas (12 DIV). A partir de este análisis, no se observaron diferencias significativas en la expresión de MCU entre las dos líneas celulares en la condición de indiferenciadas. Sin embargo, las células STIM1-KO diferenciadas mostraron una disminución en la expresión de MCU próxima al 40% (Figura 39).

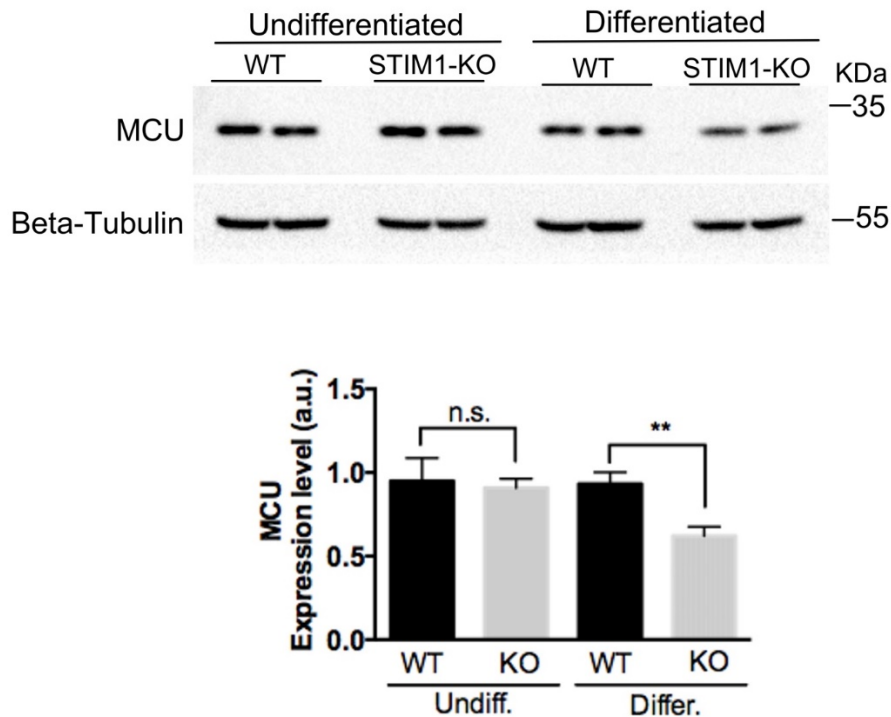


Figura 39. Análisis del nivel de expresión de MCU mediante inmunoblot. La expresión de MCU se evaluó mediante inmunoblot a partir de lisados celulares obtenidos de células indiferenciadas y diferenciadas (12 DIV) de ambas líneas celulares. El nivel de expresión de tubulina fue empleado como control de carga del inmunoblot. En la parte inferior se muestra la cuantificación del nivel de expresión para MCU a partir de 3 ensayos independientes (media \pm s.d.; ** $p < 0.01$).

En definitiva, la evidente despolarización mitocondrial observada para células STIM1-KO diferenciadas así como la disminución de la expresión del uniportador de Ca^{2+} MCU podría explicar la pérdida de viabilidad celular y aumento de senescencia mostrada en el primer capítulo de este trabajo.

6. ESTUDIO DE LA MITOFAGIA BASAL EN CÉLULAS WT Y STIM1-KO.

Tras la observación de que existe un daño mitocondrial significativo en las células STIM1-KO y teniendo en cuenta que la mitofagia es un proceso celular involucrado en el reciclaje de mitocondrias no funcionales para su posterior degradación lisosomal, nos planteamos evaluar los niveles de mitofagia basal (independiente de estímulos mitofágicos inducidos) en ambas líneas celulares. Para ello, se emplearon células WT y STIM1-KO que expresan la construcción *mito-QC* que permite determinar el nivel de mitofagia celular.

6.1. Caracterización inicial de líneas mito-QC generadas.

En este trabajo se han generado líneas celulares WT y STIM1-KO que expresan la construcción *mito-QC* (tándem de proteínas mCherry-GFP-FIS1), una herramienta que nos permite el estudio de la vía mitofágica (Allen et al., 2013). Estas líneas se generaron por infección retroviral, obteniéndose distintos clones celulares tras la selección antibiótica. A partir de cultivos celulares de dichos clones se obtuvieron lisados para analizar la expresión por inmunoblot de la construcción mCherry-GFP-FIS1, utilizándose para ello un anticuerpo específico frente al fluoróforo GFP, que revela el tándem de *mito-QC* con un tamaño aparente de ~60 kDa (Figura 40).

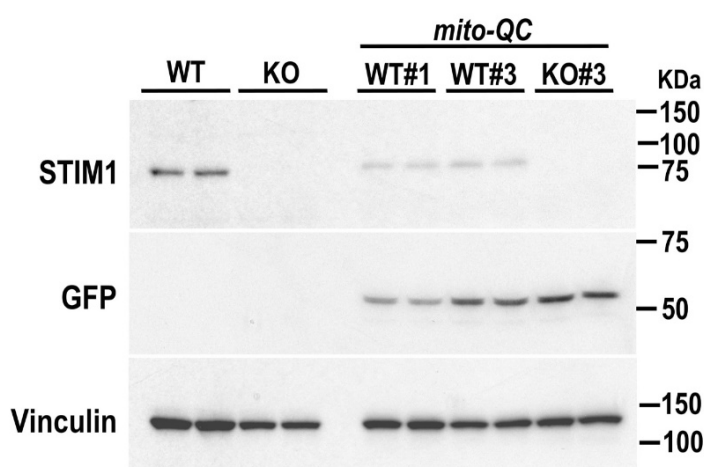


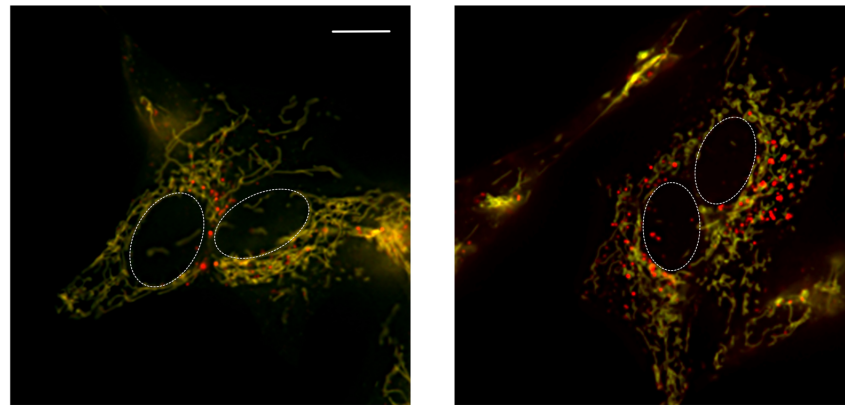
Figura 40. Selección de clones positivos para la construcción *mito-QC*. Células SH-SY5Y WT y STIM1-KO se transfectaron por infección retroviral con la construcción mCherry-GFP-FIS1. Tras la selección con antibiótico, los clones se crecieron hasta la obtención de monocapas celulares, y lisados celulares de cada muestra (30 μ g proteína) se emplearon para el análisis de expresión de GFP mediante inmunoblot. Los clones 1 y 3 para WT, y el clon 3 para STIM1-KO fueron positivos para la expresión de *mito-QC*. Como control se utilizaron muestras de lisados de células WT y STIM1-KO, y como control de carga se evaluó el nivel de vinculina.

6.2. El déficit de STIM1 incrementa la mitofagia basal en células SH-SY5Y.

Las líneas celulares que expresan de manera estable la construcción *mito-QC* (Figura 40) nos permiten evaluar el nivel de mitofagia mediante la cuantificación del número de mitolisosomas, es decir, fracciones mitocondriales que se observan como puntos rojos al ser embebidos en un pH ácido como el lisosomal y que extingue la fluorescencia verde (GFP) de *mito-QC*. Así, en este ensayo cuantificamos el número de mitolisosomas en células WT y STIM1-KO diferenciadas (6 DIV). Para ello, las células se

cultivaron en cubreobjetos y se monitorizaron por epifluorescencia en medio libre de bicarbonato Leibovitz's L-15 suplementado con FBS 10% para la adquisición de imágenes. El análisis de las imágenes se realizó como se indica en el punto 6.4.2 de Materiales y Métodos (Figura 41).

A



B

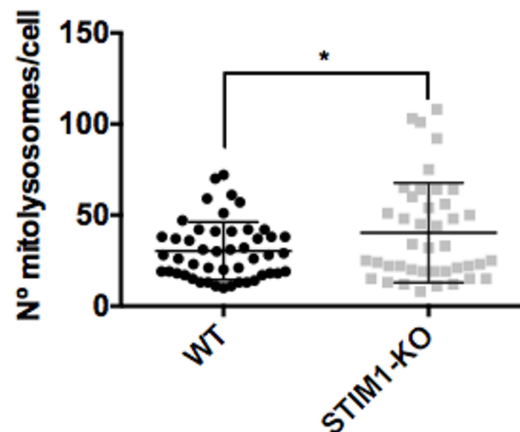


Figura 41. Análisis del nivel de mitofagia en células SH-SY5Y diferenciadas. *Panel A:* imágenes de células WT (izquierda) y STIM1-KO (derecha) diferenciadas (6 DIV) de las líneas celulares que expresan establemente la construcción *mito-QC* (escala = 10 μm). Estas células se monitorizaron por epifluorescencia con un objetivo Plan Apochromat 100x (NA 1.45) de inmersión en aceite para la adquisición de imágenes en secciones del eje z de 0.2 μm en los canales GFP y mCherry. Las imágenes obtenidas en el eje z se deconvolucionaron y se realizó la proyección total de las mismas (las líneas discontinuas marcan la envoltura nuclear de las células). *Panel B:* cuantificación del número de mitolisosomas (número de puntos rojos de mCherry sin solapar con el verde de GFP) por célula (eje y) tras el análisis con el software ImageJ y el plugin MitoQC Counter (Universidad de Dundee). La figura muestra datos de 2 experimentos independientes (> 40 células por condición, * $p < 0.05$).

A partir de las imágenes y cuantificación de mitolisosomas por célula (Figura 41), podemos concluir que la ausencia de STIM1 incrementa el nivel de mitofagia en células SH-SY5Y diferenciadas, una característica fenotípica que apoya los datos previos que indican una fuerte pérdida del potencial de membrana interna mitocondrial en células STIM1-KO.

7. EL DÉFICIT DE STIM1 ALTERA LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE IP₃.

En la *Introducción* de este trabajo se ha mostrado que los receptores de inositol-1,4,5-trisfosfato (IP₃Rs) son esenciales en la señalización mediada por Ca²⁺ ya que constituyen el principal mecanismo de movilización de Ca²⁺ desde reservorios intracelulares como el RE. Además, se ha citado la importancia de la relación de este orgánulo y la mitocondria, por su implicación en el tamponamiento de Ca²⁺, lo que permite mantener unos niveles adecuados de Ca²⁺ citosólico favoreciendo la supervivencia celular. En este capítulo hemos mostrado que las células deficientes en STIM1 presentan un descenso significativo de la [Ca²⁺]_{mito} con respecto a las células parentales (Figura 38), lo que nos permite plantear la hipótesis de que la transferencia de Ca²⁺ entre RE y mitocondria podría estar alterada en las células STIM1-KO debido a una alteración en el funcionamiento y/o los niveles de expresión de los IP₃Rs.

7.1. La ausencia de STIM1 reduce los niveles de expresión del receptor IP₃R3.

Por esta razón, evaluamos los niveles de expresión a nivel de mRNA de los receptores de IP₃ (ITPR1, ITPR2, ITPR3). A partir de cultivos celulares parentales y STIM1-KO se llevó a cabo una extracción de RNA total y se analizó mediante PCR cuantitativa (qPCR) el nivel relativo de transcritos de los genes que codifican para estos receptores (KO/WT) (Figura 42.A). Además, se analizaron los niveles de mRNA para estos receptores a partir del RNA extraído de una línea celular SH-SY5Y que expresa de manera estable la proteína STIM1 (STIM1_{over}/WT) (Figura 42.B). Como control de estos experimentos se analizó el nivel de transcritos para el gen de referencia *RPL32* (*housekeeping gene*).

Los datos de la Figura 42 indican que las células STIM1-KO presentan niveles de mRNA para *ITPR3* que son ~80% inferiores a los niveles encontrados en células parentales. De forma interesante, las células con sobre-expresión de STIM1 ven incrementados sus niveles de mRNA para *ITPR3*, lo que sugiere que podría existir una

relación directa entre el nivel de STIM1 y los niveles de expresión del receptor de IP₃ tipo 3 (gen *ITPR3*).

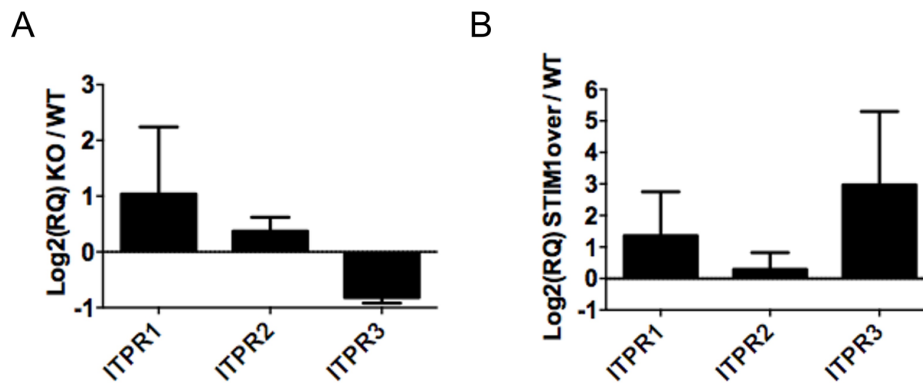


Figura 42. Análisis de los niveles de mRNA de IP₃R. Muestras de RNA total procedentes de neuroblastos wild-type (WT), STIM1-KO y neuroblastos que sobre-expresan STIM1 (STIM1_{over}) se analizaron por qPCR utilizando primers específicos para los transcritos de los genes *ITPR1*, *ITPR2* y *ITPR3*. Como control se evaluó el nivel de transcritos del gen de referencia *RPL32*. *Panel A*: Representación gráfica de la cantidad relativa de transcritos de receptores de IP₃ en células STIM1-KO con respecto a células WT (KO/WT). *Panel B*: Representación gráfica de la cantidad relativa de transcritos de receptores de IP₃ en células que sobre-expresan STIM1 con respecto a células WT (STIM1_{over}/WT). Los datos representan la media \pm s.d. de 2 experimentos independientes, cada uno de ellos con muestras analizadas por triplicado.

El siguiente paso que se llevó a cabo en este trabajo fue evaluar si esta disminución de expresión de transcritos de *ITPR3* iba acompañado de una disminución de expresión de la proteína. Mediante inmunoblot se analizó el nivel de expresión de *ITPR3* en células WT y STIM1-KO, utilizando lisados totales de células indiferenciadas. Como control de carga se evaluó el nivel de expresión de beta-tubulina. Los datos mostrados en la Figura 43 demuestran que existe un menor nivel del canal *ITPR3* en células STIM1-KO (resultados similares fueron obtenidos para células STIM1-KO diferenciadas (6 DIV)). Estos resultados podrían explicar por sí mismo la disminución del nivel de Ca²⁺ intramitocondrial, y por consiguiente la pérdida del potencial de membrana interna mitocondrial y la pérdida de viabilidad.

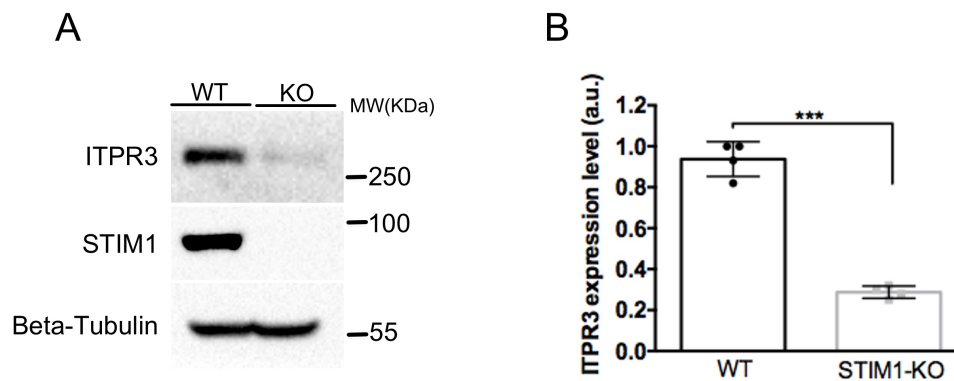


Figura 43. Disminución de expresión del canal ITPR3 en células STIM1-KO. *Panel A:* Nivel de expresión de ITPR3 en neuroblastos parentales y STIM1-KO analizado mediante inmunoblot a partir de lisados celulares utilizando 30 μg de proteína total. El nivel de expresión de beta-tubulina se empleó como control de carga. *Panel B:* Cuantificación de los niveles de expresión de ITPR3 para las distintas condiciones. Los datos representan la media \pm s.d. de 4 ensayos independientes (** $p < 0.001$).

8. EL DÉFICT DE RECEPTORES DE IP_3 PROVOCA UNA DISMINUCIÓN DE LA $[\text{Ca}^{2+}]$ BASAL EN CÉLULAS STIM1-KO.

La asociación de los receptores de IP_3 a STIM1 potencia la entrada de Ca^{2+} a través de SOCE, ya que el eflujo de Ca^{2+} desde el RE a través de los receptores de IP_3 provoca una depleción en el nivel de Ca^{2+} intraluminal en las cercanías del receptor, y por tanto en las cercanías de STIM1. Este vaciado parcial y localizado del RE provoca la activación de STIM1, estimulando SOCE (Sampieri et al., 2018). En este trabajo, hemos observado que la línea SH-SY5Y deficiente en STIM1 no sólo presenta una entrada de Ca^{2+} a través de canales SOC prácticamente nula (Figura 13, capítulo 1), sino que reduce la expresión del receptor de IP_3 tipo 3 (Figuras 42 y 43). En este sentido y dado el importante papel que desempeñan los ITPRs en el RE, nos planteamos evaluar su actividad estimulando su apertura con un agonista de receptores muscarínicos como el carbacol (Cch), midiendo a continuación los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Las células SH-SY5Y WT y STIM1-KO se cargaron con fura-2 y tras la carga se trataron con carbacol 100 μM en HBSS libre de Ca^{2+} o en HBSS con CaCl_2 1.26 mM para inducir el vaciado del RE. En la Figura 44 podemos observar cómo tras añadir carbacol y producirse la liberación de Ca^{2+} desde el RE a través de receptores de IP_3 , el ratio F_{340}/F_{380} registrado en la células STIM1-KO es inferior al registrado en las células WT tanto en presencia como en ausencia de Ca^{2+} .

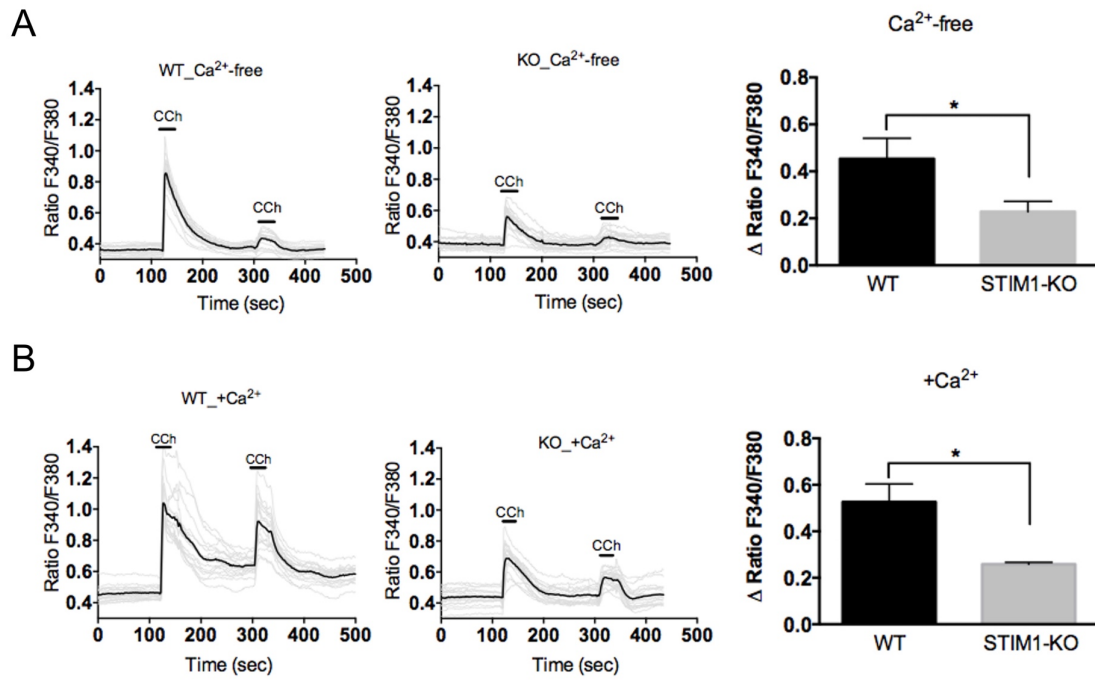
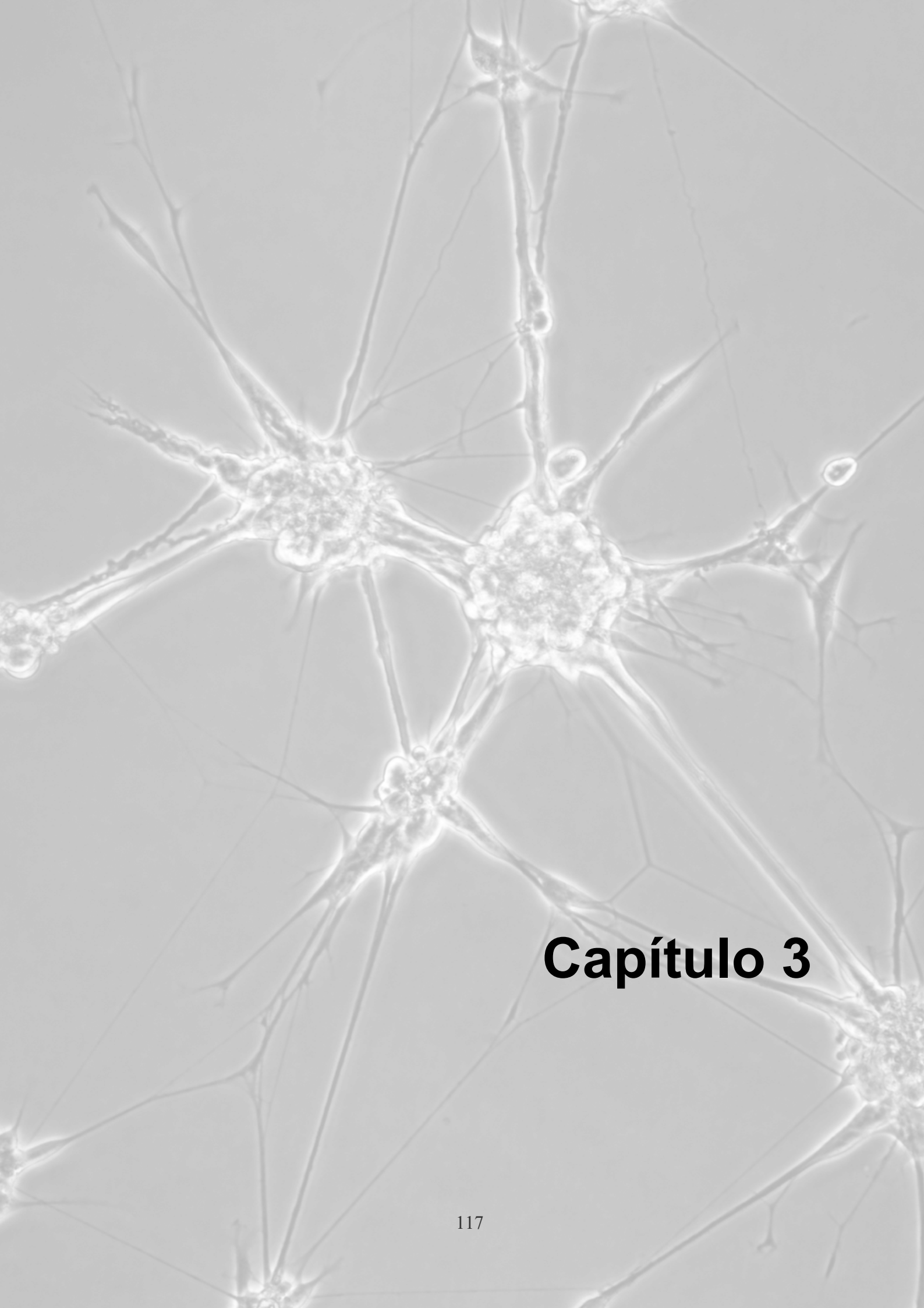


Figura 44. Medida de la $[Ca^{2+}]_i$ en células SH-SY5Y wild-type y STIM1-KO tras el vaciado del RE inducido con carbacol. Células WT y STIM1-KO cargadas con fura-2 se emplearon para monitorizar el ratio de fluorescencia F_{340}/F_{380} . Las células se estimularon con carbacol 100 μ M (CCh) en medio HBSS libre de Ca^{2+} (*Panel A*) o en medio HBSS con $CaCl_2$ 1.26 mM (*Panel B*) a los 2 y 5 min de comenzar el ensayo (120 y 300 secs en las gráficas). En el margen derecho de cada panel se representa gráficamente el incremento del ratio F_{340}/F_{380} antes y después de la adición del primer pulso de carbacol para células WT (negro) y células STIM1-KO (gris). Los datos representan la media \pm s.d. de 2 ensayos independientes (* $p < 0.05$).

Estos resultados indican que la línea SH-SY5Y deficiente en STIM1 no sólo presenta un déficit en la expresión del receptor ITPR3 sino que también muestra una atenuación en la actividad de este receptor, lo que podría explicar el descenso de la $[Ca^{2+}]_{mito}$ en células deficientes en STIM1.



Capítulo 3

Los resultados presentados hasta ahora en este trabajo indican que la ausencia de STIM1 en células SH-SY5Y no sólo reduce drásticamente el influjo de Ca^{2+} extracelular a través de canales SOC, sino que afecta a la viabilidad celular de estos neuroblastos durante la diferenciación neuronal. En el capítulo 1, hemos mostrado que las células STIM1-KO presentan mayores niveles de senescencia y una menor $[\text{Ca}^{2+}]_i$, acompañado de un incremento en la expresión y actividad del canal $\text{Ca}_v1.2$. Por otro lado, en el capítulo 2 hemos mostrado que las células STIM1-KO presentan un menor potencial de membrana mitocondrial comparado con la línea parental, lo que sumado a un incremento en el nivel de mitofagia y un déficit en la actividad del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, sugiere estas células presentan mitocondrias no funcionales, que explica la muerte celular provocada por la deficiencia de STIM1. Además, en estas células STIM1-KO se ha observado una reducción en la expresión de canales de Ca^{2+} esenciales para la señalización mediada por Ca^{2+} , como el ITPR3 en el RE y MCU en la mitocondria.

En este capítulo, vamos a estudiar si con el silenciamiento de la expresión del canal $\text{Ca}_v1.2$ se consigue normalizar la viabilidad y funcionalidad mitocondrial de las células deficientes en STIM1. Además, analizaremos qué papel pueden desempeñar STIM1 y ITPR3 en el trasvase de Ca^{2+} entre el RE y la mitocondria.

1. SILENCIAMIENTO DEL CANAL $Ca_v1.2$ EN CÉLULAS STIM1-KO Y RECUPERACIÓN DEL FENOTIPO SILVESTRE.

Las células STIM1-KO muestran un incremento de expresión del canal $Ca_v1.2$, tanto a nivel de mRNA como de proteína, lo que conlleva una sobreactivación de dicho canal, incrementándose la entrada Ca^{2+} extracelular en respuesta a la despolarización (Figura 29, capítulo 1). Para evaluar el papel real de la sobre-expresión del canal $Ca_v1.2$ en la inducción de muerte celular, hemos reducido la actividad de este canal en células STIM1-KO mediante la generación de una línea CACNA1C knock-down (KD). De este modo, hemos analizado la hipótesis de que un aumento en la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de estos canales, podría ser responsable de la inducción de muerte celular y que la línea STIM1-KO/CACNA1C-KD podría revertir este efecto.

1.1. Generación de una línea STIM1-KO/CACNA1C-KD.

En este trabajo se ha generado una línea celular para reducir la expresión de los transcritos del gen *CACNA1C* mediante la transfección estable de un RNA específico de 29 nucleótidos (shRNA, Origene#TF314247A) en células SH-SY5Y STIM1-KO. Esta línea celular se generó por infección retroviral, obteniéndose distintos clones tras la selección con antibiótico. Los clones obtenidos se mezclaron en un único cultivo celular y se dejaron recrecer en medio fresco sin antibiótico, obteniéndose un pool de clones con heterogeneidad para el nivel de silenciamiento de $Ca_v1.2$.

Con el pool de clones resultantes se determinó la entrada Ca^{2+} extracelular en respuesta a despolarización por KCl con el fin de comprobar la eficiencia del silenciamiento del canal $Ca_v1.2$. De esta forma, las células CACNA1C-KD se cargaron con fura-2 y se midió el influjo de Ca^{2+} extracelular tras 1 minuto de despolarización inducida por KCl 90 mM. Para este ensayo se siguió un protocolo similar al empleado para las células WT y STIM1-KO en el capítulo 1. Además, se determinó la fracción de este influjo de Ca^{2+} que es inhibible por nifedipina 10 μ M, para cuantificar de este modo la entrada de Ca^{2+} a través de la familia de VOCCs tipo L (Figura 45). Los resultados reflejaron que las células STIM1-KO en las que se había silenciado parcialmente el gen *CACNA1C* mostraban una entrada de Ca^{2+} sensible a nifedipina similar a la encontrada en células wild-type (Figura 29, capítulo 1).

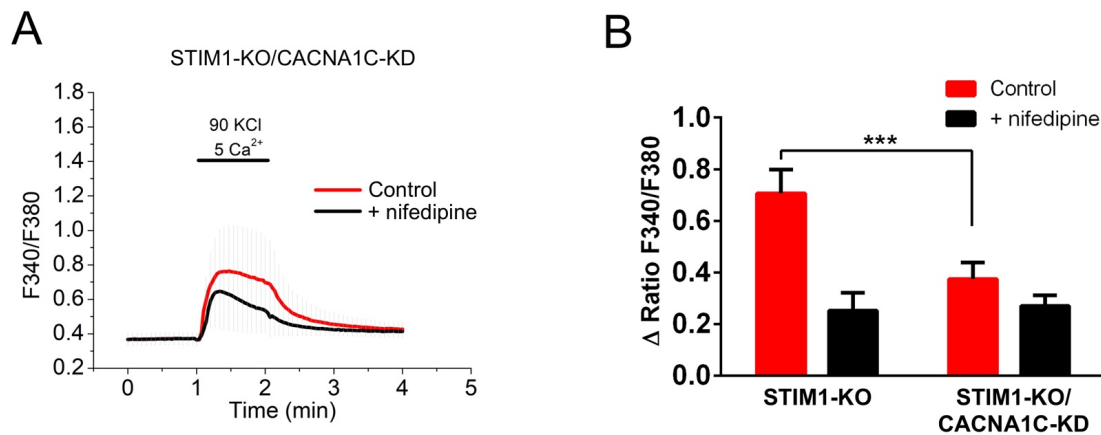


Figura 45. Medida de la entrada de Ca^{2+} a través de VOCCs tipo L en la línea celular STIM1-KO/CACNA1C-KD. *Panel A:* Medida de la concentración de Ca^{2+} libre citosólico en células STIM1-KO/CACNA1C-KD. Las células cargadas con fura-2 se monitorizaron en medio HBSS con Ca^{2+} 1.26 mM induciendo una despolarización por KCl 90 mM durante 1 minuto (línea roja). Durante el tiempo de despolarización se añadió al medio 5 mM de CaCl_2 para favorecer el registro de la entrada de Ca^{2+} . Cuando se requirió se añadió nifedipina 10 μM al medio de ensayo (línea negra). *Panel B:* Incremento del ratio F_{340}/F_{380} en células STIM1-KO y células STIM1-KO/CACNA1C-KD tras despolarización mediada por KCl 90 mM en ausencia (barras rojas), o en presencia de nifedipina 10 μM (barras negras). Los datos se representan como media \pm s.d. de 3 experimentos independientes (con un mínimo de 60 células por condición experimental, *** $p < 0.001$).

1.2. El silenciamiento del canal $\text{Ca}_v1.2$ restaura los niveles de senescencia en células STIM1-KO.

Tras comprobar que la entrada de Ca^{2+} extracelular tras despolarización era similar en células wild-type y en células STIM1-KO en las que se había silenciado el gen *CACNA1C*, nos planteamos estudiar si también disminuían los niveles de senescencia celular. Para ello, determinamos la senescencia mediante la incubación de las células con 5-dodecanoilaminofluoresceína di-beta-D-galactopiranosido (C12FDG), sustrato de la β -galactosidasa, reproduciendo las condiciones de los ensayos de senescencia desarrollados en el capítulo 1. Para ello se cultivaron las líneas celulares WT, STIM1-KO y STIM1-KO/CACNA1C-KD y se evaluó la senescencia en células diferenciadas (6 DIV). Los resultados indicaron que el silenciamiento del canal $\text{Ca}_v1.2$ en células STIM1-KO/CACNA1C-KD reducía notablemente los niveles de senescencia observados en células STIM1-KO, alcanzándose valores similares a los observados en la línea parental (Figura 46).

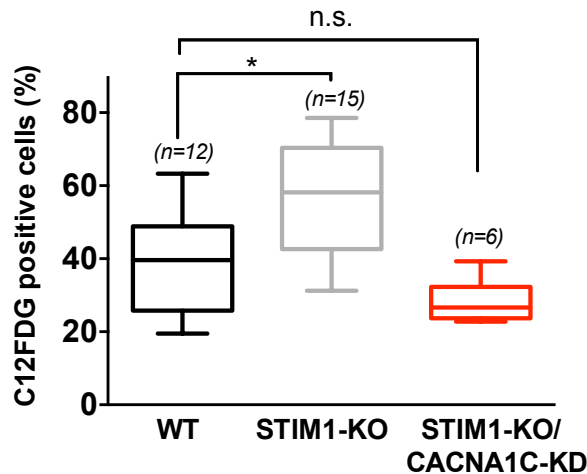


Figura 46. El silenciamiento del gen *CACNA1C* restaura los valores de senescencia en células *STIM1-KO*. Células WT (negro), *STIM1-KO* (gris) y *STIM1-KO/CACNA1C-KD* (rojo) diferenciadas (6 DIV) se incubaron con C12FDG 1 μ M y se analizaron por citometría de flujo para evaluar el nivel de senescencia celular. El eje y representa el porcentaje de células positivas con respecto a la intensidad de fluorescencia emitida por el producto de la de beta-galactosidasa. Los datos se representan como media \pm s.d. de 3 experimentos independientes (se muestra el número de replicados técnicos para cada condición (*n*), **p*<0.05).

1.3. El silenciamiento del canal Cav1.2 restaura la funcionalidad mitocondrial en células *STIM1-KO*.

En el capítulo 2 hemos mostrado que la deficiencia de *STIM1* altera el potencial de membrana interna mitocondrial en células SH-SY5Y, utilizando para ello sondas específicas como tetrametilrodamina metil éster (TMRM). Además, los datos indicaban un descenso significativo en el porcentaje de células positivas para TMRM en células *STIM1-KO* diferenciadas (Figura 32, capítulo 2). Por ello, durante esta parte del trabajo se comprobó si el silenciamiento del canal Cav1.2 restauraba el potencial de membrana interna mitocondrial, favoreciendo así un correcto funcionamiento mitocondrial, lo que podría explicar el descenso de la senescencia observado en células *STIM1-KO/CACNA1C-KD* (Figura 46). De esta forma, células WT, *STIM1-KO* y *STIM1-KO/CACNA1C-KD* diferenciadas (6 DIV) se incubaron con TMRM 2 nM durante 30 minutos a 37°C en PBS + BSA 1%. Las células se analizaron por citometría de flujo y se cuantificó el porcentaje de células positivas para la fluorescencia de TMRM en cada condición experimental (Figura 47A). Además, como se hiciera en el ensayo del capítulo 2, estas líneas celulares se analizaron en presencia del desacoplante mitocondrial FCCP

(10 μ M) mediante citometría de flujo (Figura 47B), lo que nos permitió determinar la especificidad de la tinción con TMRM.

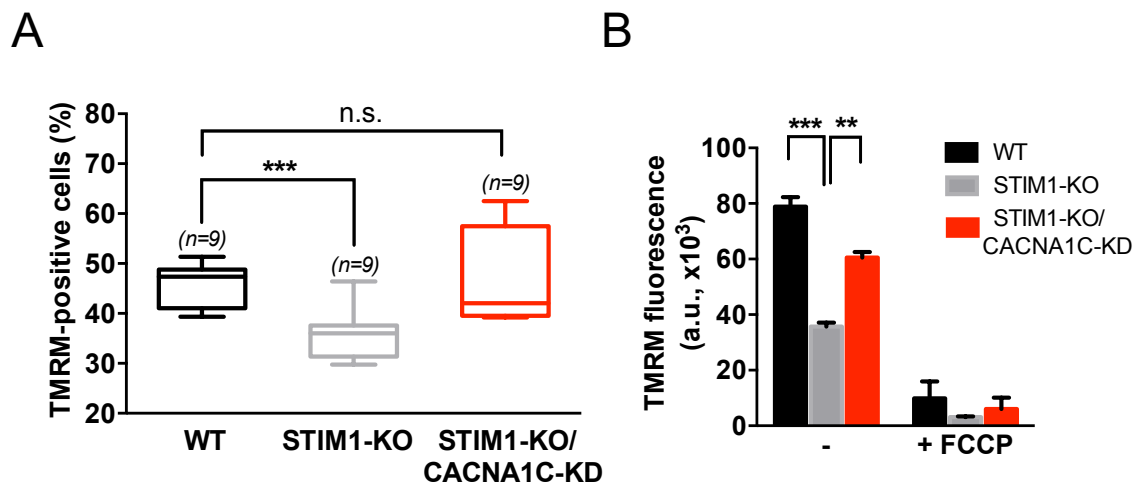


Figura 47. El silenciamiento del gen *CACNA1C* restaura los valores de polarización de la membrana interna mitocondrial en células *STIM1-KO*. Células WT (negro), *STIM1-KO* (gris) y *KO/CACNA1C-KD* (rojo) diferenciadas (6 DIV) se tiñeron con TMRM 2 nM y se analizaron por citometría de flujo en condiciones basales (*Panel A*) o 10 minutos después de la adición de FCCP 10 μ M (*Panel B*). El eje y representa el porcentaje de células positivas o la intensidad de fluorescencia para TMRM en cada condición experimental. Los datos se representan como media \pm s.d. de 3 experimentos independientes (se muestra el número de replicados técnicos para cada condición experimental (*n*), ****p*<0.001, ***p*<0.01).

A partir de estos resultados podemos confirmar que el potencial de membrana interna mitocondrial es restaurado en células *STIM1-KO* diferenciadas tras realizar el silenciamiento de la expresión génica de *CACNA1C*. Además, como la polarización de la membrana interna mitocondrial está vinculada a la actividad de la cadena de transporte de electrones y en las células *STIM1-KO* diferenciadas se observó una disminución de actividad del complejo I superior al 50% con respecto a células WT (Figura 37, capítulo), el siguiente paso fue evaluar si con el silenciamiento del canal $Ca_v1.2$ recuperaba dicha actividad.

En este sentido, y para llevar a cabo la medida de actividad del complejo I, se obtuvieron lisados de células WT, *STIM1-KO* y *STIM1-KO/CACNA1C-KD* diferenciadas (6 DIV), empleando quinona CoQ1 (50 μ M) como aceptor de electrones y NADH 75 μ M como donador electrónico. Se empleó rotenona como inhibidor específico del complejo I para determinar la actividad sensible e insensible a rotenona. A partir de los resultados de esta medida, pudimos comprobar que el knock-down del canal $Ca_v1.2$ en células

STIM1-KO no sólo recupera la actividad del complejo I sino que alcanza valores 2 veces superior al observado en la línea wild-type o parental (Figura 48).

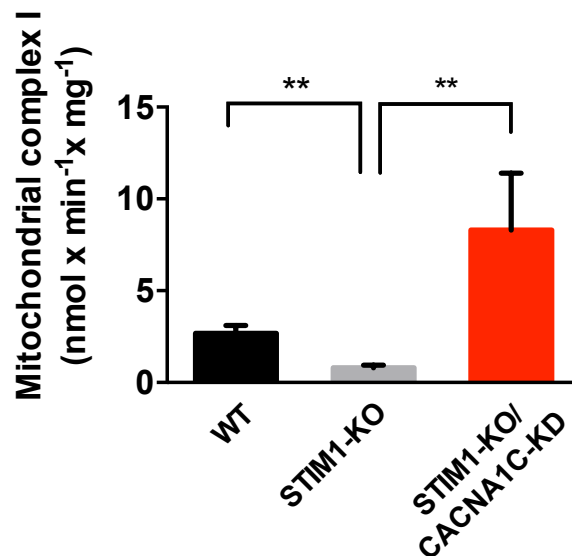


Figura 48. El silenciamiento del gen *CACNA1C* restaura la actividad del complejo I de la cadena de transporte de electrones en células STIM1-KO. La actividad del complejo I o NADH ubiquinona oxidorreductasa se determinó a partir de lisados de células SH-SY5Y WT, STIM1-KO y STIM1-KO/*CACNA1C*-KD diferenciadas (6 DIV). En el panel, se muestra la diferencia entre la actividad total y la actividad insensible a rotenona, es decir, la actividad NADH oxidasa sensible a rotenona que es dependiente del complejo I. Los datos se representan como media \pm s.d. a partir de 2 experimentos independientes (** $p < 0.01$).

1.4. El silenciamiento del canal $Ca_v1.2$ normaliza los niveles de $[Ca^{2+}]_{mito}$ en células STIM1-KO.

En este trabajo hemos mostrado que las células STIM1-KO presentan una $[Ca^{2+}]_{mito}$ muy inferior a la de las células wild-type (~ 60% inferior) (Figura 38, capítulo 2). Por otro lado, hemos observado que el silenciamiento del canal $Ca_v1.2$ permitió recuperar la funcionalidad de las mitocondrias en las células deficientes en STIM1. Por ello, nuestro siguiente paso fue evaluar si la atenuación de la actividad de este canal VOC tipo L en células KO permitía recuperar los niveles basales de $[Ca^{2+}]_{mito}$. Las células WT, STIM1-KO y STIM1-KO/*CACNA1C*-KD se transfectaron para la expresión transitoria del sensor de Ca^{2+} 4mtD3-cpv y transcurridas 48 horas desde la transfección se registró la fluorescencia emitida por los canales CFP, FRET e YFP en medio HBSS con $CaCl_2$ 1.26 mM. Para determinar la $[Ca^{2+}]_{mito}$ se llevó a cabo la evaluación del ratio máximo FRET/CFP y de su señal mínima de forma individual para cada experimento, y se siguieron los cálculos indicados en el punto 11.2 de Materiales y Métodos (Figura 49).

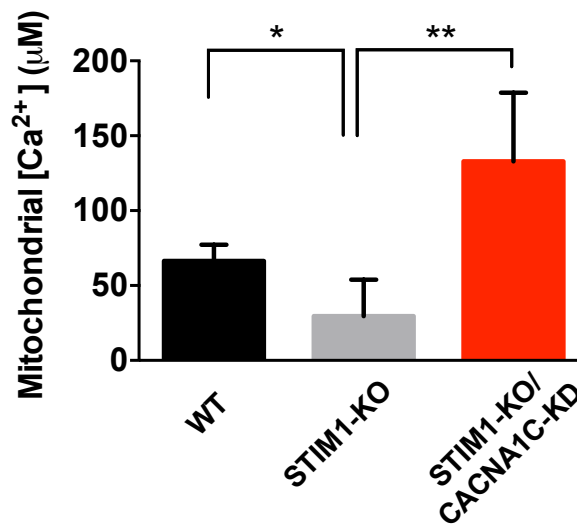


Figura 49. El silenciamiento del gen *CACNA1C* normaliza la concentración de Ca²⁺ mitocondrial en células *STIM1-KO*. Células SH-SY5Y WT, *STIM1-KO* y *STIM1-KO/CACNA1C-KD* se transfectaron de manera transitoria para la expresión del sensor de Ca²⁺ 4mtD3cpv y 48 h después se registró la emisión de fluorescencia de los canales CFP, FRET e YFP, para monitorizar la transferencia de energía. Para determinar [Ca²⁺]_{mito}, se registró la señal del ratio FRET/CFP en células en medio HBSS con Ca²⁺ durante 4-5 minutos. La calibración del ratio FRET/CFP para calcular el R_{min} y R_{max} se llevó a cabo de manera individual para cada ensayo. Los datos se muestran como media ± s.d. de 6 experimentos independientes (*p<0.05, **p<0.01).

Los datos de la Figura 49 muestran que el silenciamiento del gen *CACNA1C* en la línea *STIM1-KO* presenta una [Ca²⁺]_{mito} 2 veces superior a la observada en células wild-type (132.9 ± 46 µM para *STIM1-KO/CACNA1C-KD* frente a 66.4 ± 10.9 µM de las células WT), de manera que se revierte de forma significativa la disminución de la [Ca²⁺]_{mito} provocada por la ausencia de *STIM1* (27.8 ± 22.8 µM para células *STIM1-KO*).

Por otro lado, y dado que ya habíamos mostrado que la ausencia de *STIM1* provoca un descenso en la concentración de Ca²⁺ citosólico basal (Figura 26, capítulo 1), hemos estudiado el efecto del silenciamiento de *CACNA1C* sobre este parámetro. Así, las células se cultivaron durante 48 horas, se cargaron con fura-2 y se monitorizaron por epifluorescencia en medio con Ca²⁺ (1.26 mM).

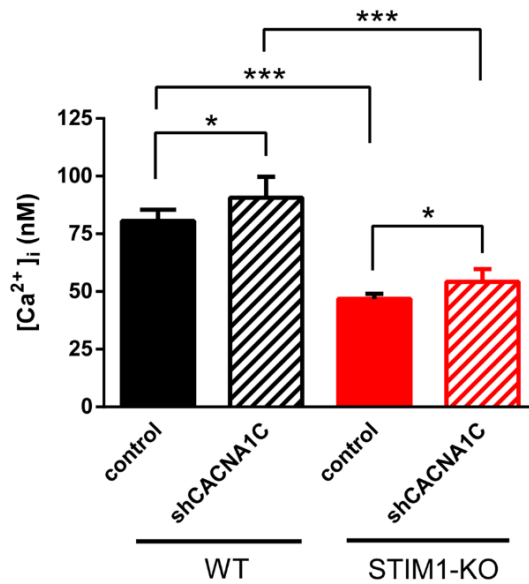


Figura 50. El silenciamiento del gen *CACNA1C* restaura los valores de la concentración de Ca^{2+} libre citosólico basal en células WT y STIM1-KO. Las células WT (+/- shCACNA1C) y STIM1-KO (+/- shCACNA1C) se cargaron con fura-2 y se registró el ratio F_{340}/F_{380} en medio HBSS con Ca^{2+} (1.26 mM). En la gráfica se representan los valores de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en condiciones de reposo para células WT (barra negra), WT/CACNA1C-KD (barra rayada negra), STIM1-KO (barra roja) y KO/CACNA1C-KD (barra rayada roja). Los datos se representan como la media \pm s.d. de 3 experimentos independientes (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Los resultados que se muestran en la Figura 50 indican que el silenciamiento de la expresión de *CACNA1C* incrementó levemente la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en células STIM1-KO ($54.3 \text{ nM} \pm 5.9 \text{ nM}$ para STIM1-KO/CACNA1C-KD frente a $44 \pm 4.4 \text{ nM}$ de STIM1-KO), aunque lejos de alcanzar los niveles observados en el fenotipo WT ($77.1 \text{ nM} \pm 10 \text{ nM}$ para células WT y $80.6 \text{ nM} \pm 4.9 \text{ nM}$ para células WT/CACNA1C-KD). Estos resultados sugieren que otros mecanismos implicados en la movilización por Ca^{2+} , además del canal $\text{Ca}_v1.2$, podrían estar alterados en las células KO, ya que STIM1 está implicado en la regulación de otros canales, como los receptores de IP_3 , los cuales también son estudiados en este trabajo.

2. LA SOBRE-EXPRESIÓN DEL CANAL ITPR3 NORMALIZA LA $[Ca^{2+}]_{mito}$ EN CÉLULAS STIM1-KO.

En el capítulo 2 hemos mostrado que las células deficientes en STIM1 presentan una $[Ca^{2+}]_{mito}$ significativamente inferior a la de las células parentales. Sin embargo, hemos descubierto otro dato es esencial para entender la alteración de la señalización de Ca^{2+} en ausencia de STIM1. Las células STIM1-KO presentan una expresión muy disminuida del receptor IP_3 (ITPR3, también conocido como IP_3R3), que está localizado principalmente en el RE. Dado que la mitocondria desempeña una función tamponadora del Ca^{2+} liberado por el RE, este déficit del receptor ITPR3 podría ser una de las causas del bajo nivel de $[Ca^{2+}]_{mito}$ observado en células KO, ya que la transferencia de Ca^{2+} entre RE y mitocondria podría estar alterada. Por ello, nos planteamos estudiar esta posibilidad estudiando la sobreexpresión del receptor ITPR3 en células STIM1-KO y comprobando así su efecto sobre la $[Ca^{2+}]_{mito}$.

2.1. La sobre-expresión transitoria de ITPR3 normaliza parcialmente la $[Ca^{2+}]_{mito}$ en células STIM1-KO.

Con el objetivo de determinar si la sobre-expresión del receptor ITPR3 en células STIM1-KO permitía recuperar los niveles de Ca^{2+} mitocondrial, se llevó a cabo esta medida en células KO transfectadas para la expresión transitoria de la proteína recombinante ITPR3-mCherry. Para ello se generó una construcción (UEx213) en la que se clonó el cDNA de ITPR3 humano (número de acceso NM_009287) en el vector mCherry-N1. Para aislar dicho cDNA se partió del clon HsCD00399229 obtenido del repositorio Harvard PlasmID (Harvard Medical School). Mediante primers diseñados para amplificar el cDNA completo se incorporaron dos sitios de restricción SmaI. Los primers fueron los siguientes:

ITPR3-SmaI-Fwd: TCC**CCCGGG**ATGAGTGAAATGTCCAGCTTTC

ITPR3-SmaI-Rev: TCC**CCCGGG**GGCGGCTAATGCAGTTCTGGAC

Los sitios de corte para SmaI se muestran en negrita. Una vez amplificado por PCR el cDNA modificado, se insertó en el vector mCherry-N1 empleando estos mismos sitios de restricción. Tras comprobar la orientación del inserto, la construcción generada se analizó mediante inmunoblot utilizando anticuerpos comerciales frente a ITPR3 y mCherry/RFP (Figura 51.A). A continuación, se llevó a cabo la medida de la $[Ca^{2+}]_{mito}$ en células STIM1-KO y células STIM1-KO transfectadas para la expresión transitoria de

ITPR3-mCherry (Figura 51.B). En este ensayo las células se transfectaron con el sensor de Ca^{2+} 4mtD3-cpv y tras 48 h se determinó la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$ como hemos mostrado en experimentos anteriores.

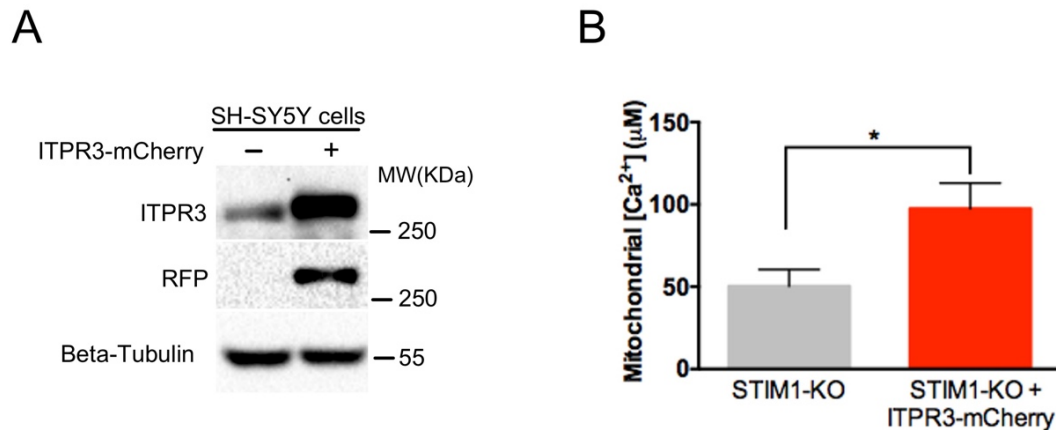


Figura 51. Medida de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$ en células STIM1-KO transfectadas con ITPR3-mCherry. *Panel A:* La expresión de ITPR3-mCherry se evaluó mediante inmunoblot utilizando dos anticuerpos comerciales, uno frente a ITPR3 y otro específico para mCherry/RFP. El nivel de expresión de beta-tubulina fue analizado como control de carga del inmunoblot. *Panel B:* Células STIM1-KO (gris) y KO transfectadas con la construcción ITPR3-mCherry (rojo), se transfectaron para la expresión transitoria del sensor de Ca^{2+} 4mtD3cpv y 48 h después se llevó a cabo la medida de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$. Los datos corresponden a la media \pm s.d. de 2 experimentos independientes (* $p < 0.05$).

Los datos mostrados en la Figura 51 indican que un incremento de expresión del receptor ITPR3 en células STIM1-KO puede llegar a normalizar la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$ de manera significativa ($97.50 \pm 8.94 \mu\text{M}$ para STIM1-KO/ITPR3-mCherry frente a $50.32 \pm 5.87 \mu\text{M}$ en células STIM1-KO), lo que significa que la disminución de expresión de ITPR3 en células STIM1-KO tiene un papel importante en la desregulación de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$. Por ello, el siguiente paso de este trabajo consistió en la generación de una línea celular STIM1-KO con sobre-expresión estable de dicho receptor para así poder corroborar la contribución de este receptor al control de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$, ya que con las líneas estables es posible eliminar variaciones en el nivel de expresión de ITPR3 entre células, siendo esta expresión homogénea para cada clon.

2.2. Generación de una línea estable para la expresión de ITPR3-Myc.

Empleando la construcción comercial MR225699 de Origene, que contiene el cDNA de ITPR3 de ratón (NM_080553) clonado en un vector pCMV6-Entry, la línea estable para la sobre-expresión de ITPR3-Myc se generó por resistencia al antibiótico G418, obteniéndose distintos clones celulares tras la selección antibiótica. A partir del cultivo de dichos clones se obtuvieron lisados para analizar la expresión por inmunoblot de la construcción ITPR3-Myc (Figura 52).

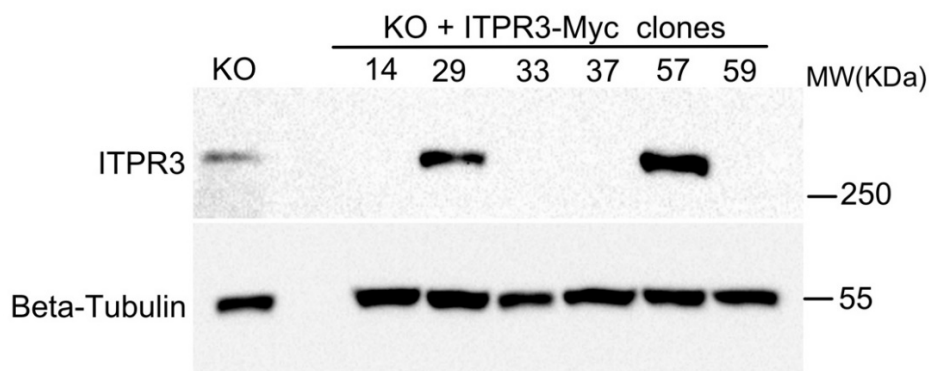


Figura 52. Selección de clones positivos para la construcción ITPR3-Myc. Las células SH-SY5Y STIM1-KO se transfectaron con la construcción ITPR3-Myc y se seleccionaron distintos clones por resistencia al antibiótico G418. Tras la selección, los clones se crecieron hasta la obtención de monocapas celulares y los lisados celulares de cada uno (30 μ g proteína) se emplearon para el análisis de expresión de ITPR3 mediante inmunoblot. Los clones 29 y 57 fueron positivos para la expresión de ITPR3-Myc. Como control se utilizaron muestras de lisados de células STIM1-KO y como control de carga se evaluó el nivel de beta-tubulina.

A partir de estos resultados se analizó la $[Ca^{2+}]_{mito}$ en los clones #29 y #57 con el fin de corroborar los datos obtenidos con la línea STIM1-KO transfectada transitoriamente con ITPR3-mCherry.

2.3. La expresión estable de ITPR3 normaliza la $[Ca^{2+}]_{mito}$ en células STIM1-KO.

Tras la generación de una línea estable para la sobre-expresión del receptor ITPR3 en células STIM1-KO, se determinó la $[Ca^{2+}]_{mito}$ empleando las células WT y STIM1-KO como control (Figura 53), con objeto de certificar si el incremento de expresión en ITPR3 conducía a una recuperación de la $[Ca^{2+}]_{mito}$, una medida que se realizó reproduciendo las condiciones del punto 2.1 de este capítulo.

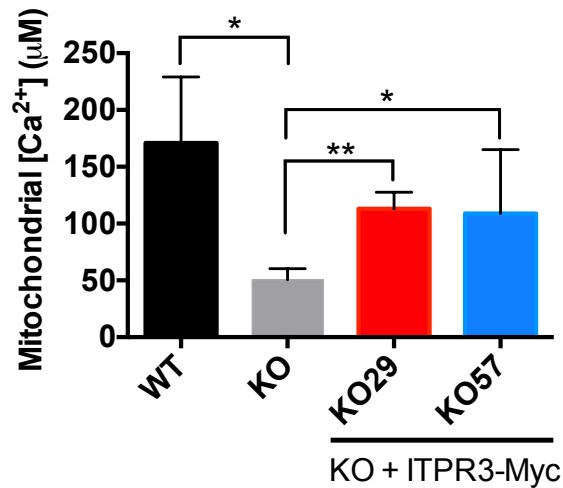
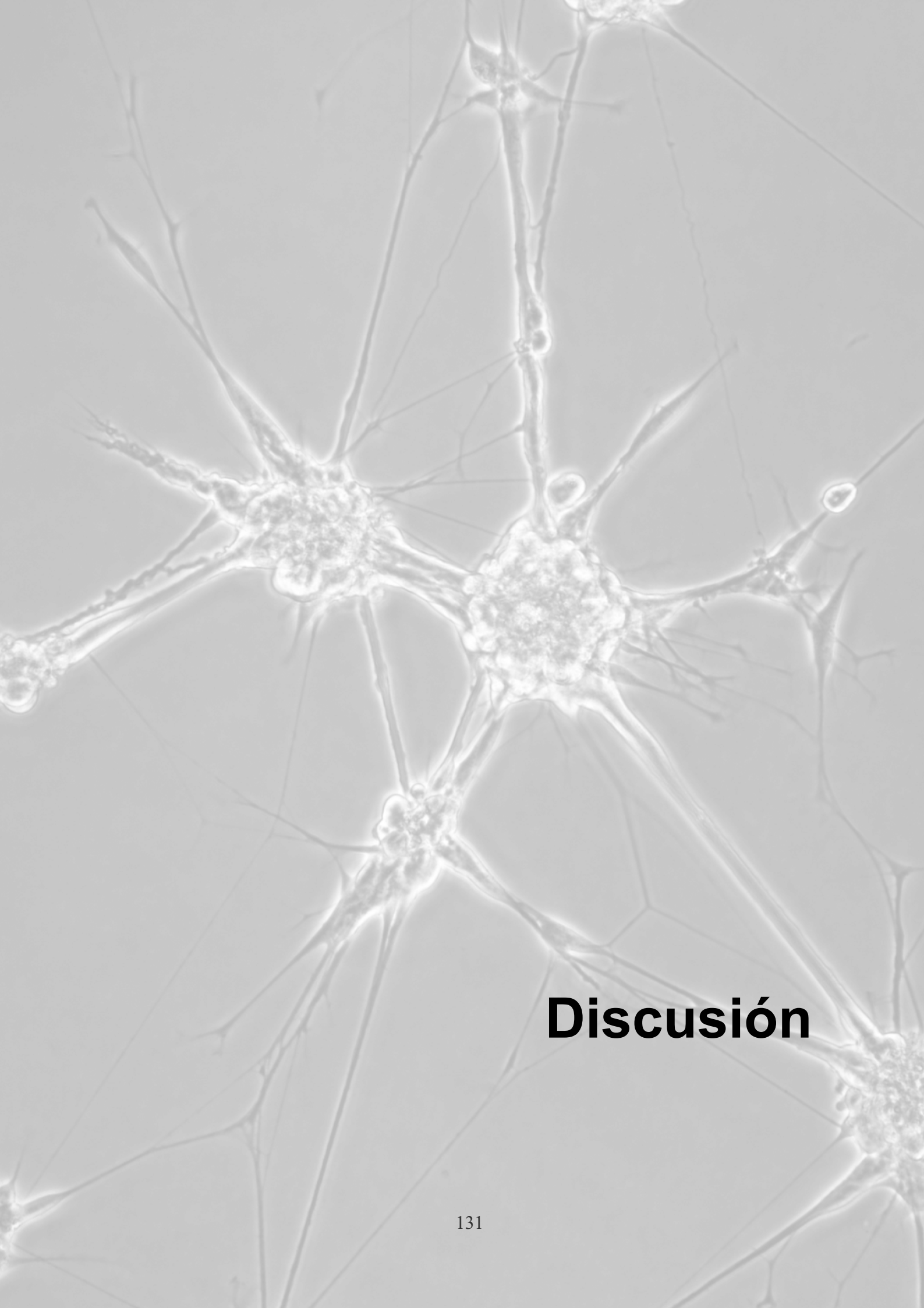


Figura 53. Medida de la [Ca²⁺]_{mito} en células STIM1-KO con sobre-expresión de ITPR3-Myc. Células WT (negro), STIM1-KO (gris) y STIM1-KO con sobre-expresión de ITPR3-Myc (clon #29 en rojo y clon #57 en azul), se transfectaron para la expresión transitoria del sensor de Ca²⁺ 4mtD3cpv y 48 h después se llevó a cabo la medida de la [Ca²⁺]_{mito}. Los datos son media ± s.d. de 2 experimentos independientes (*p<0.05, **p<0.01).

Los datos de la Figura 53 nos indican que la sobre-expresión estable del receptor ITPR3 en células STIM1-KO incrementa la [Ca²⁺]_{mito} en estas células, incluso mejorando los registros observados para la expresión transitoria de ITPR3 (Figura 51.B). A pesar de que no se alcanzan los niveles de Ca²⁺ mitocondrial observados en el fenotipo wild-type (111.4 ± 9.82 µM y 115.9 ± 19.31 µM para los clones #29 y #57 con sobre-expresión de myc-ITPR3 frente a 50.32 ± 5.87 µM de células STIM1-KO y 163.7 ± 40.43 µM de células WT), los datos sí que sugieren que la disminución de expresión de ITPR3 en células STIM1-KO desarrolla un papel importante en la desregulación de la [Ca²⁺]_{mito} en estas células, por lo que ITPR3 podría tener un papel fundamental a la hora de mantener la funcionalidad mitocondrial mediante el control del trasvase de Ca²⁺ entre el RE y la mitocondria.

En definitiva, los resultados mostrados en este capítulo nos permiten concluir que el silenciamiento del canal Cav1.2 y la sobre-expresión del receptor ITPR3 en células STIM-KO, corrigen la desregulación de la homeostasis del Ca²⁺ estudiada en los dos primeros capítulos de este trabajo, recuperando así la viabilidad celular y la funcionalidad mitocondrial del fenotipo silvestre.



Discusión

El trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral ha pretendido estudiar cómo afecta la ausencia de STIM1 a la diferenciación neuronal de la línea de neuroblastoma humana SH-SY5Y. Dado que STIM1 es el principal activador de canales SOC tras el vaciado de depósitos intracelulares de Ca^{2+} como el RE, se estima que desempeña un papel esencial en la homeostasis del Ca^{2+} , proceso esencial para la supervivencia celular ya que la disrupción o desregulación de la movilización de Ca^{2+} se ha relacionado con multitud de enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas (Mukherjee and Brooks, 2014). Son diversos los estudios que vinculan la alteración de rutas de señalización por Ca^{2+} con neurodegeneración, por lo que la generación de una línea celular editada genómicamente para silenciar la expresión de STIM1 obteniendo células defectivas en SOCE, puede aportar nuevos conocimientos sobre las consecuencias de la desregulación de los niveles de Ca^{2+} intracelular en la función neuronal y la viabilidad celular.

Las enfermedades neurodegenerativas constituyen la principal causa de muerte en la población de mayor edad y aún no se han desarrollado terapias totalmente eficientes para su tratamiento o erradicación, con mención especial a la enfermedad de Alzheimer. De hecho es relevante destacar que la gran mayoría de los estudios sobre esta enfermedad se centran en el Alzheimer familiar (FAD), una tipología que sólo representa al 5%, como máximo, de los pacientes de Alzheimer. El FAD está asociado a polimorfismos de los genes de las presenilinas 1/2 (PSEN1 y PSEN2), cuyas variantes alélicas están relacionadas con un procesamiento anormal del péptido β -amiloide. PSEN1 y PSEN2 influyen de manera determinante en la actividad de la γ -secretasa, la cual es responsable de la escisión proteolítica de la proteína precursora amiloide (APP) en su dominio transmembrana. Además, el dominio transmembrana de STIM1 constituye una diana para la γ -secretasa asociada a mutaciones en PSEN1 (Figura 54) y se ha observado que los niveles de STIM1 en fibroblastos de pacientes con Alzheimer familiar son inferiores a los de individuos control (Tong et al., 2016), lo que sugiere que la disminución del nivel total de STIM1 en pacientes con FAD podría estar mediando la patología, o al menos algunas características de su fenotipo. En este sentido, en células HEK293 con mutaciones en PSEN1 (Bojarski et al., 2009) y en cultivos prolongados de neuronas de hipocampo (Calvo-Rodríguez et al., 2016), que pretenden simular un envejecimiento in vitro, se ha observado que las células presentan niveles de SOCE atenuados. Estas observaciones, por tanto, sugieren que la desregulación del Ca^{2+} puede desempeñar un papel importante en la patogénesis del Alzheimer familiar.

No obstante, la forma más común de esta enfermedad es la del Alzheimer de origen esporádico que es genéticamente complejo, siendo su estudio muy arduo debido a la dificultad para establecer modelos celulares y/o animales que imiten sus síntomas y



progresión. En un trabajo de nuestro grupo de investigación se ha mostrado por primera vez que muestras de cerebro *post mortem* de pacientes con Alzheimer esporádico presentan una disminución del nivel de expresión de STIM1 en una región del cerebro denominada giro frontal medio, en comparación con pacientes control, sin ningún tipo de demencia y de la misma edad (Pascual-Caro et al., 2018a). De hecho este tipo de estudio constituye un punto de partida para desarrollar modelos celulares de estudio que permitan comprender el papel que juega la desregulación de la señalización y homeostasis del Ca^{2+} en el desarrollo de enfermedades neurológicas, especialmente el Alzheimer. Una estrategia para desarrollar un sistema de estudio *in vitro* que nos permita evaluar la deficiencia de STIM1 es la generación de líneas celulares neuronales editadas genómicamente. La alternativa es el desarrollo de animales de experimentación knock-out para STIM1, pero estos animales presentan una elevada tasa de muerte perinatal (Oh-Hora et al., 2008, Mancarella et al., 2013), sin que puedan llegar a edades avanzadas que permitan estudiar procesos neurológicos relacionados con la edad.

El uso de herramientas para la edición genómica, como el sistema CRISPR/Cas9, ofrece la posibilidad de obtener un knock-out de la expresión de un gen sin provocar inestabilidad genómica de forma significativa, mediante la generación de pequeñas inserciones o deleciones (indels) en la secuencia diana del gen diana. En este sentido, en este trabajo hemos usado la versión nickasa de la nucleasa Cas9 (Cas9n) (Figura 54), una estrategia que reduce el número de errores de localización (off-targets) ya que requiere dos RNAs guías independientes, una por cada hebra del DNA, para definir la secuencia diana que pretende ser editada. Esta estrategia, que ha sido previamente utilizada en nuestro laboratorio en otros tipos celulares y este mismo locus genómico (Lopez-Guerrero et al., 2017b, Lopez-Guerrero et al., 2017a), nos ha permitido provocar la pérdida de expresión de la proteína STIM1 en células SH-SY5Y debido a la generación de dos insertos diferentes, uno por cada alelo, cada uno de ellos con un codón de parada de traducción prematuro.

Los resultados mostrados en este trabajo demuestran que esta línea celular deficiente en la expresión de STIM1 generada a través del sistema CRISPR/Cas9 y, por tanto, sin entrada de Ca^{2+} extracelular en respuesta al vaciado de depósitos intracelulares (es decir, deficientes en SOCE), es capaz de adquirir un fenotipo neuronal mediante un proceso de diferenciación con ácido retinoico y el factor neurotrófico BDNF, de manera similar al observado en células parentales con expresión de STIM1 wild-type. No obstante, en este trabajo hemos demostrado que a pesar de su capacidad para diferenciarse, las células deficientes en STIM1 muestran una notable pérdida de viabilidad celular durante su diferenciación. Por ello, las células SH-SY5Y diferenciadas constituyen un modelo *in vitro* con el cual estudiar la función neuronal, y el hecho de que STIM1 sea esencial para

mantener la viabilidad en células SH-SY5Y diferenciadas, genera multitud de cuestiones sobre la importancia en neuronas de las vías de señalización mediadas por Ca^{2+} y controladas por STIM1.

En este trabajo, hemos mostrado que durante la diferenciación de las células SH-SY5Y se incrementa la expresión de STIM1, lo que sugiere un papel que gana importancia a medida que se adquiere un fenotipo neuronal. Sin embargo, este incremento no va acompañado de una mayor activación de canales SOC o entrada de Ca^{2+} a través de SOCE. Por el contrario, el nivel de SOCE en células diferenciadas es significativamente inferior al observado en neuroblastos indiferenciados, lo que sugiere que este incremento en el nivel de STIM1 debería estar relacionado con una función no canónica de la proteína, es decir, independiente de la activación de entrada de Ca^{2+} regulada por depósitos intracelulares. No obstante, los estudios desarrollados en este trabajo no aportan información sobre el papel que puede desempeñar STIM2 durante la diferenciación de células SH-SY5Y así como su implicación en SOCE, ya que no se han conseguido desarrollar con éxito líneas celulares STIM2-KO y STIM1/STIM2-KO en células SH-SY5Y. En este sentido, se ha propuesto que STIM1 puede desempeñar otras funciones en neuronas diferenciadas, como el control de la excitabilidad neuronal y la plasticidad intrínseca de neuronas de Purkinje (Ryu et al., 2017), lo cual apoya los resultados obtenidos a partir de ratones transgénicos con sobreexpresión de STIM1 en los que se observa una mejora del aprendizaje contextual y la formación de memoria (Majewski et al., 2017).

Otro aspecto a destacar de la proteína STIM1 es su función como regulador de canales y receptores distintos a los canales SOC. Por un lado, STIM1 modula positivamente los receptores de glutamato, regulando la activación de las subunidades 1 y 2 (GluA1/2) del receptor ionotrópico de glutamato AMPA en cultivos de neuronas corticales de rata (Gruszczynska-Biegala et al., 2016) y del receptor metabotrópico de glutamato tipo 1 (mGluR1) en neuronas de Purkinje de ratón (Hartmann et al., 2014b). Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo molecular que subyace a esta modulación de mGluR1 y GluA1/2 por parte de STIM1.

Por otro lado, se ha propuesto que STIM1 modula de forma negativa la actividad de algunos canales de Ca^{2+} operados por voltaje, principalmente el canal de tipo L $\text{Ca}_v1.2$ (Figura 54), el cual resulta inhibido por interacción directa con STIM1, lo que potencia no solo su inhibición sino su internalización desde la membrana plasmática (Park et al., 2010, Wang et al., 2010). Los resultados mostrados en este trabajo respaldan el hecho de que STIM1 sea un regulador negativo de $\text{Ca}_v1.2$, puesto que la deficiencia de STIM1 incrementó los niveles de este canal VOC tipo L, así como el influjo de Ca^{2+} a través de este canal, unas condiciones patofisiológicas que concuerdan con lo observado en



fibroblastos procedentes de pacientes con Alzheimer familiar, es decir con mutaciones en PSEN1/2 (Tong et al., 2016), como se refleja en la Figura 54.

De forma paralela otros trabajos han registrado una elevada actividad de canales VOC en neuronas piramidales de la región CA1 de hipocampo en ratas envejecidas, una alteración que regula negativamente la plasticidad neuronal a corto plazo (Thibault et al., 2001). En este aspecto, ratones transgénicos diseñados para provocar una acumulación de péptidos A β y una hiperfosforilación de la proteína Tau en neuronas piramidales de la región CA1 (conocidos como ratones 3xTgAD), muestran un incremento en las corrientes de Ca²⁺ generadas por los canales VOC tipo L con respecto al fenotipo wild-type. Estos resultados sugieren que la desregulación de estos canales VOC está vinculada a aquellas patologías mediadas por alteraciones de Tau, es decir, a la degeneración neuronal observada en pacientes de Alzheimer familiar (Wang and Mattson, 2014). De la misma forma, las células SH-SY5Y STIM1-KO presentan un fenotipo similar a estas neuronas piramidales envejecidas, ya que muestran una corriente de influjo de Ca²⁺ a través de canales VOC muy superior a las de células wild-type (Figura 54).

Estos hallazgos, en general apoyan la hipótesis de la desregulación de la movilización de Ca²⁺ como base fundamental en la etiología de la enfermedad de Alzheimer, en la que un metabolismo amiloide anormal altera la señalización y homeostasis del Ca²⁺ citosólico, ya que los oligómeros β -amiloides pueden incrementar la entrada de Ca²⁺ actuando directamente como canales o activando canales o receptores de la membrana plasmática, como los receptores de NMDA (Berridge, 2011). Esta entrada masiva de Ca²⁺ por mecanismos amiloide-dependientes desencadena un incremento de la muerte neuronal, característico en la progresión de la enfermedad de Alzheimer.

Además, los resultados mostrados en esta Tesis de Doctoral ponen de manifiesto que la desregulación de la homeostasis del Ca²⁺ debido a la ausencia de STIM1 provoca una notable disfunción mitocondrial (Figura 54), similar a lo descrito para fibroblastos de pacientes con mutaciones que producen pérdida de función en los genes *ORAI1* o *STIM1* (Maus et al., 2017). En estos fibroblastos se observó una reducción de la expresión de los complejos mitocondriales I y IV, así como del supercomplejo CICIII2, reduciéndose el bombeo de protones a través de la cadena de transporte electrónica y alterando el potencial de membrana mitocondrial. De forma similar, en este trabajo se ha observado una disminución significativa del potencial de membrana mitocondrial en células STIM1-KO, monitorizado mediante el uso de sondas sensibles al cambio de potencial como JC-1 y TMRM. Además, el nivel de Ca²⁺ intramitocondrial modula la actividad de enzimas implicadas en el ciclo de Krebs, entre ellas el complejo piruvato deshidrogenasa, la NAD⁺-isocitrato deshidrogenasa o la α -cetoglutarato deshidrogenasa (Denton, 2009). Nuestros

resultados muestran un descenso de los niveles de Ca^{2+} libre mitocondrial en células STIM1-KO, en contraste con lo observado en fibroblastos de embriones de ratones deficientes en STIM1 usando el indicador de Ca^{2+} de baja afinidad Rhod-2-AM (Henke et al., 2012). No obstante, las medidas de Ca^{2+} llevadas a cabo con la sonda Rhod-2 no son del todo precisas y por ello, deben considerarse con cierta precaución, ya que responden de manera diferente a cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]$ con respecto a otras sondas sensibles a Ca^{2+} , probablemente debido a la generación de especies derivadas de Rhod-2 durante la exposición lumínica (Fonteriz et al., 2010). En este sentido, en nuestro trabajo hemos utilizado el sensor de Ca^{2+} genéticamente codificado 4mtD3cpv para llevar a cabo la medida de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$ (Palmer and Tsien, 2006), evitando los problemas metodológicos observados con Rhod-2. Dado que el Ca^{2+} interviene en la activación del ciclo de ácido cítrico desempeñando un papel importante en la bioenergética mitocondrial y celular, la disminución en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$ observada en las células STIM1-KO, limitaría la producción de NADH/FADH₂. Este resultado unido a la baja actividad del complejo I de la cadena de transporte mitocondrial de células deficientes en STIM1, explican la despolarización de la membrana interna mitocondrial observada en células STIM1-KO, especialmente en células diferenciadas, un evento que afecta a la viabilidad celular de manera similar a la toxicidad neuronal tras la disfunción mitocondrial desencadenada por la acumulación de péptidos β -amiloides en levaduras y células pigmentadas de retina (Ruan et al., 2017). Otro resultado de nuestro estudio y que bien podría ser consecuencia de los anteriores, es la alteración del reciclaje mitocondrial o mitofagia en células STIM1-KO diferenciadas, en las cuales se ha observado un mayor número de mitolisosomas en condiciones basales con respecto a las células WT, usando la construcción mCherry-GFP-FIS1, desarrollada específicamente para monitorizar la fusión de mitocondrias a lisosomas (Allen et al., 2013).

Dado que los resultados de este trabajo con células STIM1-KO muestran un incremento de expresión y actividad del canal $\text{Ca}_v1.2$, desencadenando un incremento en el influjo de Ca^{2+} extracelular en respuesta a la despolarización y provocando la disrupción de la homeostasis de Ca^{2+} , habíamos postulado que la inhibición de este canal en células STIM1-KO, por ejemplo a través del silenciamiento estable del mismo (CACNA1C knock-down, KD) podría atenuar la sobreactivación del canal, una acción que de hecho acabó normalizando los valores de senescencia hasta valores basales, lo que suponía una clara relación entre el influjo de Ca^{2+} a través de $\text{Ca}_v1.2$ y la muerte celular. En este sentido se ha propuesto que los tratamientos terapéuticos basados en dihidropiridinas, bloqueantes de VOCCs tipo L, pueden promover mejoría clínica en pacientes con demencia senil (Nimmrich and Eckert, 2013). De hecho, se conoce que tratamientos de larga duración con inhibidores de estos canales de tipo L, con el propósito de disminuir la hipertensión,



redujeron hasta en un 50% la demencia esporádica en pacientes de Alzheimer (Forette et al., 2002), lo que en su momento se interpretó como una confirmación de observaciones previas que vinculaban la hipertensión con el aumento del riesgo de padecer demencia vascular y Alzheimer (Birkenhäger et al., 2001), pero sin entrar a valorar la posibilidad de que fuera una sobreactivación de canales de tipo L en tejido cerebral lo que provocara la demencia. De forma similar, el tratamiento con nimodipina, bloqueante del canal $Ca_v1.3$, y con isradipina, que atenúa el influjo de Ca^{2+} a través de $Ca_v1.2$, se han mostrado como tratamientos útiles para la reducción de la pérdida de memoria y toxicidad neuronal características en la enfermedad de Alzheimer (Veng et al., 2003, Anekonda and Quinn, 2011).

En nuestro estudio, hemos demostrado además que el silenciamiento del gen *CACNA1C* restauraba el potencial de membrana interna mitocondrial en células STIM1-KO diferenciadas, y que se recupera la actividad del complejo I de la cadena de transporte mitocondrial, mostrando las células STIM1-KO/*CACNA1C*-KD diferenciadas una actividad incluso superior al fenotipo wild-type. Todos estos resultados ponen de manifiesto que la sobreactivación del canal $Ca_v1.2$ es el principal desencadenante de la muerte celular y disfunción mitocondrial observada en células SH-SY5Y diferenciadas y deficientes en STIM1 (Figura 54), una propuesta que concuerda bien con el efecto protector de las dihidropiridinas frente a la neurodegeneración característica de pacientes de Alzheimer que ya hemos citado.

Por otro lado, la notable disminución en la $[Ca^{2+}]_{mito}$ observada en las células STIM1-KO nos llevó a estudiar si la ausencia de STIM1 había alterado los mecanismos de captura de Ca^{2+} mitocondrial, un proceso que permite tamponar el exceso de Ca^{2+} en el citosol que puede originarse por la salida de Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares como el RE. Paralelamente, se conoce que la captación de Ca^{2+} por parte de la mitocondria a través del uniportador MCU es esencial para la activación de SOCE dependiente de la interacción STIM1-ORAI1 (Naghdi et al., 2010). Más recientemente se ha propuesto que SOCE desempeña una función clave en la captación de Ca^{2+} mitocondrial al regular la activación de MCU, ya que en linfocitos deficientes en STIM1 u ORAI1 se ha observado una reducción de la expresión de este uniportador y por tanto, una disminución en la tasas de captación de Ca^{2+} por parte de la mitocondria (Shanmughapriya et al., 2015). Por ello, en este trabajo se analizaron los niveles de expresión de MCU, y se observó que aunque en neuroblastos indiferenciados no hay cambios de expresión entre células WT y STIM1-KO, las células STIM1-KO diferenciadas mostraron un descenso significativo de la expresión de MCU, lo cual podría explicar el descenso de la $[Ca^{2+}]_{mito}$ y su consiguiente efecto en la pérdida de viabilidad celular.

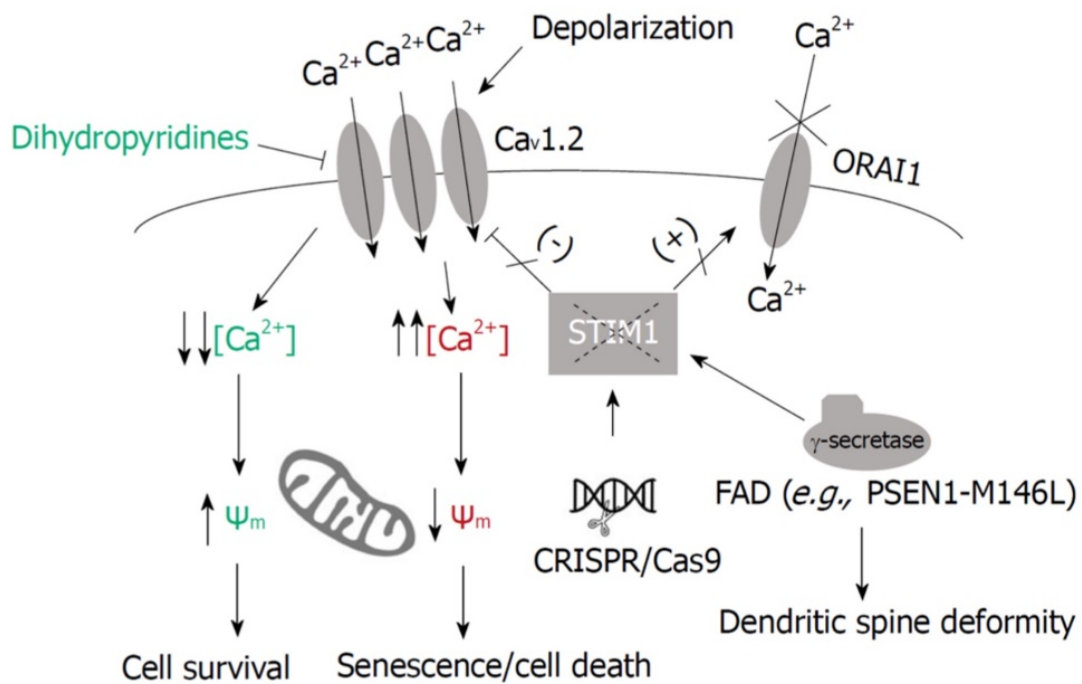


Figura 54. Deficiencia de STIM1 y neurodegeneración. Neuronas con la mutación PSEN1-M146L muestran un alto nivel de proteólisis de STIM1, disminución del nivel de STIM1 y de la entrada de Ca^{2+} por canales SOC, así como una disminución y desestabilización de las espinas dendríticas (Tong et al., 2016). Además, en pacientes con Alzheimer esporádico también se ha observado una reducción de la expresión de STIM1, lo cual se ha mimetizado en un modelo in vitro mediante la edición genómica del locus STIM1 en células SH-SY5Y utilizando el sistema CRISPR/Cas9 (Pascual-Caro et al., 2018a). Debido a que STIM1 es un regulador negativo del canal $\text{Ca}_v1.2$, su deficiencia desencadenó una entrada de Ca^{2+} aumentada a través de estos canales provocando una pérdida del potencial de membrana interna mitocondrial, así como un incremento de la senescencia y muerte celular (Pascual-Caro et al., 2018a). El elevado influjo de Ca^{2+} a través de canales $\text{Ca}_v1.2$ también se ha observado en ratones 3xTgAD, los cuales mimetizan las características moleculares de la enfermedad de Alzheimer (Wang and Mattson, 2014). Por último, se conoce que los tratamientos de larga duración con dihidropiridinas, inhibidores de $\text{Ca}_v1.2$, redujeron la demencia esporádica hasta en un 55% durante el envejecimiento. Todo ello indica que el déficit de STIM1 podría ser un posible mecanismo común para explicar la neurodegeneración característica del Alzheimer esporádico y familiar. Figura adaptada de (Pascual-Caro et al., 2018b).

En relación con la búsqueda de posibles causas adicionales que explicasen los bajos niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$ en células SH-SY5Y STIM1-KO, nos planteamos otras alternativas, como puede ser una alteración en el trasvase de Ca^{2+} entre el RE y la mitocondria. Por ello, se analizaron los niveles de expresión de los receptores de IP_3



(IP₃Rs), que desempeñan un papel clave en este proceso al constituir el principal mecanismo de movilización de Ca²⁺ desde el RE. En este sentido, además, el estudio llevado a cabo por Shanmughapriya y cols. determinaron que linfocitos deficientes en IP₃Rs mostraban una reducción de expresión y actividad de MCU como se había observado para los knock-out de STIM1 y ORAI1 (Shanmughapriya et al., 2015). Los datos presentados en el capítulo 2 de este trabajo indican que las células SH-SY5Y deficientes en STIM1 muestran una disminución significativa del nivel de mRNA del receptor de IP₃ tipo 3 (producto del gen *ITPR3*). De forma interesante, la sobre-expresión de STIM1 en células SH-SY5Y incrementó notablemente el nivel de mRNA para el receptor ITPR3, lo cual indica que existe una clara correlación positiva entre los niveles de expresión de STIM1 y el receptor de IP₃ tipo 3. No obstante los niveles de mRNA no siempre otorgan certeza sobre el nivel de expresión proteica, por lo que se analizaron los niveles de proteína, y se observó que las células STIM1-KO también muestran una menor expresión del canal ITPR3. Además, nuestros resultados muestran una atenuación en el eflujo de Ca²⁺ en respuesta ATP+carbacoil, agonistas de receptores purinérgicos y muscarínicos y que activan el eflujo de Ca²⁺ desde el RE gracias a los receptores de IP₃.

De este modo la menor liberación de Ca²⁺ desde el RE, en parte debida a una menor expresión de ITPR3, podría afectar a la transferencia de Ca²⁺ entre RE y la mitocondria, de vital importancia en el mantenimiento de la homeostasis del Ca²⁺, lo que explicaría en parte el descenso en la [Ca²⁺]_{mito} en las células STIM1-KO. La demostración de este nexo vino de los experimentos de rescate mediante sobre-expresión de ITPR3 en células STIM1-KO. Los resultados obtenidos utilizando el sensor de Ca²⁺ 4mtD3cpv, específico de la mitocondria, reflejaron que la sobre-expresión del receptor ITPR3 en células contribuye a la normalización de la [Ca²⁺]_{mito} en células STIM1-KO de manera significativa, aunque sin alcanzar los niveles observados en células WT. Estos datos sugieren que un déficit de STIM1 en células SH-SY5Y puede conllevar una disminución de expresión de ITPR3 en estas células, provocando una alteración importante en la desregulación de la [Ca²⁺]_{mito}. Estos resultados están en la línea de lo observado en neuronas de Purkinje de cerebelo de ratón, en donde la delección de STIM1 atenuó la activación de receptores de IP₃ y la transmisión sináptica dependiente de mGluR1, debido a una disrupción de la homeostasis del Ca²⁺ (Hartmann et al., 2014b).

Además, otros estudios revelan que la movilización de Ca²⁺ desde el RE por los receptores de IP₃ así como la transferencia de Ca²⁺ entre RE y mitocondria, son eventos esenciales para la eficiente oligomerización de STIM1 y la consiguiente activación de SOCE (Deak et al., 2014). En este contexto, Sampieri y cols. han descrito recientemente que la activación de la cascada de señalización de Ca²⁺ por IP₃ estimula la formación del complejo IP₃R-STIM1, favoreciendo la activación de STIM1 al generarse un

microambiente de bajos niveles de Ca^{2+} en las cercanías de su dominio mano-EF y potenciando la entrada de Ca^{2+} a través de canales SOC (Sampieri et al., 2018), como se ilustra en la Figura 55. Estos estudios junto con la reducción de expresión y actividad de ITPR3 ante la ausencia de STIM1 en células SH-SY5Y, determinados en nuestro trabajo, sugieren una vinculación directa y esencial de ambas proteínas para el mantenimiento de la homeostasis del Ca^{2+} .

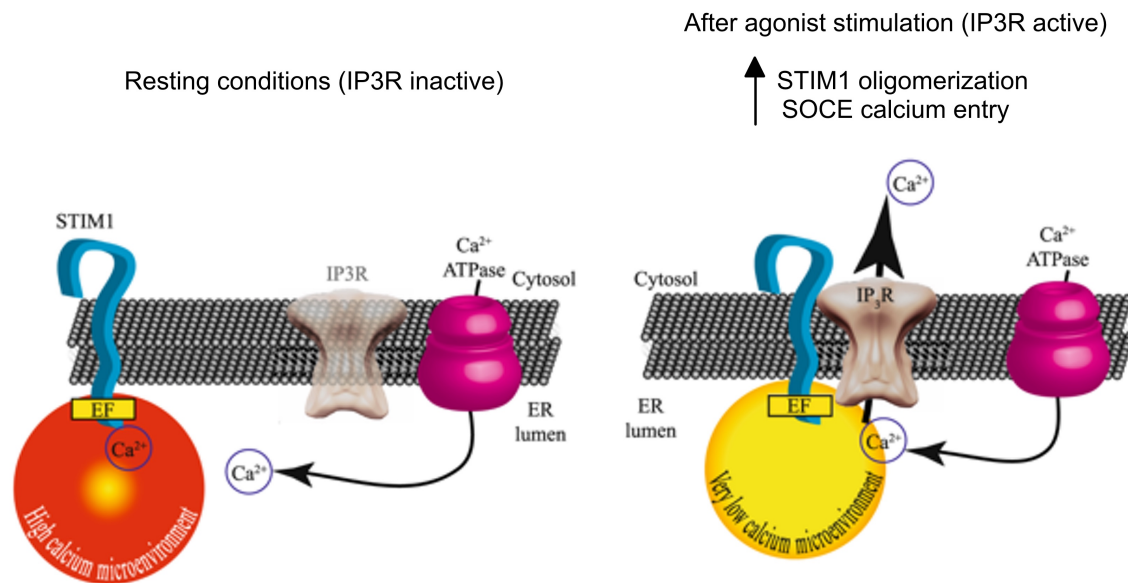


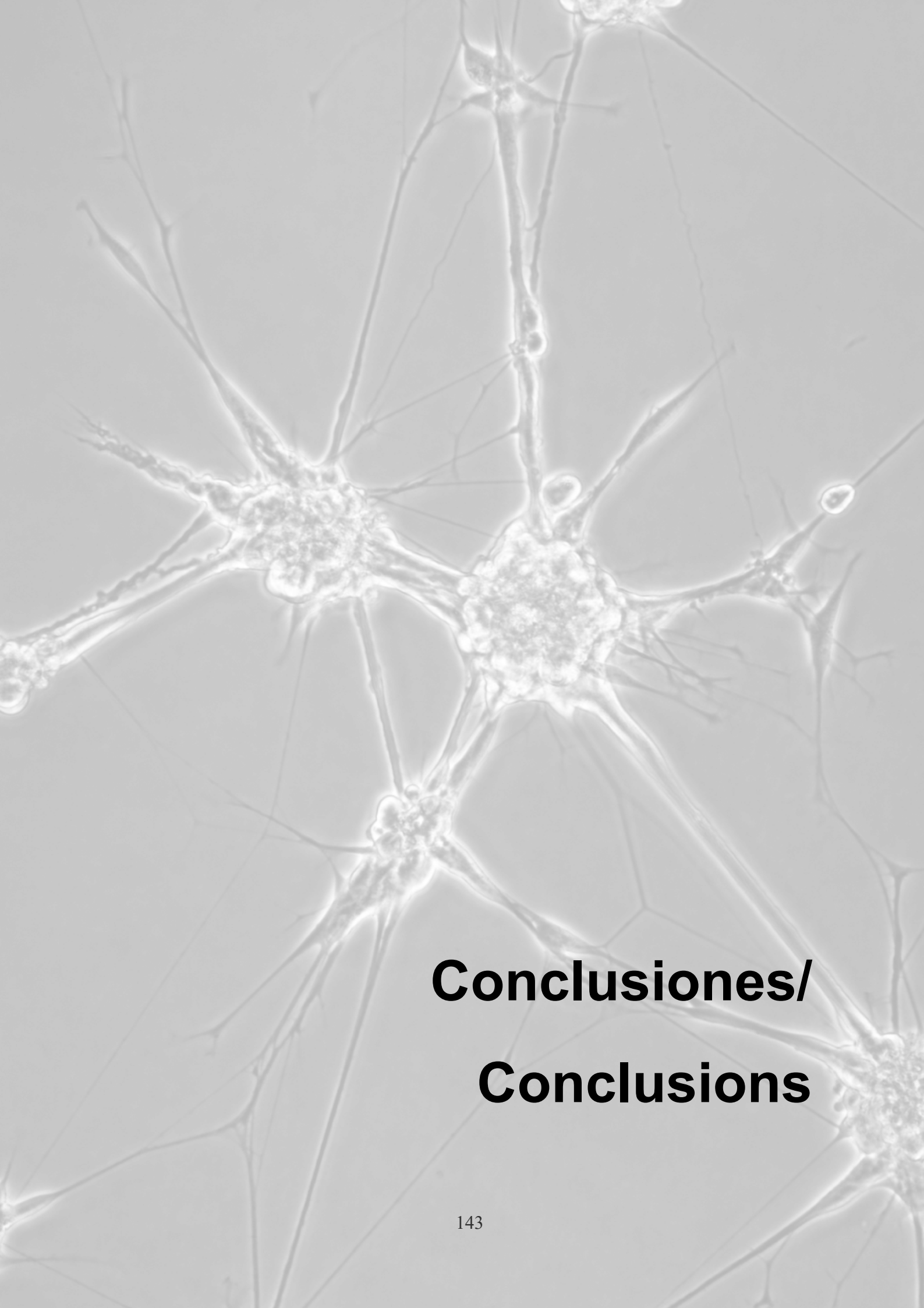
Figura 55. La activación de IP₃R genera un microambiente de bajos niveles de Ca^{2+} en las cercanías del dominio mano-EF de STIM1, potenciando su activación y la entrada de Ca^{2+} por SOCE. En el panel de la izquierda, se muestran las condiciones de reposo de una célula con sus depósitos intracelulares de Ca^{2+} completos y la proteína STIM1 inactiva. En el panel de la derecha, se muestra cómo tras la activación de la salida de Ca^{2+} a través de IP₃R se genera un microambiente de bajos niveles de Ca^{2+} en las proximidades del dominio mano-EF de STIM1, lo cual desencadena su oligomerización y activación potenciando el influjo de Ca^{2+} a través de canales SOC. Figura adaptada de (Sampieri et al., 2018).

No obstante, en la regulación de la homeostasis de Ca^{2+} por STIM1-ITPR3 podrían estar implicadas otras proteínas como la translocasa de la membrana externa mitocondrial TOM70, la cual se localiza preferentemente en sitios de contacto RE-mitocondria e interacciona con IP₃Rs facilitando su acercamiento a la mitocondria y favoreciendo la transferencia de Ca^{2+} desde el RE (Filadi et al., 2018). En este estudio reciente, se muestra cómo la depleción de TOM70 en diferentes líneas celulares, atenúa la transferencia de Ca^{2+} entre el RE y la mitocondria por parte de IP₃Rs, con un fuerte impacto en la bioenergética mitocondrial y celular. Este dato nos aporta el concepto de lo



esencial que resultan los sitios de interacción RE-mitocondria en el mantenimiento de los niveles de Ca^{2+} intracelular y cómo la alteración de proteínas implicadas en la liberación de Ca^{2+} , como STIM1 o los receptores de IP_3 , o bien otras asociadas a esta interacción como la citada TOM70, afectan de manera negativa a la funcionalidad mitocondrial y viabilidad celular.

En resumen, los resultados mostrados en esta Tesis Doctoral ponen de manifiesto la importancia de los niveles de STIM1 en células neuronales, un aspecto crítico para entender la neurodegeneración, ya que se ha mostrado que pacientes con enfermedad de Alzheimer, ya sea familiar o esporádica, presentan una disminución significativa de la proteína. Así, hemos pretendido desarrollar un modelo celular in vitro para estudiar los efectos celulares de la deficiencia de STIM1, lo que nos ha permitido encontrar dos dianas, la sobreexpresión de canales $\text{Ca}_v1.2$ y la disminución de expresión y actividad de receptores IP_3R , que pueden explicar la desregulación de la concentración de Ca^{2+} libre citosólico, mitocondrial, pérdida del potencial de membrana interna mitocondrial, senescencia y muerte neuronal, un fenotipo que se observa en patologías neurodegenerativas.



**Conclusiones/
Conclusions**



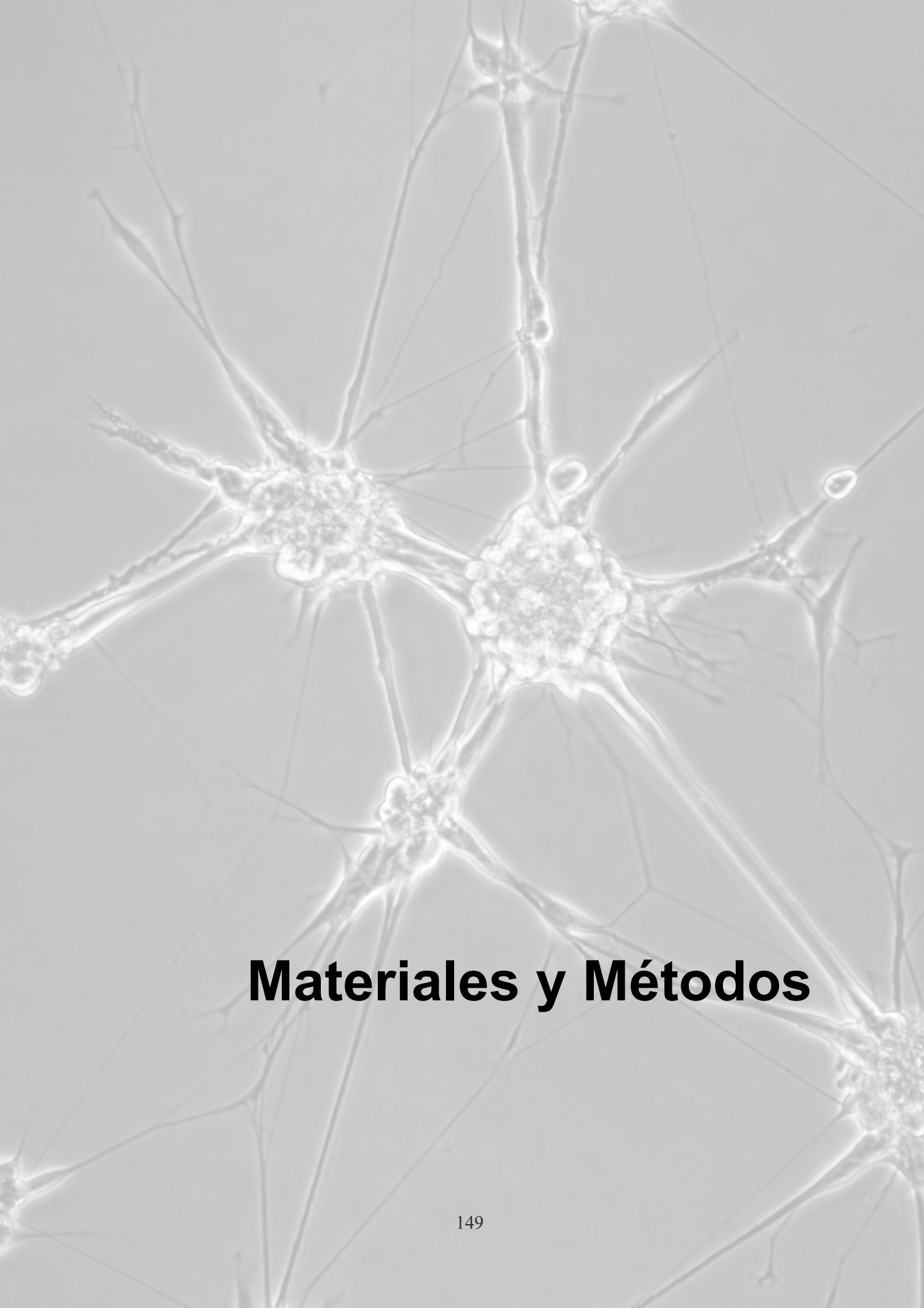
Las conclusiones derivadas del trabajo desarrollado durante la realización de esta Tesis Doctoral son:

1. El nivel de expresión de la proteína STIM1 se ve incrementado durante la diferenciación neuronal de células SH-SY5Y. Sin embargo, este incremento no va asociado a un aumento del influjo de Ca^{2+} a través de canales SOCs, lo que sugiere que STIM1 tiene una función independiente de estos canales durante la diferenciación neuronal.
2. STIM1 no es esencial para la diferenciación de neuroblastos SH-SY5Y inducida por ácido retinoico y BDNF.
3. La ausencia de STIM1 lleva asociada una pérdida de la viabilidad en células SH-SY5Y diferenciadas, caracterizada por un incremento en los niveles de senescencia, despolarización de la membrana interna mitocondrial, inhibición del complejo I de la cadena transportadora de electrones e incremento en el nivel de mitofagia.
4. La sobreactivación del canal $\text{Ca}_v1.2$ es responsable de la alteración de la homeostasis de Ca^{2+} , de la senescencia y de la disfunción mitocondrial observada en células STIM1-KO diferenciadas ya que el silenciamiento génico del canal $\text{Ca}_v1.2$ normaliza la viabilidad celular y la funcionalidad mitocondrial en células STIM1-KO.
5. STIM1 regula los niveles de expresión del receptor de IP_3 tipo 3, por lo que STIM1 es un modulador de la transferencia de Ca^{2+} entre el retículo endoplasmático y la mitocondria, una acción en la que participan de forma directa los receptores de IP_3 .



The conclusions raised by the results shown in this Doctoral Thesis are the following:

1. The expression level of STIM1 protein increases during neuronal differentiation of SH-SY5Y cells. However, this increase is not associated with an increase in the Ca^{2+} influx through SOC channels, suggesting that STIM1 has a SOC-independent function during neuronal differentiation.
2. STIM1 is not essential for the differentiation of neuroblastoma SH-SY5Y cells triggered by retinoic acid and BDNF.
3. The absence of STIM1 is associated with a loss of viability in differentiated SH-SY5Y cells, characterized by an increase of senescence, mitochondrial inner membrane depolarization, inhibition of mitochondrial electron transport chain complex I, and increased mitophagy.
4. The upregulation of $\text{Ca}_v1.2$ channels is responsible of the Ca^{2+} homeostasis dysregulation, senescence and mitochondrial dysfunction observed in differentiated STIM1-KO cells, since the gene silencing of $\text{Ca}_v1.2$ channel normalizes cell viability and mitochondrial function in STIM1-KO cells.
5. STIM1 regulates the expression level of IP_3 receptor type 3. Thus, STIM1 is a modulator of the Ca^{2+} transfer between the endoplasmic reticulum and the mitochondria, an action in which IP_3 receptors are involved directly.



Materiales y Métodos



1. CULTIVOS CELULARES.

1.1. Cultivo de la línea celular.

En este estudio se ha utilizado la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, la cual toma su origen en una subclonación de la línea SK-N-SH que fue aislada a partir de una biopsia de médula ósea de una paciente de cuatro años.

Las líneas celulares se conservan y almacenan en crioviales a -80°C en medio de congelación¹. Las células se cultivan en medio DMEM completo² a 37°C y en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 . Las células cultivadas crecen formando monocapas hasta alcanzar una confluencia del 80%. Para recrear un cultivo, inicialmente, la monocapa de células se lava con PBS³ y se incuba con una solución de tripsina⁴ durante 3-5 minutos a 37°C . A continuación, la tripsina se inactiva por la adición de medio completo. Si el experimento requiere un número de células concreto, se toma una alícuota de las células tripsinizadas y se cuentan utilizando un hematocitómetro (cámara Neubauer). Posteriormente, las células se siembran en placas de cultivo hasta alcanzar la confluencia deseada para iniciar cada experimento.

1.2. Diferenciación de neuroblastos SH-SY5Y.

Las células SH-SY5Y constituyen un modelo in vitro de amplio uso en neurobiología al ser utilizadas en ensayos que tienen por objeto el estudio de enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, estos neuroblastos indiferenciados comparten pocas características con las neuronas maduras y, por ello, requieren ser sometidos a protocolos de diferenciación neuronal con el fin de adquirir unas características más comunes al fenotipo neuronal. Además, en las células SH-SY5Y debemos diferenciar dos subpoblaciones: tipo N o neuroblásticas que son las que tienden a diferenciarse tras los tratamientos adecuados y tipo S o sustrato adherente que no se diferencian y mantienen su ciclo de división como neuroblastos indiferenciados (Forster et al., 2016).

En este estudio, el protocolo de diferenciación neuronal seguido está basado en el método descrito por (Encinas et al., 2000), en el que se estimula la diferenciación neuronal a través de un tratamiento con ácido retinoico y BDNF⁵ (Figura 56). Previamente a la siembra del experimento se preparan placas de 35 mm de diámetro (placa de 24 pocillos

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

² **Medio de cultivo completo:** DMEM suplementado con FBS 10%, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomina 100 µg/ml.

³ **PBS:** NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 4.3 mM, KH_2PO_4 1.5 mM, pH 7.4.

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

⁵ **BDNF:** Brain-derived neurotrophic factor.



en el caso de los ensayos de viabilidad celular por MTT) y se tratan con una solución de colágeno al 0.01% (disuelto en agua Milli-Q) durante un mínimo de 30 min a 37°C. El colágeno se lava 3 veces con PBS y a continuación se siembran 1×10^4 células/placa en medio suplementado con 15% de suero fetal bovino (FBS) y a las 24 horas (considerado como el día 1 del ensayo, 1 DIV = 1 día in vitro) se añade un tratamiento de ácido retinoico $10 \mu\text{M}$. Tras 48 horas (3 DIV), se aspira el medio de cultivo y se añade medio con ácido retinoico fresco.

En el 6º día de cultivo (indicado como 5DIV en la Figura 56) se aspira el medio, se lavan las placas con PBS o DMEM no suplementado para eliminar la mayor cantidad posible de suero y se añade BDNF 50 ng/ml en medio DMEM/F12⁶. Tras 2 días se vuelve a añadir BDNF fresco a la misma concentración y con este medio se mantienen hasta el 9º-12º DIV, que es cuando finaliza el experimento. Posteriormente se lleva a cabo la obtención de lisados celulares o la monitorización por microscopía según el experimento que corresponda.

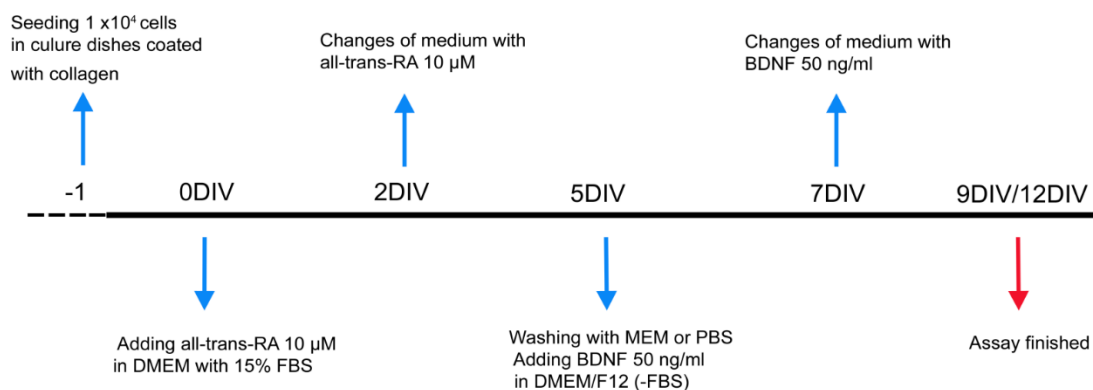


Figura 56. Protocolo de diferenciación neuronal en células SH-SY5Y. Los neuroblastos de la línea SH-SY5Y se diferencian mediante tratamientos con ácido retinoico y el factor neurotrófico BDNF. La adición de ácido retinoico ($10 \mu\text{M}$) se lleva a cabo a las 24 horas de la siembra y se renueva por ácido retinoico fresco tras 2 días. En el 5º DIV, se elimina el FBS mediante lavados de PBS y se añade BDNF (50 ng/ml) en medio DMEM/F12 libre de FBS. Este tratamiento se renueva a los 7 DIV y las células se mantienen en ese medio hasta la finalización del ensayo a los 9-12 DIV.

⁶DMEM/F12: Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 Ham suplementado con L- glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 $\mu\text{g/ml}$



2. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR.

El ensayo de viabilidad es un ensayo colorimétrico basado en la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), que permite determinar la funcionalidad mitocondrial de las células en cultivo. Esta reacción es llevada a cabo por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de células metabólicamente activas, la cual transforma el MTT (hidrofílico y de color amarillo) en formazán (compuesto hidrofóbico y de color azul violáceo).

Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular, así como para determinar la citotoxicidad de potenciales agentes terapéuticos ya que la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán generado. Este método fue desarrollado por (Mosmann, 1983) siendo modificado por (Denizot and Lang, 1986).

2.1. Ensayo de viabilidad celular en neuroblastos SH-SY5Y.

En una placa de 24 pocillos (o 12 pocillos según las características del ensayo) las células se siembran a una densidad 1×10^4 células/pocillo en medio suplementado con FBS 10%. A las 24 horas de la siembra se realiza la primera medida del ensayo de viabilidad por MTT (si el ensayo se quiere realizar en células diferenciadas se siguen los tratamientos explicados en el apartado 1.2). Para ello, se aspira el medio de cultivo, se añade 1 ml de HBSS⁷, se incuban las células 5 minutos con esa solución en el incubador a 37°C y 5% CO₂ para que se atemperen y a continuación se adiciona MTT (concentración final = 300 µg/ml) a cada pocillo, excepto a un pocillo que se mantiene sólo con HBSS y que será nuestro blanco en la calibración del espectrofotómetro.

Tras la adición de MTT se realiza una incubación de 30 minutos (a 37°C y 5% CO₂) y transcurrido este tiempo se aspira el medio de los pocillos y se añade 1 ml de DMSO para resuspender el formazán generado. Las medidas espectrofotométricas se realizan a absorbancias de 550 nm y 695 nm tras haber establecido previamente la línea base con nuestro blanco, siendo nuestro valor experimental el correspondiente al diferencial $Abs_{550nm} - Abs_{695nm}$.

En este trabajo se ha evaluado la viabilidad celular de neuroblastos y células diferenciadas, así como células tras un tratamiento con nifedipina (bloqueante de canales de calcio sensibles a dihidropiridina). La adición de nifedipina tiene lugar a las 24 post-

⁷ **HBSS (Hank's Balanced Salt Solution):** NaCl 138 mM, KCl 5.3 mM, Na₂HPO₄ 0.34 mM, KH₂PO₄ 0.44 mM, NaHCO₃ 4.17 mM, D-glucosa 5.56 mM, Mg²⁺ 2.2 mM, EGTA 0.1 mM (pH 7.4).



siembra y se renueva por nifedipina fresca el 3º y 5º día in vitro, coincidiendo con la adición a las células de ácido retinoico y BDNF respectivamente.

3. CLONAJE MOLECULAR.

3.1. Cuantificación del DNA.

La concentración de DNA se determina por espectrofotometría, teniendo en cuenta que 50 µg/ml de DNA en solución acuosa tienen un valor de absorbancia a 260 nm (A_{260}) igual a 1.0. Para estimar la pureza del extracto se calcula la relación A_{260}/A_{280} , que debe resultar un valor comprendido entre 1.8-1.9 para una disolución de DNA puro.

3.2. Transformación bacteriana.

El método de transformación bacteriana seguido es el descrito por (Hanahan, 1983) y se basa en la realización de un choque térmico para favorecer la captación del cDNA. Para ello, se transforman 20 µl de bacterias competentes del tipo DH5αF' de *Escherichia coli* (*E. coli*) con 1-5 µl de una mezcla de ligación (plásmido con resistencia a al antibiótico adecuado, y el inserto correspondiente al cDNA que corresponda en cada caso). A continuación, se incuban las bacterias en hielo durante 30 min y después se someten a un choque térmico a 42°C durante 1 minuto, seguido de una breve incubación en hielo durante 5 min. Una vez transformadas las bacterias, se recuperan incubándolas en 500 µl de medio LB (Luria-Bertani) durante 1.5-2 horas con una agitación suave a 37°C. Finalmente se siembran por extensión 50-80 µl del medio que contiene las bacterias en una placa de LB-agar suplementada con el antibiótico correspondiente en cada caso, y se incuba la placa a 37°C durante 16-18 h.

3.3. Obtención del DNA plasmídico.

A partir de las colonias de bacterias crecidas en la placa de LB-agar se realiza un crecimiento de las colonias seleccionadas en 1-5 ml de medio LB con antibiótico (100 µg/ml de ampicilina o 50 µg/ml de kanamicina) y se incuban a 37°C en agitación (250 rpm) durante 12-14 horas. Tras el crecimiento del cultivo se procede a la centrifugación del mismo a 4°C y 13000 g durante 5 min. Finalmente, a partir del precipitado de bacterias se realiza la purificación del plásmido siguiendo el protocolo de purificación del kit Qiagen. Una vez extraído y purificado el DNA se procede a su secuenciación, que en nuestro caso se realizó en el Servicio de Técnicas Aplicadas a las Biociencias (STAB), de los Servicios de Apoyo a la Investigación de la UEx (SAIUEX).



3.4. Construcciones de DNA, transfección y expresión ectópica de proteínas.

Para la expresión transitoria de proteínas (como en el caso del sensor de Ca^{2+} 4mtD3-cpv) las células se transfectaron con plásmidos que incluyen los cDNA que codifican para las proteínas de interés. En el anexo 1 se muestran las construcciones utilizadas en el desarrollo de este trabajo.

La transfección de las construcciones de DNA se realiza 4-5 horas después de la siembra utilizando 1-2 μg de DNA por placa de 10 cm de diámetro para la línea celular SH-SY5Y. Como agente de transfección se utiliza polietilenimina (PEI), 20 μl de una solución stock 1 mg/ml por placa. Los experimentos se realizan 24-48 horas después de la transfección para asegurar una adecuada expresión de la proteína de interés.

En determinados experimentos y para favorecer la reproducibilidad y desarrollo de los mismos, se buscó generar líneas celulares que expresaran de forma estable la proteína de interés. Para ello existen diversos métodos, como la transfección de vectores con resistencia al antibiótico G418 o geneticina (análogo de la neomicina) o el uso de sistemas de transfección retroviral. Estos procedimientos se detallan de manera más precisa en los siguientes subapartados.

3.4.1. Transfección estable por resistencia a G418.

Este método consiste en clonar el cDNA de la proteína que queremos expresar de forma estable en un vector que confiere resistencia al antibiótico G418. Las células se crecen en medio suplementado con G418, de modo que sólo aquellas células que integren la construcción serán resistentes a la selección con antibiótico y expresarán de forma estable la proteína de interés.

En este trabajo se ha utilizado este procedimiento para generar una línea SH-SY5Y que exprese de forma estable la proteína STIM1. Para ello, se clonó el cDNA de Stim1 de ratón (número de acceso NM_009287) en el vector pcDNA3.1 tomando como base una construcción que presentaba este mismo inserto en el vector pcDNA5-FRT/TO (Pozo-Guisado et al., 2010). Para aislar dicho cDNA se escindió el inserto (cDNA de Stim1) del vector, con las enzimas BamHI/NotI, y el inserto aislado se ligó a la construcción pcDNA3.1 en puntos de cortes generados por las mismas enzimas de restricción. Además, se ha utilizado este método para generar una línea SH-SY5Y STIM1-KO que exprese de forma estable la proteína ITPR3-Myc, empleando el cDNA de ITPR3 de ratón (número de acceso NM_080553) clonado en un vector pCMV6-Entry (obtenido a partir de la construcción comercial MR225699 de Origene).

Este mecanismo de generación de líneas celulares con expresión ectópica de proteínas se desarrolla en varios pasos: 1) Establecimiento de la concentración mínima



de antibiótico que ocasiona la muerte celular en células SH-SY5Y sin transfectar (para el caso de las células SH-SY5Y se opta por una concentración de 600 $\mu\text{g/ml}$ de G418 tras este ensayo); 2) Siembra de 2×10^6 células por placa de 10 cm de diámetro; 3) Tras 3-4 horas de la siembra se transfectan las células con el vector de interés (1.5 μg DNA+ 20 μl PEI + 1 ml medio sin suplementar); 4) Tras 24 horas se añade medio de selección con el antibiótico G418, realizándose cambios de medio cada 2-3 días hasta observar una muerte celular del 100% en la placa control (placa que se siembra el mismo día que la experimental, pero que no se transfecta con el vector); 5) Tras el período de selección (7-8 días), se recrecen las colonias de células resistentes y se congelan en crioviales para su conservación a -80°C . Posteriormente, a partir de ensayos de inmunoblot se determina si la línea celular expresa de forma estable la proteína de interés.

3.4.2. Transfección retroviral.

Los sistemas de transfección retrovirales utilizan las propiedades de replicación víricas para llevar a cabo la integración de una secuencia deseada de DNA en un genoma hospedador. Estos retrovirus modificados conservan la capacidad de infectar a las células hospedadoras, sin embargo, no poseen los genes esenciales para la producción de nuevas partículas víricas (viriones), de modo que pueden transferir un cDNA de interés al genoma de células diana, sin llevar a cabo la replicación viral en las mismas.

Para facilitar este sistema, existen células empaquetadoras de partículas virales como las Phoenix-AMPHO 293 que contienen en su genoma los genes responsables de la encapsulación del virus como gag, pol y env, de modo que sólo deben ser transfectadas con el vector que lleva el cDNA de interés. Estas células son ampliamente usadas ya que aseguran un alto porcentaje de transfección y producción de viriones. Un esquema representativo de este sistema se ilustra en la Figura 57.

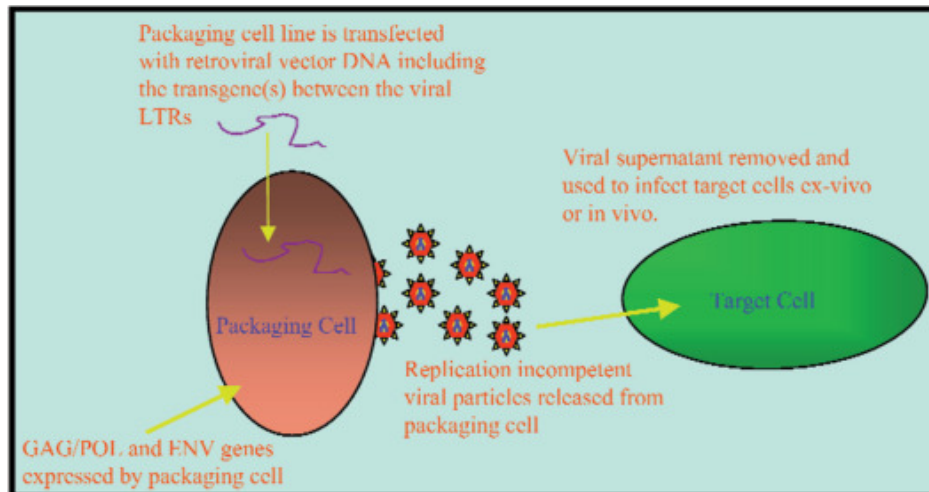


Figura 57. Generación de viriones con replicación defectiva en células empaquetadoras

(Daly and Chernajovsky, 2000). Las células empaquetadoras (Phoenix-AMPHO 293 en nuestro estudio) que han sido modificadas por ingeniería genética para expresar las proteínas estructurales de retrovirus, son transfectadas con un vector retroviral que contiene el inserto/gen de interés, y tras producirse la retrotranscripción viral se generan viriones que incorporan el mRNA del inserto de interés. El medio extracelular, que contiene los viriones se puede usar para transfectar células diana ex-vivo o in-vivo.

En el desarrollo de este estudio se ha utilizado esta técnica para generar líneas celulares con distintas finalidades:

- 1) Sobreexpresar un shRNA de 29 nucleótidos clonado en el vector pRFP-C-RS (OriGene #TF314247-A) con el fin de reducir la expresión del gen *CACNA1C* humano que codifica para la proteína $Ca_v1.2$.
- 2) Expresar de forma estable la construcción mCherry-GFP-FIS1, clonada en un vector pBABE-hygromicina (Universidad de Dundee #DU40799).

El protocolo de transfección retroviral utilizado en este trabajo es el descrito en (Karlseider et al., 2002, Li and de Lange, 2003) el cual se desarrolla en varios pasos:

- 1) Las células Phoenix 293 se siembran en placas de 10 cm de diámetro para que transcurridas 24 horas presenten una confluencia del 40-50%.
- 2) Transcurridas 24 horas las células se transfectan con 12 μ g del cDNA de interés, empleando PEI como agente de transfección (12 μ g de cDNA + 20 μ l de PEI + 1 ml de DMEM (sin suplementar), por placa de 10 cm de diámetro). Este mismo día se siembran las células diana (SH-SY5Y en el caso de nuestro estudio) para tener una confluencia del 30-40% al día siguiente.



3) Transcurridas 24 horas desde la transfección, se recoge el medio de las células Phoenix (conteniendo partículas virales), se filtra (0.22 μm de tamaño de poro) para que no exista contaminación entre líneas celulares de distinto origen, y se añade medio fresco a las células Phoenix, dejándolas de nuevo en el incubador hasta el siguiente día.

4) A continuación las células diana SH-SY5Y se incuban con el medio de partículas virales mezclado con polibreno, el cual es usado como agente de transducción (5 ml medio viriones + 1.06 μl polibreno (stock 18.75 mg/ml), para una placa de 10 cm de diámetro).

5) A las 6-8 horas posteriores a la incubación con los viriones (en la que el polibreno se encuentra a una concentración de 4 $\mu\text{g/ml}$) se añaden 5-6 ml de medio suplementado a la placa para que la concentración de polibreno no sea superior a 2 $\mu\text{g/ml}$ ya que una incubación prolongada a una concentración superior a este valor es tóxica.

6) Al día siguiente, se repite el mismo procedimiento en una segunda ronda o ciclo de infección.

7) Transcurridas 48 horas desde la primera transducción en células dianas, se elimina el medio con viriones y se añade medio fresco para favorecer el crecimiento de las células.

8) Tras 24 horas de recuperación en medio de cultivo las células se incuban en medio de selección (medio de cultivo con puromicina 1.8 $\mu\text{g/ml}$ o con higromicina 500 $\mu\text{g/ml}$ según la resistencia antibiótica que presente el vector transfectado).

Finalmente, las células se mantienen en medio de selección, reemplazando el medio cada 48 horas, hasta obtener colonias resistentes. La validación de la línea celular generada se realiza por inmunodetección de la proteína sobreexpresada a partir de lisados celulares y observando el cultivo en el microscopio de fluorescencia invertido en el caso de que la proteína presenta algún tipo de tag fluorescente. Una vez confirmado que las células expresan correctamente la proteína de interés, los cultivos se expanden y se almacenan en crioviales en N_2 líquido hasta su utilización.

Tanto en la generación de líneas por selección con G418 como por infección retroviral, de forma previa a la obtención de los clones se lleva a cabo una individualización celular o *cell sorting*. Así, un cultivo al 60-70% de confluencia se lava con PBS y se incuba en una solución de TrypLE Express™ durante 3 minutos a 37°C. Se inactiva la solución de disociación con 2-3 volúmenes de medio de cultivo y se recoge la suspensión celular que se centrifuga durante 5 min a 200 g. A continuación, se resuspende el precipitado celular en una solución de DMEM o PBS con FBS 2% y se aíslan individualmente las células en una placa de 96 pocillos mediante citometría (*cell sorting*). Las células se incuban en medio condicionado (medio procedente de otro cultivo



de células SH-SY5Y) en atmósfera de aire humidificado con 5% de CO₂ a 37°C. El medio de cultivo se reemplaza a las 48 horas para facilitar el crecimiento celular.

4. CRISPR.

El sistema CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas interespaciadas agrupadas de forma regular) tipo II es un sistema inmune bacteriano que ha sido modificado mediante ingeniería genética. Debido a su simplicidad y adaptabilidad, el uso del sistema CRISPR se ha extendido constituyendo una de las herramientas de edición génica más populares.

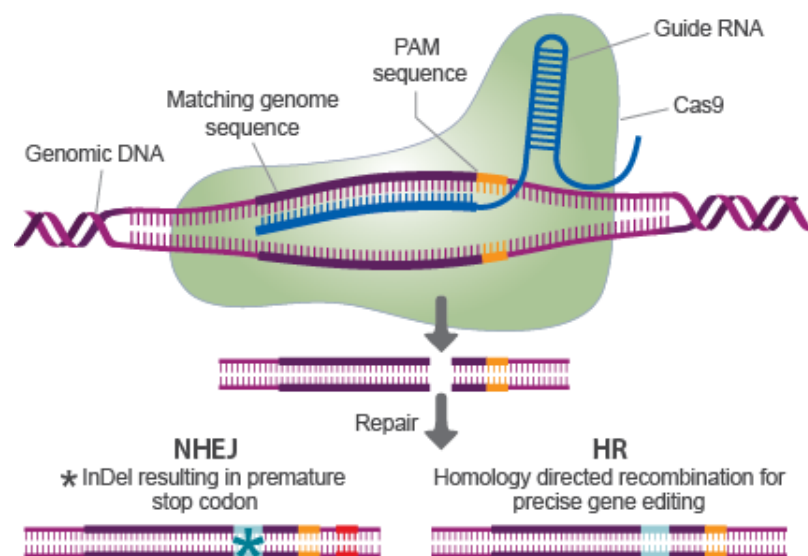


Figura 58. Mecanismo de acción del sistema CRISPR/Cas9. El sistema de edición genómica CRISPR/Cas9 es una adaptación del sistema inmune procariótico. La nucleasa Cas9 introduce un corte en cada hebra del DNA (DSBs), que puede ser reparado mediante dos mecanismos: (1) recombinación de extremos no homólogos (NHEJ), la cual crea inserciones o deleciones aleatorias (indels), y (2) recombinación homóloga (HDR), que crea cambios específicos basados en el molde de DNA empleado para la reparación del DSB.

El sistema CRISPR está formado por dos componentes: un RNA guía (gRNA) y una endonucleasa asociada a CRISPR (Cas9). El gRNA es una secuencia corta de RNA constituida por una secuencia de nucleótidos necesaria para la unión de la endonucleasa Cas9 a su diana, y una secuencia repetida de nucleótidos de aproximadamente 20 pares de bases denominada “DNA espaciador”, la cual reconoce secuencias específicas permitiendo a la endonucleasa Cas9 generar cortes en la secuencia de DNA diana que será modificada en el genoma. De esta manera, la secuencia del gRNA especifica la



secuencia diana de la Cas9. La Figura 58 muestra un esquema ilustrativo de este sistema de edición genómica.

En nuestro estudio se ha empleado el sistema CRISPR que lleva como nucleasa la Cas9 D10A (nickase), la cual presenta una modificación en uno de sus aminoácidos con respecto a la Cas9 silvestre y esto lleva a la enzima a realizar un corte simple en la doble cadena de DNA, favoreciendo la eficiencia de este sistema de edición genómica al reducir significativamente el número cortes en secuencias fuera de la diana deseada (off-targets).

4.1. Generación de una línea celular SH-SY5Y STIM1-KO con el sistema CRISPR/Cas9.

La generación de la línea celular knock-out (KO) para la supresión de expresión de la proteína STIM1 en la línea celular SH-SY5Y se realizó siguiendo un protocolo en el que se pueden diferenciar tres etapas: (1) clonación, (2) transfección y (3) validación de clones.

(1) Clonación: La secuencia diana del genoma debe reunir dos condiciones:

1. La secuencia de nucleótidos debería ser única, comparándola con el resto del genoma.
2. La secuencia diana de DNA debe estar localizada inmediatamente corriente arriba de una secuencia PAM (Protospacer Adjacent Motif). En el caso de la endonucleasa Cas9 de *Stroptococcus pyogenes* sería 5'-NGG3'.

Ej: 5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGG 3'

El locus del gen *STIM1* (ENSG00000167323) presenta tres variantes transcripcionales NM_001277961.1 (conocida como STIM1L), NM_001277962.1 (para STIM1 canónica), y NM_003156.3 (STIM1S). La secuencia de DNA elegida como sitio diana de CRISPR se encuentra localizada en el exón 5, por ser éste común a las tres variantes transcripcionales de la proteína.

El par de RNA guías (sentido 5'-AGATGACAGACCGGAGTCATCGG y antisentido 5'-AGTCCCTGTCATGGTGGTGTGG) se identificaron utilizando la herramienta bioinformática del Sanger Institute: (http://www.sanger.ac.uk/htgt/wge/find_crisprs) y se diseñaron siguiendo el método de Zhang (Cong et al.), en colaboración con el Dr. Thomas Macartney (Universidad de Dundee). Las secuencias de DNA correspondientes a estas secuencias se insertaron en dos vectores diferentes: el RNA guía antisentido se clonó en el vector pX335 (Addgene plasmid #42335) que contiene la información para la expresión



de spCas9 D10A, mientras que el RNA guía sentido se clonó en el vector pBABED PU6 (Universidad de Dundee), que contiene el gen de resistencia a puromicina (Rojas-Fernandez et al., 2015, Munoz et al., 2014).

(2) Transfección: Las células SH-SY5Y se siembran en placas de 10 cm de diámetro hasta alcanzar una confluencia del 40-50%. Tras 3-4 horas después de la siembra, las células se co-transfectan con 1 μ g de cada plásmido utilizando PEI como agente de transfección. Tras 24 horas de recuperación en medio DMEM y 48 horas adicionales en medio de selección DMEM + puromicina (2 μ g/ml), se repite la transfección y la ronda de selección con puromicina, enriqueciendo el cultivo de células transfectadas. A continuación, las células se individualizan por citometría y los clones de células se cultivan para el posterior análisis de expresión de la proteína de interés.

(3) Validación de clones: Este procedimiento se llevó a cabo en primer lugar estudiando la expresión de la proteína por inmunoblot. De esta forma se seleccionaron los clones defectivos para la proteína STIM1, que posteriormente se validaron por secuenciación genómica.

Para este último apartado y a partir del precipitado de células de los clones seleccionados mediante inmunoblot, se procedió al aislamiento del DNA genómico siguiendo el protocolo indicado en el kit de Thermo-Scientific (GeneJET Genomic DNA Purification Kit #K0722). A continuación, se realizó una PCR para amplificar el sitio diana de la nucleasa (Figura 59), utilizando la polimerasa Herculasa II y los siguientes primers o cebadores:

Forward: 5'-CAAGAGCTAGAAGTGTTCCCTGGG-3'

Reverse: 5'-CTTTGGTTTCCATGGCACAGC-3'

El programa de amplificación de DNA genómico utilizado para STIM1-KO se basa en una desnaturalización inicial a 95°C durante 2 minutos, seguida de 30 ciclos consistentes en una desnaturalización a 95°C durante 20 segundos, hibridación de los primers con el DNA molde a 53°C durante 20 segundos y una extensión de la cadena a 72°C durante 30 segundos.

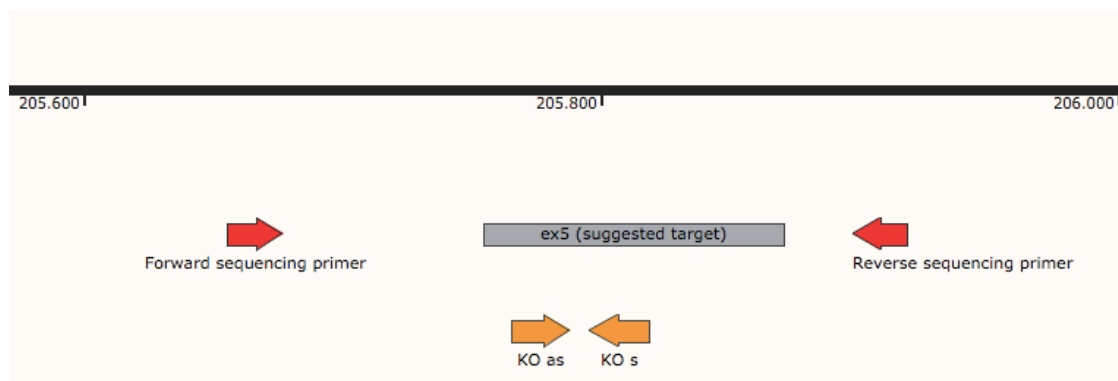


Figura 59. Estrategia de amplificación del fragmento diana en la estrategia CRISPR-Cas9 para el knock-out del locus *STIM1*. Con esta estrategia se amplifica un fragmento de 263 pares de bases delimitado por los primers forward y reverse (flechas rojas) alrededor del sitio diana para la nucleasa Cas9 (situado en el exón 5), el cual se identifica con los primers KO sentido (KO s) y antisentido (KO as) (flechas amarillas).

El producto de PCR resultante se subclona utilizando el kit StrataClone Blunt End PCR Cloning (Agilent Technologies). Las células competentes incluidas en el kit anteriormente mencionado se transforman y se siembran en placas de LB-agar con resistencia a ampicilina. Posteriormente se seleccionan 10-12 colonias para verificar la alteración en la secuencia génica mediante PCR. Las colonias se cultivan individualmente en 2 ml de LB + ampicilina (100 µg/ml) y posteriormente se procede a la purificación del plásmido siguiendo el protocolo incluido en el kit de Qiagen, y el producto es analizado mediante secuenciación. El producto de PCR de cada clon de células es una mezcla de dos productos, debido a la presencia de dos alelos, pero en la práctica el análisis de 10 colonias procedentes de una línea clónica es suficiente para verificar el conjunto de alelos de una muestra (Lai et al., 2015).

5. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CELULARES E INMUNOBLOT.

5.1. Preparación de extractos celulares.

Los extractos proteicos se obtuvieron a partir de cultivos celulares sembrados en placas de 10 cm de diámetro. Tras retirar el medio de cultivo, las células se lavan con PBS a 4°C y se lisan con 1 ml de tampón de lisis⁸ para extractos proteicos totales. Posteriormente, los lisados se sonicar (Sonicador Branson Digital; 4 pulsos de 10

⁸ **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-P40, sacarosa 270 mM, DTT 1 mM, benzamidina 1 mM y PMSF 1 mM.



segundos a 40% de amplitud) para dispersar las membranas celulares. Por último, las muestras se clarifican centrifugando a 20.000 g durante 15 minutos a 4°C. Todo el proceso de obtención de extractos celulares se realizó en frío.

5.2. Medida de la concentración de proteína.

La concentración de proteína de los extractos celulares se determinó mediante el método colorimétrico de Bradford, utilizando como estándar la albúmina de suero bovino (BSA). La concentración de proteína se determina midiendo la absorbancia de las muestras a 594 nm e interpolando los valores obtenidos en una recta patrón generada a partir de cantidades de proteína (BSA) conocidas (1-4 µg).

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

Para la realización de las electroforesis de proteínas en geles desnaturizantes de poliacrilamida se utilizó el sistema de tampón discontinuo (Laemmli, 1970). La cantidad de proteína total (10-40 µg) de los extractos celulares se mezcla con el volumen adecuado de tampón de carga⁹ para proteína. Las proteínas se separan en función del peso molecular sometiénolas a electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes por la presencia del detergente iónico SDS (SDS-PAGE)¹⁰. Se emplearon geles de poliacrilamida con diferentes concentraciones (4-12%).

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas presentes en el gel se transfieren a membranas de nitrocelulosa (BioRad) por aplicación de un campo eléctrico en una cubeta que contiene tampón de transferencia¹¹. La transferencia se realiza en un sistema Trans-blot Turbo (BioRad) siguiendo un protocolo estándar con un voltaje de 25 V y una intensidad de corriente eléctrica de 1 A durante 30 minutos.

5.4. Inmunodetección.

Una vez terminada la transferencia, las membranas se tiñen con el colorante reversible PonceauS¹² que nos permite comprobar la eficiencia en la transferencia, así como la homogeneidad en la cantidad de proteína cargada en cada muestra. Para ensayos de inmunoblot las membranas se bloquean durante 1 h a temperatura ambiente

⁹ **Tampón de carga:** LDS (4X) (Nu-Page) con DTT 40 mM y azul de bromofenol.

¹⁰ **Tampón de electroforesis:** Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0.1 % (p/v).

¹¹ **Tampón de transferencia:** Tris 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20% (v/v).

¹² **Ponceau S:** Ponceau S 0.5% (p/v), ácido acético 5% (v/v).



en solución de bloqueo¹³ y se incuban con el anticuerpo primario correspondiente empleando las condiciones y diluciones indicadas en la Tabla III.

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	DILUCIÓN	TIEMPO DE INCUBACIÓN
Mouse anti-GAPDH	<i>Santa Cruz</i>	1:3000	4°C 12-16 h
Goat anti-GFP	<i>Cell Signaling</i>	1: 2000	4°C 12-16 h + RT 1 h
Rabbit anti-STIM1	<i>ProSci</i>	1:1000-1:3000	4°C 12-16 h
Mouse anti-STIM1	<i>BD</i>	1:1000	4°C 12-16 h
Mouse anti-IP3R-3	<i>BD</i>	1:1000	4°C 12-16 h
Mouse anti-βTubulinIII	<i>Sigma</i>	1:3000	4°C 12-16 h
Guinea pig anti-Cav1.2	<i>Alomone labs</i>	1:500	4°C 12-16 h
Rabbit anti-HSP60	<i>Cell Signaling</i>	1:1000	4°C 12-16 h
Rabbit anti-PDHα1	<i>Cell Signaling</i>	1:1000	4°C 12-16 h
Rabbit anti-COXIV	<i>Cell Signaling</i>	1:1000	4°C 12-16 h
Rabbit anti-Vinculin	<i>Abcam</i>	1:10000	4°C 12-16 h
Mouse anti-ATPB	<i>Abcam</i>	1:1000	4°C 12-16 h
Rabbit anti-Tom20	<i>Santa Cruz</i>	1:5000	4°C 12-16 h
Mouse anti-OPA1	<i>BD</i>	1:5000	4°C 12-16 h
Sheep anti-MFN2	<i>University of Dundee</i>	0.5 µg/ml	4°C 12-16 h
Rabbit anti-MCU	<i>Cell Signaling</i>	1:500	4°C 12-16 h
Mouse anti-p21	<i>Santa Cruz</i>	0.8 µg/ml	4°C 12-16 h
Mouse anti-βTubulin	<i>Sigma</i>	1:2000	4°C 12-16 h
Mouse anti-Parkin	<i>Santa Cruz</i>	1:1000	4°C 12-16 h
Mouse anti-αTubulin	<i>Merck-Millipore</i>	1:10000	4°C 12-16 h
Mouse anti-RFP	<i>Chromotek</i>	1:1000	4°C 12-16 h

Tabla III. Anticuerpos primarios utilizados en los ensayos de inmunodetección proteica.

Tras 5-6 lavados de 10 minutos en solución TBS-T¹⁴, las membranas se incuban durante 60 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con la enzima HRP (peroxidasa de rábano) en solución de bloqueo y a una dilución 1:10.000. A continuación, las membranas se lavan 5-6 veces (10 minutos cada lavado) en solución TBS-T y se realiza un lavado adicional en solución TBS de 5 minutos. Finalmente, se añade el sustrato quimioluminiscente Clarity o Clarity Max™ Western ECL (BioRad) durante 1-3 minutos a temperatura ambiente. Las bandas inmunoreactivas se revelan en un Chemidoc XRS + imager (BioRad). La cuantificación de las bandas resultantes del revelado de las membranas se lleva a cabo con el programa ImageJ.

¹³ **Solución de bloqueo:** Leche desnatada en polvo 10% (p/v) en TBS-T.

¹⁴ **TBS-T:** Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 75 mM, Tween-20 0.2% (v/v).



6. MORFOLOGÍA Y ACTIVIDAD MITOCONDRIAL.

6.1. Medida del potencial de membrana mitocondrial en neuroblastos SH-SY5Y.

En condiciones basales, las mitocondrias de células no dañadas presentan un potencial de membrana interna (ΔV) de -180 mV. La alteración de dicho potencial es una de las principales características de las fases iniciales de diferentes tipos de muerte celular. Los cambios en el potencial de membrana se deben en gran parte a la apertura desregulada del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (MPTP), que permite el paso libre de iones y pequeñas moléculas, que conduce al desacoplamiento de la cadena respiratoria y la liberación del citocromo c hacia el citosol.

Las sondas que monitorizan el potencial de membrana mitocondrial están cargadas positivamente, acumulándose así en el interior electronegativo de la mitocondria. Entre las sondas que permiten determinar el cambio del potencial de membrana mitocondrial se encuentran JC-1¹⁵, TMRM¹⁶ y rodamina, cuyos mecanismos de acción se describen en los siguientes apartados.

6.1.1. Medida del potencial de membrana mitocondrial con JC-1.

JC-1 es una sonda de emisión dual que se utiliza para medir el potencial de membrana mitocondrial y se caracteriza por un espectro de emisión que va desde el verde (529 nm) al rojo (590 nm). El cambio de fluorescencia rojo/verde depende del potencial de membrana y no se ve alterado por factores como el tamaño, forma o densidad de las mitocondrias. En células sanas con mitocondrias activas esta sonda se observa en forma de agregados fluorescentes rojo-anaranjados (agregados de JC-1), pero tras la despolarización mitocondrial se produce un descenso en el ratio de intensidad fluorescente rojo/verde, observándose la sonda en forma de monómeros de fluorescencia verde difuso (monómeros de JC-1).

Las células se siembran en cubres de vidrio de 18 mm de diámetro tratados con colágeno. Los cubres se lavan 2 veces con PBS y se deja secar hasta el momento de la siembra. En este caso se siembran 2.5×10^5 células/placa de 35 mm de diámetro, en medio suplementado con FBS 10% y a las 48 horas se inicia el experimento. Para la monitorización del potencial de membrana mitocondrial se aspira el medio, se realiza un lavado con medio Leibovitz's L-15 libre de bicarbonato y suplementado con FBS 10% y se incuban las células con JC-1 5 μ M durante 30 minutos a 37°C. Tras esta incubación se coloca la placa de células en un incubador UNO-Okolab acoplado al microscopio de

¹⁵ **JC-1**: 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-imidacarbocyanine iodide.

¹⁶ **TMRM**: tetramethylrhodamine methyl ester.



epifluorescencia. Los filtros empleados son: (1) filtro de excitación 470/40 nm (Chroma), un espejo dicroico de 505 nm y un filtro barrera de 515-555 nm para la monotorización del monómero, y (2) filtro de excitación 470/40 nm (Chroma), un espejo dicroico de 565 nm y un filtro barrera de 590 nm para la monotorización del agregado. Todas las imágenes se obtienen con un microscopio invertido de epifluorescencia a través de un objetivo Plan Achromat 100x (NA 1.45) de inmersión en aceite.

6.1.2. Medida del potencial de membrana mitocondrial con TMRM.

El TMRM es una sonda fluorescente catiónica que se acumula en mitocondrias activas de células sanas en las que el potencial de membrana no se encuentra alterado. Así, en células con mitocondrias funcionales la sonda refleja una señal brillante como resultado de su acumulación, pero esta señal se desvanece a medida que se produce una pérdida de potencial de membrana. La señal de TMRM puede ser detectada por citometría de flujo o epifluorescencia, y ambas técnicas fueron empleadas en este estudio. Estos experimentos se desarrollaron en colaboración con el personal del STAB-SAIUEx.

En el caso del ensayo por citometría de flujo, las células se siembran en placas de 10 cm de diámetro y se dejan crecer en condiciones estándar entre 48 horas y 6 días (según el tipo de condición experimental). El día del experimento, las células se desprenden del sustrato con tripsina y se centrifugan 5 minutos a 200 g. Posteriormente, el precipitado se resuspende en 1 ml de PBS + BSA 1% y se incuban con TMRM 2 nM durante 30 minutos a 37°C con agitación suave. Además, se añade Hoechst 33258 1 µM con el fin de excluir las células muertas del análisis. Tras la incubación, se hacen pasar 20.000 células por muestra a través del citómetro MACSQuant VYB (Miltenyi Biotech). Los datos obtenidos se procesan y analizan con el software Kaluza (Beckman Coulter).

Para el ensayo con microscopía confocal, las células se siembran en las mismas condiciones que en el ensayo anterior pero en este caso sobre cubreobjetos de vidrio de 18 mm en placas de 35 mm de diámetro. El día del experimento se aspira el medio de cultivo, se realiza un lavado con medio Leibovitz's L-15 y se incuban en este mismo medio con TMRM 10 nM y Hoechst 33342 1 µM durante 30 minutos a 37°C. Tras la incubación, se lleva a cabo una adquisición de imágenes durante 10 minutos con intervalos de 2 minutos. Además, como control y para evaluar la especificidad de tinción del TMRM, se adiciona a las células un pulso de FCCP¹⁷ 10 µM que es un agente desacoplante de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Las imágenes son adquiridas por un

¹⁷ **FCCP**: Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone



microscopio confocal FV1000 (Olympus) y para la cuantificación de la fluorescencia se utiliza el software FV10 (Olympus).

6.2. Estudio de la morfología mitocondrial por tinción con rodamina123.

Aunque en un apartado anterior se nombra la rodamina con una posible sonda para la medida del potencial de membrana mitocondrial, es conocido que esta sonda produce un efecto inhibitorio sobre la respiración mitocondrial a ciertas concentraciones, efecto que no se observa con TMRM (Scaduto and Grotyohann, 1999), por lo que en nuestros estudios no usamos rodamina123 como indicador del potencial de membrana. Aún así se trata de una buena sonda para la tinción de mitocondrias celulares y permite la adquisición de imágenes específicas de dichos orgánulos por microscopía de fluorescencia.

El análisis de la morfología de las mitocondrias se lleva a cabo como se describe en (Martin-Romero et al., 2008). Las células se siembran en cubres de vidrio de 18 mm de diámetro a baja confluencia con el fin de que no se formen acúmulos celulares. Su cultivo se realiza en condiciones estándares en un tiempo que dependerá de la condición experimental. En el momento del experimento, se aspira el medio de cultivo, se realiza un lavado con medio Leibovitz's L-15 y se incuban las células en este mismo medio suplementado con rodamina123 5 μ M durante 10 minutos a 37°C (en un incubador sin suministro de CO₂). Tras la incubación, se realiza un lavado con L-15 y se sitúan las células en un incubador UNO-Okolab acoplado al sistema de microscopía. Para la visualización de la sonda se emplea un filtro de excitación de 510-560 nm, un espejo dicróico de 565 nm y un filtro barrera de paso largo de 590 nm. Las imágenes se obtienen a través de un objetivo Plan Achromat 100x (NA 1.45) de inmersión en aceite, y una cámara UNO-Okolab acoplada a un microscopio invertido Nikon Ti-E (Nikon Instruments Europe B.V.). Se adquieren imágenes en secciones del eje Z de 0.2 μ m, para su posterior deconvolución y proyección total.

6.3. Medida de la actividad del complejo I mitocondrial.

La NADH ubiquinona oxidoreductasa (o complejo I) es un complejo multienzimático que constituye el primer paso en la cadena respiratoria mitocondrial. En este estudio, la medida de actividad de la cadena de transporte de electrones en el complejo I mitocondrial se lleva a cabo a 37°C según se describe en (Lagoa et al., 2011). Así, se siembran 140.000 células en placas de 60 mm de diámetro en las condiciones experimentales adecuadas (en este caso son 6 días de cultivo con tratamiento de ácido retinoico 10 μ M,



pues se trabaja con células diferenciadas), buscando tener una confluencia del 60-70% el día del ensayo.

El día del experimento las células se lisan y se cuantifica la concentración de proteína en los lisados. En los ensayos se emplea una concentración de lisado en el intervalo 85-130 $\mu\text{g/ml}$ y como tampón se utiliza Tris-HCl 10 mM (pH 7.4), KCl 50 mM, EDTA 1 mM y KCN 2 mM. Se utiliza la quinona CoQ1 (50 μM) como aceptor de electrones y la reacción se inicia añadiendo NADH 75 μM , monitorizando la absorbancia a 340 nm durante 2-3 minutos. A continuación, se añade el lisado y se registra esta absorbancia durante 10 minutos. Finalmente, se añaden 10 μg de rotenona y se recoge el registro de absorbancia a 340 nm durante 10 minutos adicionales. El cálculo de la actividad de la cadena de transporte de electrones del complejo I se estima por la diferencia de la pendiente de la gráfica de absorción vs. tiempo antes y después de la adición de rotenona y se expresa en nmol/min/mg de proteína de lisado celular, empleando un coeficiente de extinción molar para NADH de $6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

6.4. Evaluación de mitofagia en neuroblastos SH-SY5Y.

La mitofagia es el proceso por el cual las mitocondrias dañadas o no funcionales son recicladas en autofagosomas para su posterior degradación lisosomal. Este mecanismo es fundamental para que las células mantengan siempre una reserva de mitocondrias activas, ya que el daño mitocondrial está asociado a multitud de patologías. Por ello, es importante disponer de herramientas que nos permitan conocer el estado de las vías mitofágicas, como las líneas celulares que expresan la construcción *mito-QC* usadas en este estudio.

6.4.1. Generación de líneas mito-QC SH-SY5Y.

La construcción *mito-QC* se basa en el tándem de proteínas mCherry-GFP-FIS1 (Figura 60) formado por las proteínas fluorescentes mCherry y GFP y un fragmento de la proteína FIS1 situada en la membrana externa mitocondrial (Allen et al., 2013). Con esta construcción las mitocondrias activas se visualizan con una doble emisión de fluorescencia rojo-verde, como resultado de la mezcla de ambos fluoróforos, pero si la mitocondria entra en la vía mitofágica y pasa a un ambiente ácido (como el interior lisosomal, con pH = 4) la fluorescencia verde del GFP se extingue y sólo se observa la emisión roja de mCherry.

En este trabajo se han generado líneas celulares SH-SY5Y que expresan de forma estable la construcción mCherry-GFP-FIS1 y que nos permiten realizar ensayos de



mitofagia tanto en células fijadas como en célula viva. La generación de estas líneas se lleva a cabo por un doble ciclo de infección retroviral como se explica en el apartado 3.4.2 y la expresión de dicha construcción se corrobora mediante inmunodetección y observación por microscopía de fluorescencia.

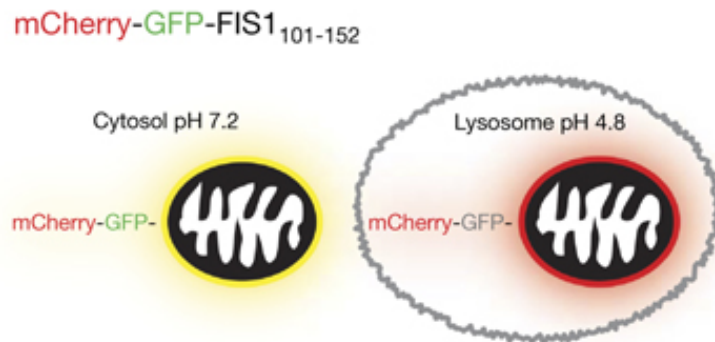


Figura 60. Construcción *mito-QC* en condiciones basales y mitofágicas. La proteína recombinante *mito-QC* se compone de los fluoróforos mCherry (rojo), GFP (verde) y una región peptídica de la proteína mitocondrial FIS1, que permite visualizar las mitocondrias por microscopía de fluorescencia. Cuando las mitocondrias se encuentran activas en el citosol (pH = 7.0-7.1) se observan de color amarillo (combinación de ambos fluoróforos), pero cuando las mitocondrias son embebidas por lisosomas (pH = 4.8), la fluorescencia verde del GFP se extingue y las fracciones mitocondriales (o mitolisosomas) se observan como puntos rojos (Allen et al., 2013).

6.4.2. Adquisición y análisis de imágenes: cuantificación de mitolisosomas.

Las células se siembran en cubres de vidrio de 18 mm de diámetro buscando tener una confluencia no superior al 50-60% el día del experimento. El tiempo y condiciones de cultivo va desde las 48 horas en condiciones estándar para neuroblastos indiferenciados hasta 6 días *in vitro* para células diferenciadas.

El día del experimento, se aspira el medio de cultivo de las células, se realiza un lavado con el medio libre de bicarbonato Leibovitz's L-15 suplementado con FBS 10% y finalmente se incuban las células en medio L-15 fresco + FBS 10% en un incubador UNO-Okolab acoplado al microscopio de epifluorescencia. Para los registros de fluorescencia se utilizan filtros de excitación a 480/30 nm, y de emisión 535/40 nm con un espejo dicroico de 505 nm para GFP, y filtros de excitación a 562/40 nm, de emisión a 641/175 nm con un espejo dicroico a 593 nm para mCherry (Semrock). El tiempo de adquisición de imágenes es de 500 ms por captura, con un intervalo de tiempo de 20 segundos, durante 5-10 minutos. Se utiliza un objetivo Plan Achromat 100x (NA 1.45) de inmersión en



aceite y se adquieren imágenes en secciones del eje Z de 0.2 μm , para su posterior deconvolución y proyección total máxima, seleccionando las capas que nos ofrezcan mayor nitidez para el posterior análisis.

El análisis del nivel de mitofagia que presentan las células de nuestro estudio se lleva a cabo mediante la cuantificación del número de mitolisosomas, que son fragmentos mitocondriales embebidos por lisosomas y que sólo se visualizan en rojo. La cuantificación del número de mitolisosomas se lleva a cabo con el software ImageJ, usando el plugin MitoQC Counter desarrollado por Lambert Montava-Garriga y Greame Ball (Universidad de Dundee). A partir de las imágenes adquiridas en el microscopio, se realiza una división en 2 canales (verde/rojo) y se genera una composición de ambos canales en las que resaltan los puntos rojos que representan los mitolisosomas. Tras ajustar los umbrales de intensidad y radio de los mitolisosomas, se lleva a cabo la cuantificación normalizada de los mitolisosomas; analizándose al menos 40 células por cada condición experimental.

7. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR.

El ciclo celular eucariótico discurre por varias etapas diferenciadas (Figura 61), en las cuáles las células de diferentes tejidos pasan periodos más o menos extensos de su tiempo vital en estado de reposo mitótico, es decir, con su capacidad de división celular inhibida. A esta fase de latencia se le denomina G0. Una vez que la célula inicia un proceso de división celular, debe primero aumentar de tamaño y sintetizar todas aquellas moléculas y enzimas que serán necesarias para la síntesis de DNA, una etapa de preparación que se denomina G1. Durante la fase S se replica el DNA celular en un proceso exhaustivamente controlado, ya que de su fidelidad depende en gran medida que las células resultantes del proceso reciban una cantidad equitativa y fiel del material genético. Tras la fase S, la célula entra en una nueva etapa de preparación a la mitosis denominada G2. Los cromosomas replicados se segregan a cada una de las células hijas durante la etapa de mitosis o fase M. Para completar este proceso la célula debe superar dos puntos de control que se establecen en las transiciones G1/S y G2/M (Stryer, 1995). La Figura 61 ilustra un esquema del ciclo celular eucariótico.

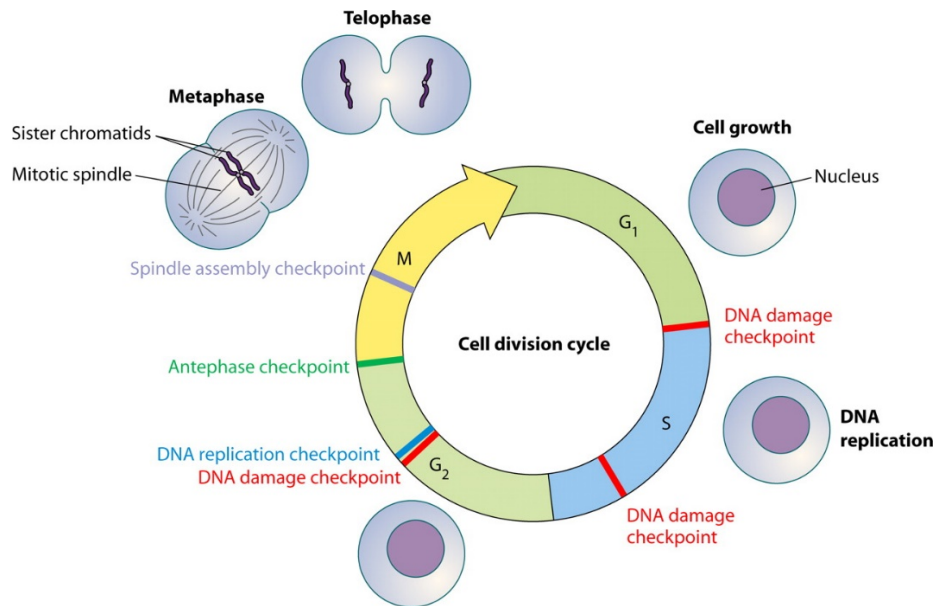


Figura 61. Ciclo celular eucariótico. En respuesta a factores tanto intracelulares como extracelulares, las células proliferativas pueden iniciar un proceso de división celular. En las etapas iniciales (G₁) se sintetizan todos los precursores y moléculas necesarias para el ciclo, y en especial las implicadas en síntesis de DNA (fase S). Antes de entrar en fase S, la célula debe superar un punto de control de la transición G₁/S. Una vez duplicado el DNA, la célula entra en la fase G₂, en la que se lleva a cabo la síntesis de macromoléculas necesarias para la división mitótica. Antes de iniciarse la mitosis (M), se deben superar otros puntos de control de la transición G₂/M. Al final del proceso se obtienen dos nuevas células diploides que permanecerán fuera del ciclo de división celular por un periodo de tiempo que dependerá, entre otros factores, del tipo celular y de las condiciones de crecimiento. Imagen de (Chin and Yeong, 2010).

En este trabajo se empleó citometría de flujo para cuantificar la proporción de células en cada fase del ciclo celular, así como la cantidad de células apoptóticas. Las células se siembran a baja confluencia en medio de cultivo con FBS 10% y transcurridas 48 horas desde su siembra (período que supera la duración de un ciclo celular completo en células SH-SY5Y), se recupera el medio de cultivo de las placas y se reserva en un tubo estéril. Se realiza un lavado con PBS y se recupera dicho PBS en un tubo estéril para añadir las células en suspensión al pool de células total recogidas. Por otro lado, se disocian las células de las placas de cultivo por adición de tripsina y se recuperan con su propio medio de cultivo. A continuación, se centrifugan las células durante 5 min a 2000 g, se resuspende el precipitado en PBS, se repite la centrifugación anterior y se fijan las células a 4°C en una solución de etanol al 70% (v/v). Antes de su análisis las células se resuspenden en PBS con 1 µg/ml de RNasa y 50 µg/ml de yoduro de propidio para su tinción, durante 2 horas en oscuridad y con agitación suave. El contenido total de DNA



por célula se determina empleando un citómetro de flujo MACSQuant VYB (Miltenyi Biotech) adquiriendo no menos de 20.000 células por muestra. Esta última parte del proceso se llevó a cabo por el personal del STAB-SAIUEx.

8. ANALISIS DE ADHESIÓN CELULAR.

8.1. Adhesión celular de neuroblastos SH-SY5Y en matrices extracelulares.

Para este ensayo se pretratan placas de 35 mm de diámetro con colágeno o fibronectina a distintas concentraciones con el fin de generar matrices que favorezcan la adhesión celular. En el caso de la matriz de colágeno, se usaron concentraciones de 1.5, 15 y 150 $\mu\text{g/ml}$; mientras que para generar la matriz de fibronectina las concentraciones fueron 0.1, 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$. En ambos casos, las placas con colágeno o fibronectina se incuban a 37°C durante un mínimo de 1 hora. Transcurrido este tiempo, se aspira la solución de las placas, se realizan 2 lavados con PBS y se dejan secar hasta el momento de la siembra.

Se siembran en paralelo las distintas líneas celulares objeto del ensayo, a una densidad de 4×10^5 células/placa en medio suplementado con FBS 10% e incuban durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, se captan imágenes de las células de las distintas placas hasta tener unas 10 imágenes de cada una de las condiciones del experimento. Las imágenes se adquieren con una cámara acoplada al microscopio invertido Nikon Ti-E empleando un objetivo 20x y posteriormente se analiza el número de células adheridas en cada imagen mediante el software NIS-Elements AR.

8.2. Cinética temporal de adhesión celular en neuroblastos SH-SY5Y.

Para el análisis de la cinética de adhesión celular, se tratan placas de 35 mm de diámetro con una solución de 15 $\mu\text{g/ml}$ de colágeno y se incuban a 37°C un mínimo de 1 hora. Tras este tiempo, se aspira la solución de colágeno, se realizan 2 lavados con PBS y se dejan secar hasta el momento de la siembra. En este caso se siembran 1.5×10^5 células/placa y tras la siembra las placas se colocan en un incubador de UNO-Okolab acoplado al sistema de microscopía para monitorizar la morfología celular durante varias horas, con un objetivo de contraste de fases 40x con sistema de enfoque perfecto del microscopio Nikon Ti-E. El software de NIS-Elements se programa para que se capten imágenes cada 3 minutos y tras la finalización del ensayo se evalúa la periferia y el área celular de las células de ambas líneas en intervalos de 15 minutos que abarcan desde el tiempo inicial (0 minutos) hasta los 120 minutos.



9. ANÁLISIS DE LA SENESCENCIA CELULAR.

No se conoce un marcador común y característico de células senescentes, pero se ha observado en fibroblastos senescentes una mayor expresión de la enzima β -galactosidasa (Dimri et al., 1995). De este modo conociendo los niveles de esta enzima se puede determinar el estado juvenil/senescente de las células y para determinar el nivel de actividad β -galactosidasa se utilizan sustratos de la misma como el C12FDG (5-dodecanoylamino fluorescein di- β -D-galactopyranoside) como se ha descrito previamente (Kurz et al., 2000).

Para este ensayo se siembran células en placas de 10 cm de diámetro con el fin de tener una confluencia del 60-70% el día del ensayo. Para realizar el experimento se aspira el medio de las placas, se realiza un lavado con PBS, se disgregan las células por adición de tripsina y se centrifugan 5 minutos a 250 g. A continuación, se resuspende el precipitado celular en PBS con C12FDG 1 μ M y las células se incuban durante 30 minutos a 37°C en oscuridad y con agitación suave. Tras la incubación, se realiza un lavado con PBS y se resuspenden las células en PBS con Hoechst 33258 1 μ M, para su posterior análisis por el citómetro de flujo MACSQuant VYB (Miltenyi Biotech), adquiriendo no menos de 20.000 células por condición experimental.

10. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO LIBRE CITOSÓLICO.

La medida de la concentración de Ca^{2+} libre en el citosol [Ca^{2+}], se determina mediante el método descrito en (Pozo-Guisado et al., 2010) empleando fura-2 como fluoróforo sensible a Ca^{2+} . Fura-2 presenta un espectro de excitación con dos máximos situados a 340 y 380 nm (Figura 62). 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 isobéptico que se utiliza para determinar la fluorescencia independiente de Ca^{2+} o para determinar la extinción de fluorescencia. El espectro de emisión de este indicador presenta un único máximo situado a 510 nm. La constante de disociación (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 μ M (Thomas and Delaville, 1991).

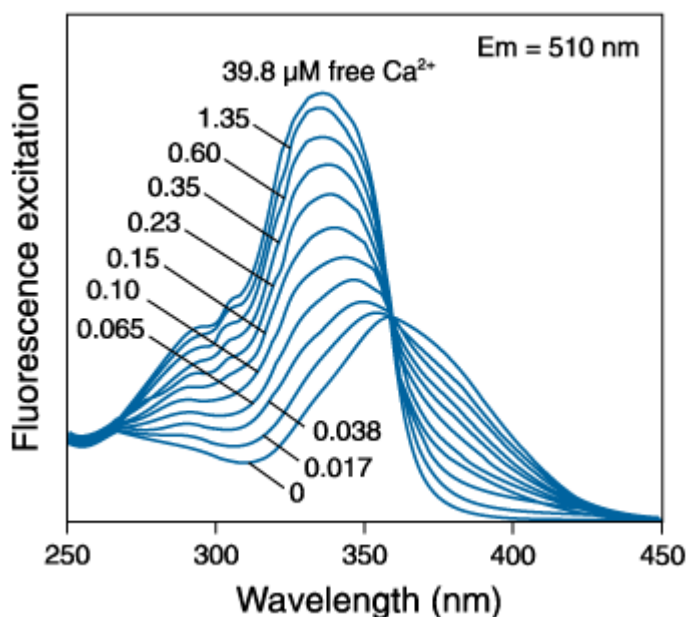


Figura 62. Espectro de excitación de fura-2. La gráfica representa el espectro de excitación de la sonda fluorescente fura-2 en solución con concentraciones de Ca^{2+} saturantes ($38.9 \mu\text{M}$), y concentraciones que se encuentran incluidas en el rango de intervalo de detección de fura-2: $0,017\text{-}1.35 \mu\text{M}$, para una longitud de onda de emisión de 510 nm .

Debido a que el fura-2 es un anión policarboxilato, no atraviesa bicapas lipídicas, por lo que la forma más conveniente de cargar este indicador en la célula es mediante la dispersión del acetoximetiléter (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 de 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+} . Una problemática asociada a los acetilmetiléteres 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.

10.1. Carga con fura-2AM en células SH-SY5Y.

Para realizar la medida de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con fura-2AM se procede en primer lugar a la carga del mismo en la célula. Para ello, las células se incuban con fura-2AM $1 \mu\text{M}$ y Pluronic F-127 0.025% en medio de cultivo, durante $45 \text{ min} - 1 \text{ h}$ a 37°C . Transcurrido este tiempo las células se lavan con HBSS y se lleva a cabo el registro de los valores de fluorescencia.



10.2. Medida de los valores de fluorescencia.

Para determinar la fluorescencia de la sonda en el interior de las células se utiliza un microscopio invertido Nikon Ti-E. El registro de emisión de fluorescencia consta de tres registros simultáneos: (1) el registro de la emisión de fluorescencia utilizando una excitación a 340 (F_{340}), (2) registro utilizando una excitación a 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 se realizan a 35-36°C (controlador de temperatura DH-40i de Warner Instruments, Inc.). Las imágenes se obtienen utilizando los filtros de excitación 340/26 y 387/11 nm, un espejo dicróico de 510 nm y un filtro barrera de 520 nm (Semrock). Las imágenes son capturadas con una cámara CCD Hamamatsu C9100-02 acoplada al microscopio de fluorescencia invertido y analizadas con el software NIS-Elements AR.

10.3. 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:

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

En esta ecuación, R es el ratio de la fluorescencia (F_{340}/F_{380}), R_{max} y R_{min} son los valores de R bajo condiciones saturantes o libres de Ca^{2+} , respectivamente, y β es el cociente de los valores de emisión de fluorescencia con una excitación a 380 nm y registrados en condiciones de Ca^{2+} libre o saturantes.

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

Para inducir la apertura de los canales de Ca^{2+} operados por depósitos intracelulares (canales SOC) se utiliza taspigargina (Tg), un inhibidor específico e irreversible de la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarco(endo)plasmático (SERCA) (Lytton et al., 1991, Thastrup et al., 1990). El vaciado de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} se lleva a cabo incubando las células con Tg 1 μ M en tampón HBSS libre de Ca^{2+} con la siguiente composición: NaCl 138 mM; KCl 5.3 mM; Na_2HPO_4 0.34 mM; KH_2PO_4 0.44 mM; $NaHCO_3$ 4.17 mM; Mg^{2+} 4 mM (pH = 7.4). La activación de canales SOC se confirma con el incremento del ratio F_{340}/F_{380} tras la adición de $CaCl_2$ 2 mM al medio extracelular en presencia de Tg.



10.5. Ensayos de despolarización por KCl en neuroblastos SH-SY5Y.

Las células de neuroblastoma SH-SY5Y son excitables y poseen canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje en la membrana plasmática. Esto nos permite utilizar estímulos como la despolarización de la membrana para evaluar el nivel de entrada de Ca^{2+} . En este ensayo, las células se despolarizan con pulsos de KCl 90 mM en presencia de inhibidores de los distintos tipos de canales Ca^{2+} operados por voltaje para evaluar qué papel desempeña cada uno de ellos en la entrada de Ca^{2+} .

Las células se siembran en medio DMEM con FBS 10% en placas de 35 mm de diámetro con cubres de vidrio de 18 mm de diámetro y se mantienen en las condiciones estándar de cultivo. Transcurridas 48 horas desde la siembra, las células se cargan con fura-2AM. Tras la incubación, se aspira el medio y las células se lavan con HBSS. Para inducir la despolarización a las células se les adiciona KCl 90 mM en HBSS con CaCl_2 5 mM durante 1 minuto y tras este tiempo las células se retornan a la solución basal de HBSS (CaCl_2 1.26 mM y KCl 5.33 mM). Además, cuando se requiere se añaden inhibidores de los distintos canales de Ca^{2+} operados por voltaje: nifedipina (específico para canales tipo L), ω -conotoxina MVIIC (para canales de tipo Q, P y N) y ML218 (altamente específico para canales tipo T).

11. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO LIBRE MITOCONDRIAL.

La medida de la concentración de calcio libre mitocondrial se lleva a cabo como se describe en (Palmer and Tsien, 2006), empleando un sensor de Ca^{2+} codificado genéticamente que tiene su origen en los sensores de tipo “cameleon” (Figura 63). Estos indicadores se componen de 2 proteínas fluorescentes y 2 proteínas sensibles a Ca^{2+} (una variante de la calmodulina (CaM) y un péptido de unión a CaM), y basan su medida en la transferencia de energía entre fluorocromos o FRET. Este tipo de sensores nos permiten medir la dinámica de Ca^{2+} en determinados orgánulos de la célula como la mitocondria, ofreciendo una especificidad carente en pequeñas moléculas sensores de Ca^{2+} como el fura-2.

En el caso de la mitocondria en este estudio se utilizó el sensor 4mtD3cpv, formado por fluorocromo CFP, que actúa de donador, y el aceptor cp-Venus (una variante del fluorocromo YFP) que será el aceptor. Este indicador presenta una K_d para Ca^{2+} de 0.76 mM (Palmer and Tsien, 2006) y es bastante específico al no unir calmodulina wild-type, lo que incrementa la sensibilidad de la medida.

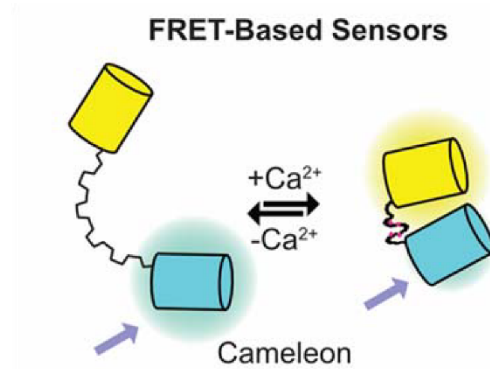


Figura 63. Modo de acción del sensor de Ca^{2+} cameleon. El sensor fluorescente de Ca^{2+} genéticamente codificado “cameleon” basa su estructura en los fluoróforos CFP e YFP que aparecen unidos por una región peptídica que actúa de sensor de Ca^{2+} . Tras la unión de iones Ca^{2+} , ambos fluoróforos cambian su orientación y se aproximan permitiendo la emisión de fluorescencia por transferencia de energía. Imagen adaptada de (Broyles et al., 2018).

11.1. Transfección de 4mtD3-cpv y medida de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$ en neuroblastos.

Para medir la concentración de calcio libre mitocondrial ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$) se lleva a cabo una transfección transitoria de un plásmido que lleva clonado la construcción 4mtD3-cpv (Addgene plasmid #42335). Así las células se siembran en medio de cultivo con FBS 10% y una confluencia del 50-60% y 5-6 horas tras la siembra se transfectan con 1.5 μg del plásmido para cada placa de 10 cm de diámetro. Tras 24 horas, las células se tripsinizan y se siembran en placas de 35 mm de diámetro con cubres de vidrio de 18 mm de diámetro y 24 horas después (48 horas desde el momento de la transfección) se lleva a cabo el experimento en HBSS con CaCl_2 1.26 mM.

11.2. Medida de los valores de fluorescencia y calibración de la medida.

Para determinar la fluorescencia de esta sonda se utiliza un microscopio invertido Nikon Ti-E. Para esta medida se deben captar al menos 2 imágenes en cada tiempo: una imagen directa de CFP (excitación y emisión de CFP) y una imagen FRET (excitación de CFP y emisión de YFP). Para obtener las imágenes se utiliza un set dual de filtros CFP/YFP 2x2 M-B (Semrock) y todas las medidas se realizan a 35-36°C (controlador de temperatura DH-40i de Warner Instruments, Inc.). Las imágenes son capturadas con una cámara CCD Hamamatsu C9100-02 acoplada al microscopio de fluorescencia invertido y analizadas con el software NIS-Elements AR.



El análisis e interpretación de los valores de fluorescencia se lleva a cabo como en (Palmer and Tsien, 2006), dónde la concentración de calcio libre mitocondrial ($[Ca^{2+}]_{mito}$) se determina a partir de la siguiente ecuación:

$$[Ca^{2+}]_{mito} = \{K_d^n \times (R - R_{min}) / (R_{max} - R)\}^{1/n}$$

En esta ecuación el valor R representa el ratio FRET/CFP que existe entre las células transfectadas con el sensor y el fondo de la imagen (background) sobre la que se está midiendo la fluorescencia:

$$\text{Ratio} = (FRET_{intensity} - FRET_{background}) / (CFP_{intensity} - CFP_{background})$$

Por otro lado, la constante de disociación para calcio (K_d) para esta sonda toma un valor de 0.76 mM, n un valor de 0.74, el R_{min} se calcula gracias a la adición de ionomicina 5 μ M + EGTA 5 mM, mientras que el R_{max} se calcula mediante la adición de ionomicina 5 μ M + $CaCl_2$ 10 mM.

12. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.

El análisis de la expresión génica nos permite conocer en qué proporción se expresan diferentes transcritos y los posibles cambios o alteraciones que pueden sufrir tras determinados eventos celulares con el fin de buscar una mejor adaptabilidad a la supervivencia. En los estudios de expresión génica se cuantifican niveles de RNA mensajero (mRNA), responsable de la expresión de proteínas. No obstante, los niveles de expresión de mRNA de los distintos genes no siempre coinciden con los niveles finales de expresión proteica, ya que las células utilizan otros mecanismos para regular la expresión proteica.

12.1. Extracción y purificación de RNA.

En este estudio la extracción de RNA de las muestras de interés se llevó a cabo con el kit comercial Quick-RNA™ Miniprep (Zymo Research™). Dicha extracción se realiza siempre en campana de flujo laminar para mantener la esterilidad. Las células se siembran en placas de 10 cm de diámetro buscando no tener una confluencia superior al 70% en el momento del experimento. Transcurrido el tiempo de cultivo, las células se lavan con PBS 2 veces y se lisan con el tampón específico que determina el kit comercial. Tras seguir los diferentes pasos que marca el protocolo del kit, las muestras de RNA se eluyen y se conservan a -80°C hasta el momento de su análisis. La extracción de RNA de



las distintas condiciones experimentales se realiza en paralelo y por triplicado para todas ellas.

12.2. Análisis por qPCR.

En este estudio se ha utilizado la PCR cuantitativa a tiempo real para el análisis de los niveles de mRNA. Para ello se realiza una retrotranscripción utilizando el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific) en un termociclador Applied Biosystems™ Veriti™ 96-Well (Thermo Fisher Scientific). Posteriormente se realiza la reacción de PCR cuantitativa con el sistema QuantStudio 6-Flex (Thermo Fisher Scientific), utilizando para ello el kit comercial Power Mix™ SYBR® Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific), el cual contiene la DNA-polimerasa patentada Dual-Lock™ Taq. Los primers forward y reverse se emplean a una concentración de 400 nM, utilizándose 10 ng de cDNA por reacción. La monitorización de la amplificación se llevó a cabo con SYBR-Green, presentando el complejo DNA/SYBR-Green un máximo de absorción a 498 nm y de emisión a 522 nm. Los primers empleados en este estudio se detallan en la Tabla IV.

Gen	Primers (5´ - 3´)
<i>RPL32</i>	Forward: CATCTCCTTCTCGGCATCA Reverse: CTGGGTTTCCGCCAGTTAC
<i>ITPR1</i>	Forward: CTGCCACCAGTTCAAAGCC Reverse: CCACCTCTGCTGCCAAGTAA
<i>ITPR2</i>	Forward: GCAGGGAAGAAGAGGGACG Reverse: ACCCAAGGTGCTGATGAAG
<i>ITPR3</i>	Forward: TATGCAGTTTCGGGACCACC Reverse: TGCCCTTGTACTCGTCACAC

Tabla IV. Primers forward y reverse utilizados en los ensayos de qPCR.

El gen *RPL32* (Ribosomal protein L32) se ha utilizado como control (housekeeping) para los diferentes ensayos de qPCR SYBR-Green. Todos los primers se obtuvieron a través de la casa comercial Invitrogen.

Por otro lado, en este trabajo también se han analizado niveles de mRNA de los genes *CACNA1C* (gen de interés) y *GAPDH*, *HPRT1* y *GUSB* (genes de referencia) utilizando sondas TaqMan® que forman parte del “TaqMan Array Human Intracellular Calcium Signaling 96-Well Fast Plate” (Applied Biosystems 4418932). Esta placa presenta en cada uno de sus pocillos los primers/oligos (ligados a una sonda fluorescente)



correspondientes a un gen de interés, que en nuestro ensayo corresponden a *CACNA1C* (Hs00167681_m1), *GAPDH* (Hs99999905_m1), *HPRT1* (Hs99999909_m1), *GUSB* (Hs99999908_m1). Tras llevar a cabo la retrotranscripción a partir del RNA purificado (mismas condiciones que las descritas para qPCR SYBR-Green), se utilizan 10 ng de cDNA por pocillo en un volumen final de 10 μ l (mezcla de cDNA y la Master Mix de TaqMan™ Gene Expression de Thermo Fisher Scientific #4369016). Finalmente, se lleva a cabo la reacción de PCR cuantitativa con el sistema QuantStudio 6-Flex (Thermo Fisher Scientific) a partir del protocolo indicado por la casa comercial. El análisis de las cantidades relativas de mRNA para cada gen se llevó a cabo con el software “Relative Quantification app” (thermofisher.com/cloud). En todos los casos este análisis se realizó con triplicado técnico, con un triplicado biológico para cada condición experimental.

A grayscale micrograph of plant tissue. The image shows several large, roughly rectangular cells with very thick, dark cell walls, characteristic of sclerenchyma or collenchyma tissue. These cells are interconnected by a network of thinner, more delicate cell walls. In the center and towards the right, there are clusters of smaller, more rounded cells with less distinct walls, possibly representing parenchyma or vascular tissue. The overall structure is highly organized and shows clear cellular boundaries.

Bibliografía

- Alicia, S., Angelica, Z., Carlos, S., Alfonso, S. and Luis, V. (2008) 'STIM1 converts TRPC1 from a receptor-operated to a store-operated channel: Moving TRPC1 in and out of lipid rafts', *Cell Calcium*, 44(5), pp. 479-491.
- Alikhani, N., Guo, L., Yan, S., Du, H., Pinho, C. M., Chen, J. X., Glaser, E. and Yan, S. S. (2011) 'Decreased proteolytic activity of the mitochondrial amyloid- β degrading enzyme, PreP peptidase, in Alzheimer's disease brain mitochondria', *J Alzheimers Dis*, 27(1), pp. 75-87.
- Allen, G. F., Toth, R., James, J. and Ganley, I. G. (2013) 'Loss of iron triggers PINK1/Parkin-independent mitophagy', *EMBO Rep*, 14(12), pp. 1127-35.
- Alzheimer, A., Stelzmann, R. A., Schnitzlein, H. N. and Murtagh, F. R. (1995) 'An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde"', *Clin Anat*, 8(6), pp. 429-31.
- Anekonda, T. S. and Quinn, J. F. (2011) 'Calcium channel blocking as a therapeutic strategy for Alzheimer's disease: the case for isradipine', *Biochim Biophys Acta*, 1812(12), pp. 1584-90.
- Anekonda, T. S., Quinn, J. F., Harris, C., Fraher, K., Wadsworth, T. L. and Woltjer, R. L. (2011) 'L-type voltage-gated calcium channel blockade with isradipine as a therapeutic strategy for Alzheimer's disease', *Neurobiol Dis*, 41(1), pp. 62-70.
- Antkiewicz-Michaluk, L. (1999) 'Voltage-operated calcium channels: characteristics and their role in the mechanism of action of psychotropic drugs', *Pol J Pharmacol*, 51(2), pp. 179-86.
- Baughman, J. M., Perocchi, F., Girgis, H. S., Plovanich, M., Belcher-Timme, C. A., Sancak, Y., Bao, X. R., Strittmatter, L., Goldberger, O., Bogorad, R. L., Kotliansky, V. and Mootha, V. K. (2011) 'Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter', *Nature*, 476(7360), pp. 341-5.
- Ben-Kasus Nissim, T., Zhang, X., Elazar, A., Roy, S., Stolwijk, J. A., Zhou, Y., Motiani, R. K., Gueguinou, M., Hempel, N., Hershinkel, M., Gill, D. L., Trebak, M. and Sekler, I. (2017) 'Mitochondria control store-operated Ca', *EMBO J*, 36(6), pp. 797-815.
- Berridge, M. J. (1993) 'Inositol trisphosphate and calcium signalling', *Nature*, 361(6410), pp. 315-25.
- Berridge, M. J. (1995) 'Capacitative calcium entry', *Biochem J*, 312 (Pt 1), pp. 1-11.
- Berridge, M. J. (1998) 'Neuronal calcium signaling', *Neuron*, 21(1), pp. 13-26.
- Berridge, M. J. (2005) 'Unlocking the secrets of cell signaling', *Annu Rev Physiol*, 67, pp. 1-21.
- Berridge, M. J. (2007) 'Inositol trisphosphate and calcium oscillations', *Biochem Soc Symp*, (74), pp. 1-7.
- Berridge, M. J. (2010) 'Calcium hypothesis of Alzheimer's disease', *Pflugers Arch*, 459(3), pp. 441-9.
- Berridge, M. J. (2011) 'Calcium signalling and Alzheimer's disease', *Neurochem Res*, 36(7), pp. 1149-56.
- Berridge, M. J. (2014) 'Ion Channels', in Limited, P.P. (ed.) *Cell Signalling Biology*. Online.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D. and Roderick, H. L. (2003) 'Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(7), pp. 517-29.
- Berridge, M. J., Lipp, P. and Bootman, M. D. (2000) 'The versatility and universality of calcium signalling', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1(1), pp. 11-21.
- Bers, D. M. (2002) 'Cardiac excitation-contraction coupling', *Nature*, 415(6868), pp. 198-205.
- Bezprozvanny, I. and Mattson, M. P. (2008) 'Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease', *Trends Neurosci*, 31(9), pp. 454-63.
- Birkenhäger, W. H., Forette, F., Seux, M. L., Wang, J. G. and Staessen, J. A. (2001) 'Blood pressure, cognitive functions, and prevention of dementias in older patients with hypertension', *Arch Intern Med*, 161(2), pp. 152-6.
- Blaustein, M. P. (1982) 'Relative roles of sodium/calcium exchange and ATP-fueled calcium transport in the control of cell calcium', *Ann N Y Acad Sci*, 402, pp. 457-8.
- Blaustein, M. P. and Lederer, W. J. (1999) 'Sodium/calcium exchange: its physiological implications', *Physiol Rev*, 79(3), pp. 763-854.
- Bobba, A., Amadoro, G., Valenti, D., Corsetti, V., Lassandro, R. and Atlante, A. (2013) 'Mitochondrial respiratory chain Complexes I and IV are impaired by β -amyloid via direct interaction and through Complex I-dependent ROS production, respectively', *Mitochondrion*, 13(4), pp. 298-311.
- Boitano, S., Dirksen, E. R. and Sanderson, M. J. (1992) 'Intercellular propagation of calcium waves mediated by inositol trisphosphate', *Science*, 258(5080), pp. 292-5.
- Bojarski, L., Pomorski, P., Szybinska, A., Drab, M., Skibinska-Kijek, A., Gruszczynska-Biegala, J. and Kuznicki, J.



- (2009) 'Presenilin-dependent expression of STIM proteins and dysregulation of capacitative Ca²⁺ entry in familial Alzheimer's disease', *Biochim Biophys Acta*, 1793(6), pp. 1050-7.
- Bootman, M. D., Collins, T. J., Peppiatt, C. M., Prothero, L. S., MacKenzie, L., De Smet, P., Travers, M., Tovey, S. C., Seo, J. T., Berridge, M. J., Ciccolini, F. and Lipp, P. (2001) 'Calcium signalling--an overview', *Semin Cell Dev Biol*, 12(1), pp. 3-10.
- Brandman, O., Liou, J., Park, W. S. and Meyer, T. (2007) 'STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ levels', *Cell*, 131(7), pp. 1327-39.
- Broad, L. M., Cannon, T. R. and Taylor, C. W. (1999) 'A non-capacitative pathway activated by arachidonic acid is the major Ca(2+) entry mechanism in rat A7r5 smooth muscle cells stimulated with low concentrations of vasopressin', *J Physiol*, 517 (Pt 1), pp. 121-34.
- Broyles, C. N., Robinson, P. and Daniels, M. J. (2018) 'Fluorescent, Bioluminescent, and Optogenetic Approaches to Study Excitable Physiology in the Single Cardiomyocyte', *Cells*, 7(6).
- Budd, S. L. and Nicholls, D. G. (1996) 'A reevaluation of the role of mitochondria in neuronal Ca²⁺ homeostasis', *J Neurochem*, 66(1), pp. 403-11.
- Busche, M. A. and Konnerth, A. (2016) 'Impairments of neural circuit function in Alzheimer's disease', *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 371(1700).
- Calvo-Rodríguez, M., García-Durillo, M., Villalobos, C. and Núñez, L. (2016) 'In vitro aging promotes endoplasmic reticulum (ER)-mitochondria Ca', *Biochim Biophys Acta*, 1863(11), pp. 2637-2649.
- Catterall, W. A. (1991) 'Excitation-contraction coupling in vertebrate skeletal muscle: a tale of two calcium channels', *Cell*, 64(5), pp. 871-4.
- Catterall, W. A. (1998) 'Structure and function of neuronal Ca²⁺ channels and their role in neurotransmitter release', *Cell Calcium*, 24(5-6), pp. 307-23.
- Catterall, W. A. and Few, A. P. (2008) 'Calcium channel regulation and presynaptic plasticity', *Neuron*, 59(6), pp. 882-901.
- Cavero, I. and Spedding, M. (1983) "'Calcium antagonists": a class of drugs with a bright future. Part I. Cellular calcium homeostasis and calcium as a coupling messenger', *Life Sci*, 33(26), pp. 2571-81.
- Cha, M. Y., Han, S. H., Son, S. M., Hong, H. S., Choi, Y. J., Byun, J. and Mook-Jung, I. (2012) 'Mitochondria-specific accumulation of amyloid β induces mitochondrial dysfunction leading to apoptotic cell death', *PLoS One*, 7(4), pp. e34929.
- Chang, C. L., Chen, Y. J., Quintanilla, C. G., Hsieh, T. S. and Liou, J. (2018) 'EB1 binding restricts STIM1 translocation to ER-PM junctions and regulates store-operated Ca', *J Cell Biol*, 217(6), pp. 2047-2058.
- Chen, Y. J., Chang, C. L., Lee, W. R. and Liou, J. (2017) 'RASSF4 controls SOCE and ER-PM junctions through regulation of PI(4,5)P', *J Cell Biol*, 216(7), pp. 2011-2025.
- Cheung, K. H., Mei, L., Mak, D. O., Hayashi, I., Iwatsubo, T., Kang, D. E. and Foskett, J. K. (2010) 'Gain-of-function enhancement of IP3 receptor modal gating by familial Alzheimer's disease-linked presenilin mutants in human cells and mouse neurons', *Sci Signal*, 3(114), pp. ra22.
- Cheung, K. H., Shineman, D., Müller, M., Cárdenas, C., Mei, L., Yang, J., Tomita, T., Iwatsubo, T., Lee, V. M. and Foskett, J. K. (2008) 'Mechanism of Ca²⁺ disruption in Alzheimer's disease by presenilin regulation of InsP3 receptor channel gating', *Neuron*, 58(6), pp. 871-83.
- Chin, C. F. and Yeong, F. M. (2010) 'Safeguarding entry into mitosis: the antephase checkpoint', *Mol Cell Biol*, 30(1), pp. 22-32.
- Clapham, D. E. (1995) 'Calcium signaling', *Cell*, 80(2), pp. 259-68.
- 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', *J Biol Chem*, 262(20), pp. 9561-8.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A. and Zhang, F. (2013) 'Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems', *Science*, 339(6121), pp. 819-23.
- Coon, A. L., Wallace, D. R., Mactutus, C. F. and Booze, R. M. (1999) 'L-type calcium channels in the hippocampus and cerebellum of Alzheimer's disease brain tissue', *Neurobiol Aging*, 20(6), pp. 597-603.
- Crouch, P. J., Blake, R., Duce, J. A., Ciccotosto, G. D., Li, Q. X., Barnham, K. J., Curtain, C. C., Cherny, R. A., Cappai, R., Dyrks, T., Masters, C. L. and Trounce, I. A. (2005) 'Copper-dependent inhibition of human cytochrome c oxidase by a dimeric conformer of amyloid-beta1-42', *J Neurosci*, 25(3), pp. 672-9.

- Csordás, G., Thomas, A. P. and Hajnóczky, G. (1999) 'Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria', *EMBO J*, 18(1), pp. 96-108.
- Daly, G. and Chernajovsky, Y. (2000) 'Recent developments in retroviral-mediated gene transduction', *Mol Ther*, 2(5), pp. 423-34.
- De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabò, I. and Rizzuto, R. (2011) 'A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter', *Nature*, 476(7360), pp. 336-40.
- Deak, A. T., Blass, S., Khan, M. J., Groschner, L. N., Waldeck-Weiermair, M., Hallström, S., Graier, W. F. and Malli, R. (2014) 'IP3-mediated STIM1 oligomerization requires intact mitochondrial Ca²⁺ uptake', *J Cell Sci*, 127(Pt 13), pp. 2944-55.
- Debacqz-Chainiaux, F., Erusalimsky, J. D., Campisi, J. and Toussaint, O. (2009) 'Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo', *Nat Protoc*, 4(12), pp. 1798-806.
- Dellis, O., Dedos, S. G., Tovey, S. C., Taufiq-Ur-Rahman, Dubel, S. J. and Taylor, C. W. (2006) 'Ca²⁺ entry through plasma membrane IP3 receptors', *Science*, 313(5784), pp. 229-33.
- Denizot, F. and Lang, R. (1986) 'Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability', *J Immunol Methods*, 89(2), pp. 271-7.
- Denton, R. M. (2009) 'Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions', *Biochim Biophys Acta*, 1787(11), pp. 1309-16.
- Dimberg, A., Bahram, F., Karlberg, I., Larsson, L. G., Nilsson, K. and Oberg, F. (2002) 'Retinoic acid-induced cell cycle arrest of human myeloid cell lines is associated with sequential down-regulation of c-Myc and cyclin E and posttranscriptional up-regulation of p27(Kip1)', *Blood*, 99(6), pp. 2199-206.
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I. and Pereira-Smith, O. (1995) 'A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(20), pp. 9363-7.
- Du, H., Guo, L., Yan, S., Sosunov, A. A., McKhann, G. M. and Yan, S. S. (2010) 'Early deficits in synaptic mitochondria in an Alzheimer's disease mouse model', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(43), pp. 18670-5.
- Duchen, M. R. (1999) 'Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signalling and cell death', *J Physiol*, 516 (Pt 1), pp. 1-17.
- Dunlap, K., Luebke, J. I. and Turner, T. J. (1995) 'Exocytotic Ca²⁺ channels in mammalian central neurons', *Trends Neurosci*, 18(2), pp. 89-98.
- Ebashi, S., Endo, M. and Otsuki, I. (1969) 'Control of muscle contraction', *Q Rev Biophys*, 2(4), pp. 351-84.
- Encinas, M., Iglesias, M., Liu, Y., Wang, H., Muhaisen, A., Cena, V., Gallego, C. and Comella, J. X. (2000) 'Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells', *J Neurochem*, 75(3), pp. 991-1003.
- Fang, D., Wang, Y., Zhang, Z., Du, H., Yan, S., Sun, Q., Zhong, C., Wu, L., Vangavaragu, J. R., Hu, G., Guo, L., Rabinowitz, M., Glaser, E., Arancio, O., Sosunov, A. A., McKhann, G. M., Chen, J. X. and Yan, S. S. (2015) 'Increased neuronal PreP activity reduces A β accumulation, attenuates neuroinflammation and improves mitochondrial and synaptic function in Alzheimer disease's mouse model', *Hum Mol Genet*, 24(18), pp. 5198-210.
- 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(7090), pp. 179-85.
- Filadi, R., Leal, N. S., Schreiner, B., Rossi, A., Dentoni, G., Pinho, C. M., Wiehager, B., Cieri, D., Cali, T., Pizzo, P. and Ankarcrona, M. (2018) 'TOM70 Sustains Cell Bioenergetics by Promoting IP3R3-Mediated ER to Mitochondria Ca', *Curr Biol*, 28(3), pp. 369-382.e6.
- Flavell, S. W. and Greenberg, M. E. (2008) 'Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system', *Annu Rev Neurosci*, 31, pp. 563-90.
- Fonteriz, R. I., de la Fuente, S., Moreno, A., Lobatón, C. D., Montero, M. and Alvarez, J. (2010) 'Monitoring mitochondrial [Ca²⁺] dynamics with rhod-2, ratiometric pericam and aequorin', *Cell Calcium*, 48(1), pp. 61-9.
- Forette, F., Seux, M. L., Staessen, J. A., Thijs, L., Babarskiene, M. R., Babeanu, S., Bossini, A., Fagard, R., Gil-Extremera, B.,



- Laks, T., Kobalava, Z., Sarti, C., Tuomilehto, J., Vanhanen, H., Webster, J., Yodfat, Y., Birkenhäger, W. H. and Investigators, S. H. i. E. (2002) 'The prevention of dementia with antihypertensive treatment: new evidence from the Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) study', *Arch Intern Med*, 162(18), pp. 2046-52.
- Forster, J. I., Köglberger, S., Trefois, C., Boyd, O., Baumuratov, A. S., Buck, L., Balling, R. and Antony, P. M. (2016) 'Characterization of Differentiated SH-SY5Y as Neuronal Screening Model Reveals Increased Oxidative Vulnerability', *J Biomol Screen*, 21(5), pp. 496-509.
- Foskett, J. K., White, C., Cheung, K. H. and Mak, D. O. (2007) 'Inositol trisphosphate receptor Ca²⁺ release channels', *Physiol Rev*, 87(2), pp. 593-658.
- Gant, J. C., Sama, M. M., Landfield, P. W. and Thibault, O. (2006) 'Early and simultaneous emergence of multiple hippocampal biomarkers of aging is mediated by Ca²⁺-induced Ca²⁺ release', *J Neurosci*, 26(13), pp. 3482-90.
- Garcia-Alvarez, G., Shetty, M. S., Lu, B., Yap, K. A., Oh-Hora, M., Sajikumar, S., Bichler, Z. and Fivaz, M. (2015) 'Impaired spatial memory and enhanced long-term potentiation in mice with forebrain-specific ablation of the Stim genes', *Front Behav Neurosci*, 9, pp. 180.
- Garcia-Bereguain, M. A., Samhan-Arias, A. K., Martin-Romero, F. J. and Gutierrez-Merino, C. (2008) 'Hydrogen sulfide raises cytosolic calcium in neurons through activation of L-type Ca²⁺ channels', *Antioxid Redox Signal*, 10(1), pp. 31-42.
- Gazda, K., Kuznicki, J. and Wegierski, T. (2017) 'Knockdown of amyloid precursor protein increases calcium levels in the endoplasmic reticulum', *Sci Rep*, 7(1), pp. 14512.
- Gill, D. L., Grollman, E. F. and Kohn, L. D. (1981) 'Calcium transport mechanisms in membrane vesicles from guinea pig brain synaptosomes', *J Biol Chem*, 256(1), pp. 184-92.
- Gire, V. and Dulic, V. (2015) 'Senescence from G2 arrest, revisited', *Cell Cycle*, 14(3), pp. 297-304.
- 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. and Akhmanova, A. (2008) 'STIM1 is a MT-plus-end-tracking protein involved in remodeling of the ER', *Curr Biol*, 18(3), pp. 177-82.
- Gruszczynska-Biegala, J., Sladowska, M. and Kuznicki, J. (2016) 'AMPA Receptors Are Involved in Store-Operated Calcium Entry and Interact with STIM Proteins in Rat Primary Cortical Neurons', *Front Cell Neurosci*, 10, pp. 251.
- Gutierrez-Martin, Y., Martin-Romero, F. J., Henao, F. and Gutierrez-Merino, C. (2002) 'Synaptosomal plasma membrane Ca(2+) pump activity inhibition by repetitive micromolar ONOO(-) pulses', *Free Radic Biol Med*, 32(1), pp. 46-55.
- Hall, D. D., Davare, M. A., Shi, M., Allen, M. L., Weisenhaus, M., McKnight, G. S. and Hell, J. W. (2007) 'Critical role of cAMP-dependent protein kinase anchoring to the L-type calcium channel Cav1.2 via A-kinase anchor protein 150 in neurons', *Biochemistry*, 46(6), pp. 1635-46.
- Hanahan, D. (1983) 'Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids', *J Mol Biol*, 166(4), pp. 557-80.
- Hansson, C. A., Frykman, S., Farmery, M. R., Tjernberg, L. O., Nilsberth, C., Pursglove, S. E., Ito, A., Winblad, B., Cowburn, R. F., Thyberg, J. and Ankarcrona, M. (2004) 'Nicastrin, presenilin, APH-1, and PEN-2 form active gamma-secretase complexes in mitochondria', *J Biol Chem*, 279(49), pp. 51654-60.
- Hansson Petersen, C. A., Alikhani, N., Behbahani, H., Wiehager, B., Pavlov, P. F., Alafuzoff, I., Leinonen, V., Ito, A., Winblad, B., Glaser, E. and Ankarcrona, M. (2008) 'The amyloid beta-peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(35), pp. 13145-50.
- Hardie, R. C. and Minke, B. (1993) 'Novel Ca²⁺ channels underlying transduction in Drosophila photoreceptors: implications for phosphoinositide-mediated Ca²⁺ mobilization', *Trends Neurosci*, 16(9), pp. 371-6.
- Hardy, J. and Selkoe, D. J. (2002) 'The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics', *Science*, 297(5580), pp. 353-6.
- Harraz, O. F. and Altier, C. (2014) 'STIM1-mediated bidirectional regulation of Ca(2+) entry through voltage-gated calcium channels (VGCC) and calcium-release activated channels (CRAC)', *Front Cell Neurosci*, 8, pp. 43.
- Hartmann, J., Karl, R. M., Alexander, R. P., Adelsberger, H., Brill, M. S., Ruhlmann, C., Ansel, A., Sakimura, K., Baba, Y., Kurosaki, T., Misgeld, T. and Konnerth, A. (2014a) 'STIM1 controls neuronal Ca(2+)(+)

signaling, mGluR1-dependent synaptic transmission, and cerebellar motor behavior', *Neuron*, 82(3), pp. 635-44.

Hartmann, J., Karl, R. M., Alexander, R. P., Adelsberger, H., Brill, M. S., Ruhlmann, C., Ansel, A., Sakimura, K., Baba, Y., Kurosaki, T., Misgeld, T. and Konnerth, A. (2014b) 'STIM1 Controls Neuronal Ca(2+) Signaling, mGluR1-Dependent Synaptic Transmission, and Cerebellar Motor Behavior', *Neuron*, 82(3), pp. 635-44.

Hartzell, C. A., Jankowska, K. I., Burkhardt, J. K. and Lewis, R. S. (2016) 'Calcium influx through CRAC channels controls actin organization and dynamics at the immune synapse', *Elife*, 5.

Hasselbach, W. (1964) 'Atp-Driven Active Transport of Calcium in the Membranes of the Sarcoplasmic Reticulum', *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 160, pp. 501-4.

Hedskog, L., Pinho, C. M., Filadi, R., Rönnbäck, A., Hertwig, L., Wiegner, B., Larssen, P., Gellhaar, S., Sandebring, A., Westerlund, M., Graff, C., Winblad, B., Galter, D., Behbahani, H., Pizzo, P., Glaser, E. and Ankarcona, M. (2013) 'Modulation of the endoplasmic reticulum-mitochondria interface in Alzheimer's disease and related models', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(19), pp. 7916-21.

Heidelberger, R., Heinemann, C., Neher, E. and Matthews, G. (1994) 'Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal', *Nature*, 371(6497), pp. 513-5.

Helle, S. C., Kanfer, G., Kolar, K., Lang, A., Michel, A. H. and Kornmann, B. (2013) 'Organization and function of membrane contact sites', *Biochim Biophys Acta*, 1833(11), pp. 2526-41.

Henke, N., Albrecht, P., Pfeiffer, A., Toutzaris, D., Zanger, K. and Methner, A. (2012) 'Stromal interaction molecule 1 (STIM1) is involved in the regulation of mitochondrial shape and bioenergetics and plays a role in oxidative stress', *J Biol Chem*, 287(50), pp. 42042-52.

Herault, O., Gallay, N., Domenech, J., Colombat, P. and Binet, C. (2004) 'Pharmacological doses of all-trans retinoic acid promote G0/G1 transition and G1 arrest of normal human marrow CD34+ cells', *Cell Death Differ*, 11 Suppl 2, pp. S207-9.

Hirabayashi, Y., Kwon, S. K., Paek, H., Pernice, W. M., Paul, M. A., Lee, J., Erfani, P., Raczkowski, A., Petrey, D. S., Pon, L. A. and Polleux, F. (2017) 'ER-mitochondria tethering by PDZD8 regulates Ca', *Science*, 358(6363), pp. 623-630.

Hofer, A. M., Curci, S., Doble, M. A., Brown, E. M. and Soybel, D. I. (2000) 'Intercellular communication mediated by the extracellular calcium-sensing receptor', *Nat Cell Biol*, 2(7), pp. 392-8.

Hofmann, T., Obukhov, A. G., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T. and Schultz, G. (1999) 'Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol', *Nature*, 397(6716), pp. 259-63.

Hoover, P. J. and Lewis, R. S. (2011) 'Stoichiometric requirements for trapping and gating of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) channels by stromal interaction molecule 1 (STIM1)', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(32), pp. 13299-304.

Hoth, M., Button, D. C. and Lewis, R. S. (2000) 'Mitochondrial control of calcium-channel gating: a mechanism for sustained signaling and transcriptional activation in T lymphocytes', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(19), pp. 10607-12.

Hou, P. F., Liu, Z. H., Li, N., Cheng, W. J. and Guo, S. W. (2015) 'Knockdown of STIM1 improves neuronal survival after traumatic neuronal injury through regulating mGluR1-dependent Ca(2+) signaling in mouse cortical neurons', *Cell Mol Neurobiol*, 35(2), pp. 283-92.

Irvine, R. F. (1990) "Quantal' Ca²⁺ release and the control of Ca²⁺ entry by inositol phosphates--a possible mechanism', *FEBS Lett*, 263(1), pp. 5-9.

Iwai, M., Michikawa, T., Bosanac, I., Ikura, M. and Mikoshiba, K. (2007) 'Molecular basis of the isoform-specific ligand-binding affinity of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors', *J Biol Chem*, 282(17), pp. 12755-64.

Jaworska, A., Dzbek, J., Styczynska, M. and Kuznicki, J. (2013) 'Analysis of calcium homeostasis in fresh lymphocytes from patients with sporadic Alzheimer's disease or mild cognitive impairment', *Biochim Biophys Acta*, 1833(7), pp. 1692-9.

Jing, J., He, L., Sun, A., Quintana, A., Ding, Y., Ma, G., Tan, P., Liang, X., Zheng, X., Chen, L., Shi, X., Zhang, S. L., Zhong, L., Huang, Y., Dong, M. Q., Walker, C. L., Hogan, P. G., Wang, Y. and Zhou, Y. (2015) 'Proteomic mapping of ER-PM junctions identifies STIMATE as a regulator of Ca²⁺ influx', *Nat Cell Biol*, 17(10), pp. 1339-47.

Jouaville, L. S., Ichas, F., Holmuhamedov, E. L., Camacho, P. and Lechleiter, J. D. (1995) 'Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in *Xenopus laevis* oocytes', *Nature*, 377(6548), pp. 438-41.



- Karlseder, J., Smogorzewska, A. and de Lange, T. (2002) 'Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss', *Science*, 295(5564), pp. 2446-9.
- Kim, J., Yang, Y., Song, S. S., Na, J. H., Oh, K. J., Jeong, C., Yu, Y. G. and Shin, Y. K. (2014) 'Beta-amyloid oligomers activate apoptotic BAK pore for cytochrome c release', *Biophys J*, 107(7), pp. 1601-8.
- Kipanyula, M. J., Contreras, L., Zampese, E., Lazzari, C., Wong, A. K., Pizzo, P., Fasolato, C. and Pozzan, T. (2012) 'Ca²⁺ dysregulation in neurons from transgenic mice expressing mutant presenilin 2', *Aging Cell*, 11(5), pp. 885-93.
- Klejman, M. E., Gruszczynska-Biegala, J., Skibinska-Kijek, A., Wisniewska, M. B., Misztal, K., Blazejczyk, M., Bojarski, L. and Kuznicki, J. (2009) 'Expression of STIM1 in brain and puncta-like co-localization of STIM1 and ORAI1 upon depletion of Ca(2+) store in neurons', *Neurochem Int*, 54(1), pp. 49-55.
- Kuchibhotla, K. V., Goldman, S. T., Lattarulo, C. R., Wu, H. Y., Hyman, B. T. and Bacskai, B. J. (2008) 'Abeta plaques lead to aberrant regulation of calcium homeostasis in vivo resulting in structural and functional disruption of neuronal networks', *Neuron*, 59(2), pp. 214-25.
- Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y. and Erusalimsky, J. D. (2000) 'Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells', *J Cell Sci*, 113 (Pt 20), pp. 3613-22.
- Kwon, S. K., Sando, R., Lewis, T. L., Hirabayashi, Y., Maximov, A. and Polleux, F. (2016) 'LKB1 Regulates Mitochondria-Dependent Presynaptic Calcium Clearance and Neurotransmitter Release Properties at Excitatory Synapses along Cortical Axons', *PLoS Biol*, 14(7), pp. e1002516.
- Laemmli, U. K. (1970) 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4', *Nature*, 227(259), pp. 680-5.
- Lagoa, R., Graziani, I., Lopez-Sanchez, C., Garcia-Martinez, V. and Gutierrez-Merino, C. (2011) 'Complex I and cytochrome c are molecular targets of flavonoids that inhibit hydrogen peroxide production by mitochondria', *Biochim Biophys Acta*, 1807(12), pp. 1562-72.
- Lai, Y. C., Kondapalli, C., Lehneck, R., Procter, J. B., Dill, B. D., Woodroof, H. I., Gourlay, R., Pegg, M., Macartney, T. J., Corti, O., Corvol, J. C., Campbell, D. G., Itzen, A., Trost, M. and Muqit, M. M. (2015) 'Phosphoproteomic screening identifies Rab GTPases as novel downstream targets of PINK1', *EMBO J*, 34(22), pp. 2840-61.
- Landfield, P. W. (1994) 'Increased hippocampal Ca²⁺ channel activity in brain aging and dementia. Hormonal and pharmacologic modulation', *Ann N Y Acad Sci*, 747, pp. 351-64.
- Lein, E. S. and Hawrylycz, M. J. et al. (2007) 'Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain', *Nature*, 445(7124), pp. 168-76.
- Lenhard, S. C., Strittmatter, R., Price, W. J., Chandra, S., White, R. F. and Barone, F. C. (2008) 'Brain MRI and neurological deficit measurements in focal stroke: rapid throughput validated with isradipine', *Pharmacology*, 81(1), pp. 1-10.
- Li, B. and de Lange, T. (2003) 'Rap1 affects the length and heterogeneity of human telomeres', *Mol Biol Cell*, 14(12), pp. 5060-8.
- Li, Y., Song, J., Liu, X., Zhang, M., An, J., Sun, P., Li, D., Jin, T. and Wang, J. (2013) 'High expression of STIM1 in the early stages of diffuse axonal injury', *Brain Res*, 1495, pp. 95-102.
- Linde, C. I., Baryshnikov, S. G., Mazzocco-Spezia, A. and Golovina, V. A. (2011) 'Dysregulation of Ca²⁺ signaling in astrocytes from mice lacking amyloid precursor protein', *Am J Physiol Cell Physiol*, 300(6), pp. C1502-12.
- 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', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(22), pp. 9301-6.
- 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', *Curr Biol*, 15(13), pp. 1235-41.
- Lombardi, A. A. and Elrod, J. W. (2017) 'Mediating ER-mitochondrial cross-talk', *Science*, 358(6363), pp. 591-592.
- Lopez, J. R., Lyckman, A., Oddo, S., Laferla, F. M., Querfurth, H. W. and Shtifman, A. (2008) 'Increased intraneuronal resting [Ca²⁺] in adult Alzheimer's disease mice', *J Neurochem*, 105(1), pp. 262-71.
- Lopez-Guerrero, A. M., Pascual-Caro, C., Martin-Romero, F. J. and Pozo-Guisado, E. (2017a) 'Store-operated calcium entry is dispensable for the activation of ERK1/2 pathway in prostate cancer cells', *Cell Signal*, 40, pp. 44-52.
- Lopez-Guerrero, A. M., Tomas-Martin, P., Pascual-Caro, C., Macartney, T., Rojas-Fernandez, A., Ball, G., Alessi, D. R., Pozo-

- Guisado, E. and Martin-Romero, F. J. (2017b) 'Regulation of membrane ruffling by polarized STIM1 and ORAI1 in cortactin-rich domains', *Sci Rep*, 7(1), pp. 383.
- Luik, R. M., Wang, B., Prakriya, M., Wu, M. M. and Lewis, R. S. (2008) 'Oligomerization of STIM1 couples ER calcium depletion to CRAC channel activation', *Nature*, 454(7203), pp. 538-42.
- Luik, R. M., Wu, M. M., Buchanan, J. and Lewis, R. S. (2006) 'The elementary unit of store-operated Ca²⁺ entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions', *J Cell Biol*, 174(6), pp. 815-25.
- Lytton, J., Westlin, M. and Hanley, M. R. (1991) 'Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps', *J Biol Chem*, 266(26), pp. 17067-71.
- Majewski, Ł., Maciąg, F., Boguszewski, P. M., Wasilewska, I., Wiera, G., Wójtowicz, T., Mozzymas, J. and Kuznicki, J. (2017) 'Overexpression of STIM1 in neurons in mouse brain improves contextual learning and impairs long-term depression', *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1864(6), pp. 1071-1087.
- Mancarella, S., Potireddy, S., Wang, Y., Gao, H., Gandhirajan, R. K., Autieri, M., Scalia, R., Cheng, Z., Wang, H., Madesh, M., Houser, S. R. and Gill, D. L. (2013) 'Targeted STIM1 deletion impairs calcium homeostasis, NFAT activation, and growth of smooth muscle', *FASEB J*, 27(3), pp. 893-906.
- Manji, S. S., Parker, N. J., Williams, R. T., van Stekelenburg, L., Pearson, R. B., Dziadek, M. and Smith, P. J. (2000) 'STIM1: a novel phosphoprotein located at the cell surface', *Biochim Biophys Acta*, 1481(1), pp. 147-55.
- 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(2), pp. 307-15.
- Martin-Romero, F. J., Pascual-Caro, C., Lopez-Guerrero, A., Espinosa-Bermejo, N. and Pozo-Guisado, E. (2018) 'Regulation of Calcium Signaling by STIM1 and ORAI1', in Behringer, J.N.B.a.E.J. (ed.) *Calcium and Signal Transduction*. IntechOpen.
- Matsumoto, M., Nakagawa, T., Inoue, T., Nagata, E., Tanaka, K., Takano, H., Minowa, O., Kuno, J., Sakakibara, S., Yamada, M., Yoneshima, H., Miyawaki, A., Fukuuchi, Y., Furuichi, T., Okano, H., Mikoshiba, K. and Noda, T. (1996) 'Ataxia and epileptic seizures in mice lacking type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor', *Nature*, 379(6561), pp. 168-71.
- Maus, M., Cuk, M., Patel, B., Lian, J., Ouimet, M., Kaufmann, U., Yang, J., Horvath, R., Hornig-Do, H. T., Chrzanowska-Lightowlers, Z. M., Moore, K. J., Cuervo, A. M. and Feske, S. (2017) 'Store-Operated Ca', *Cell Metab*, 25(3), pp. 698-712.
- Meissner, G. (1994) 'Ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels and their regulation by endogenous effectors', *Annu Rev Physiol*, 56, pp. 485-508.
- Micaroni, M., Perinetti, G., Berrie, C. P. and Mironov, A. A. (2010) 'The SPCA1 Ca²⁺ pump and intracellular membrane trafficking', *Traffic*, 11(10), pp. 1315-33.
- Mignen, O. and Shuttleworth, T. J. (2000) 'I(A_{RC}), a novel arachidonate-regulated, noncapacitative Ca(2+) entry channel', *J Biol Chem*, 275(13), pp. 9114-9.
- Miljanich, G. P. and Ramachandran, J. (1995) 'Antagonists of neuronal calcium channels: structure, function, and therapeutic implications', *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 35, pp. 707-34.
- Miyakawa, T., Maeda, A., Yamazawa, T., Hirose, K., Kurosaki, T. and Iino, M. (1999) 'Encoding of Ca²⁺ signals by differential expression of IP₃ receptor subtypes', *EMBO J*, 18(5), pp. 1303-8.
- Montell, C. and Rubin, G. M. (1989) 'Molecular characterization of the Drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction', *Neuron*, 2(4), pp. 1313-23.
- Montero, M., Alonso, M. T., Carnicero, E., Cuchillo-Ibáñez, I., Albillos, A., García, A. G., García-Sancho, J. and Alvarez, J. (2000) 'Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca²⁺ transients that modulate secretion', *Nat Cell Biol*, 2(2), pp. 57-61.
- Mosmann, T. (1983) 'Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays', *J Immunol Methods*, 65(1-2), pp. 55-63.
- Muik, M., Fahrner, M., Derler, I., Schindl, R., Bergsmann, J., Frischauf, I., Groschner, K. and Romanin, C. (2009) 'A Cytosolic Homomerization and a Modulatory Domain within STIM1 C Terminus Determine Coupling to ORAI1 Channels', *J Biol Chem*, 284(13), pp. 8421-6.
- Muik, M., Fahrner, M., Schindl, R., Stathopoulos, P., Frischauf, I., Derler, I., Plenck, P., Lackner, B., Groschner, K., Ikura,



- M. and Romanin, C. (2011) 'STIM1 couples to ORAI1 via an intramolecular transition into an extended conformation', *EMBO J*, 30(9), pp. 1678-89.
- Muik, M., Frischauf, I., Derler, I., Fahrner, M., Bergsmann, J., Eder, P., Schindl, R., Hesch, C., Polzinger, B., Fritsch, R., Kahr, H., Madl, J., Gruber, H., Groschner, K. and Romanin, C. (2008) 'Dynamic coupling of the putative coiled-coil domain of ORAI1 with STIM1 mediates ORAI1 channel activation', *J Biol Chem*, 283(12), pp. 8014-22.
- Mukherjee, S. and Brooks, W. H. (2014) 'Stromal interaction molecules as important therapeutic targets in diseases with dysregulated calcium flux', *Biochim Biophys Acta*.
- Mullins, F. M., Park, C. Y., Dolmetsch, R. E. and Lewis, R. S. (2009) 'STIM1 and calmodulin interact with Orai1 to induce Ca²⁺-dependent inactivation of CRAC channels', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(36), pp. 15495-500.
- Munoz, I. M., Szyniarowski, P., Toth, R., Rouse, J. and Lachaud, C. (2014) 'Improved genome editing in human cell lines using the CRISPR method', *PLoS One*, 9(10), pp. e109752.
- Naghdi, S., Waldeck-Weiermair, M., Fertschai, I., Poteser, M., Graier, W. F. and Malli, R. (2010) 'Mitochondrial Ca²⁺ uptake and not mitochondrial motility is required for STIM1-Orai1-dependent store-operated Ca²⁺ entry', *J Cell Sci*, 123(Pt 15), pp. 2553-64.
- Nguyen, N., Biet, M., Simard, E., Béliveau, E., Francoeur, N., Guillemette, G., Dumaine, R., Grandbois, M. and Boulay, G. (2013) 'STIM1 participates in the contractile rhythmicity of HL-1 cells by moderating T-type Ca(2+) channel activity', *Biochim Biophys Acta*, 1833(6), pp. 1294-303.
- Nimmrich, V. and Eckert, A. (2013) 'Calcium channel blockers and dementia', *Br J Pharmacol*, 169(6), pp. 1203-10.
- Novello, M. J., Zhu, J., Feng, Q., Ikura, M. and Stathopoulos, P. B. (2018) 'Structural elements of stromal interaction molecule function', *Cell Calcium*, 73, pp. 88-94.
- Oh-Hora, M., Yamashita, M., Hogan, P. G., Sharma, S., Lamperti, E., Chung, W., Prakriya, M., Feske, S. and Rao, A. (2008) 'Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance', *Nat Immunol*, 9(4), pp. 432-43.
- Paillusson, S., Stoica, R., Gomez-Suaga, P., Lau, D. H. W., Mueller, S., Miller, T. and Miller, C. C. J. (2016) 'There's Something Wrong with my MAM; the ER-Mitochondria Axis and Neurodegenerative Diseases', *Trends Neurosci*, 39(3), pp. 146-157.
- Palmer, A. E. and Tsien, R. Y. (2006) 'Measuring calcium signaling using genetically targetable fluorescent indicators', *Nat Protoc*, 1(3), pp. 1057-65.
- Palty, R., Raveh, A., Kaminsky, I., Meller, R. and Reuveny, E. (2012) 'SARAF inactivates the store operated calcium entry machinery to prevent excess calcium refilling', *Cell*, 149(2), pp. 425-38.
- Palty, R., Silverman, W. F., Hershinkel, M., Caporale, T., Sensi, S. L., Parnis, J., Nolte, C., Fishman, D., Shoshan-Barmatz, V., Herrmann, S., Khananshvilii, D. and Sekler, I. (2010) 'NCLX is an essential component of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(1), pp. 436-41.
- Parekh, A. B. and Penner, R. (1997) 'Store depletion and calcium influx', *Physiol Rev*, 77(4), pp. 901-30.
- 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(5), pp. 876-90.
- 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(6000), pp. 101-5.
- Pascual-Caro, C., Berrocal, M., Lopez-Guerrero, A. M., Alvarez-Barrientos, A., Pozo-Guisado, E., Gutierrez-Merino, C., Mata, A. M. and Martin-Romero, F. J. (2018a) 'STIM1 deficiency is linked to Alzheimer's disease and triggers cell death in SH-SY5Y cells by upregulation of L-type voltage-operated Ca', *J Mol Med (Berl)*, 96(10), pp. 1061-1079.
- Pascual-Caro, C., Espinosa-Bermejo, N., Pozo-Guisado, E. and Martin-Romero, F. (2018b) 'Role of STIM1 in neurodegeneration', *World Journal of Biological Chemistry*, 9, pp. 16-24.
- Patron, M., Raffaello, A., Granatiero, V., Tosatto, A., Merli, G., De Stefani, D., Wright, L., Pallafacchina, G., Terrin, A., Mammucari, C. and Rizzuto, R. (2013) 'The mitochondrial calcium uniporter (MCU): molecular identity and physiological roles', *J Biol Chem*, 288(15), pp. 10750-8.
- Pavlov, P. F., Wiehager, B., Sakai, J., Frykman, S., Behbahani, H., Winblad, B. and Ankarcróna, M. (2011) 'Mitochondrial γ -secretase participates in the metabolism of

mitochondria-associated amyloid precursor protein', *FASEB J*, 25(1), pp. 78-88.

Petersen, C. C., Berridge, M. J., Borgese, M. F. and Bennett, D. L. (1995) 'Putative capacitative calcium entry channels: expression of *Drosophila* trp and evidence for the existence of vertebrate homologues', *Biochem J*, 311 (Pt 1), pp. 41-4.

Phillips, A. M., Bull, A. and Kelly, L. E. (1992) 'Identification of a *Drosophila* gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the trp phototransduction gene', *Neuron*, 8(4), pp. 631-42.

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', *J Cell Sci*, 123(Pt 18), pp. 3084-93.

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', *J Cell Sci*, 126(Pt 14), pp. 3170-80.

Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P. and Meldolesi, J. (1994) 'Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores', *Physiol Rev*, 74(3), pp. 595-636.

Putney, J. W. and Bird, G. S. (2008) 'Cytoplasmic calcium oscillations and store-operated calcium influx', *J Physiol*, 586(13), pp. 3055-9.

Putney, J. W., Jr. (1986) 'A model for receptor-regulated calcium entry', *Cell Calcium*, 7(1), pp. 1-12.

Putney, J. W., Jr. (2003) 'Capacitative calcium entry in the nervous system', *Cell Calcium*, 34(4-5), pp. 339-44.

Putney, J. W., Jr., Broad, L. M., Braun, F. J., Lievremont, J. P. and Bird, G. S. (2001) 'Mechanisms of capacitative calcium entry', *J Cell Sci*, 114(Pt 12), pp. 2223-9.

Reuter, H. (1979) 'Properties of two inward membrane currents in the heart', *Annu Rev Physiol*, 41, pp. 413-24.

Riccardi, D. (1999) 'Cell surface, Ca²⁺(cation)-sensing receptor(s): one or many?', *Cell Calcium*, 26(3-4), pp. 77-83.

Rizzuto, R. and Pozzan, T. (2006) 'Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences', *Physiol Rev*, 86(1), pp. 369-408.

Rojas-Fernandez, A., Herhaus, L., Macartney, T., Lachaud, C., Hay, R. T. and Sankota, G. P. (2015) 'Rapid generation of

endogenously driven transcriptional reporters in cells through CRISPR/Cas9', *Sci Rep*, 5, pp. 9811.

Roos, J., DiGregorio, P. J., Yeromin, A. V., Ohlsen, K., Liudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J. A., Wagner, S. L., Cahalan, M. D., Velicelebi, G. and Stauderman, K. A. (2005) 'STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function', *J Cell Biol*, 169(3), pp. 435-45.

Ruan, L., Zhou, C., Jin, E., Kucharavy, A., Zhang, Y., Wen, Z., Florens, L. and Li, R. (2017) 'Cytosolic proteostasis through importing of misfolded proteins into mitochondria', *Nature*, 543(7645), pp. 443-446.

Ryu, C., Jang, D. C., Jung, D., Kim, Y. G., Shim, H. G., Ryu, H. H., Lee, Y. S., Linden, D. J., Worley, P. F. and Kim, S. J. (2017) 'STIM1 Regulates Somatic Ca', *J Neurosci*, 37(37), pp. 8876-8894.

Sampieri, A., Santoyo, K., Asanov, A. and Vaca, L. (2018) 'Association of the IP3R to STIM1 provides a reduced intraluminal calcium microenvironment, resulting in enhanced store-operated calcium entry', *Sci Rep*, 8(1), pp. 13252.

Sanz-Blasco, S., Valero, R. A., Rodríguez-Crespo, I., Villalobos, C. and Núñez, L. (2008) 'Mitochondrial Ca²⁺ overload underlies Abeta oligomers neurotoxicity providing an unexpected mechanism of neuroprotection by NSAIDs', *PLoS One*, 3(7), pp. e2718.

Scaduto, R. C. and Grotyohann, L. W. (1999) 'Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives', *Biophys J*, 76(1 Pt 1), pp. 469-77.

Selinger, Z., Doza, Y. N. and Minke, B. (1993) 'Mechanisms and genetics of photoreceptors desensitization in *Drosophila* flies', *Biochim Biophys Acta*, 1179(3), pp. 283-99.

Sepulveda, M. R., Berrocal, M., Marcos, D., Wuytack, F. and Mata, A. M. (2007) 'Functional and immunocytochemical evidence for the expression and localization of the secretory pathway Ca²⁺-ATPase isoform 1 (SPCA1) in cerebellum relative to other Ca²⁺ pumps', *J Neurochem*, 103(3), pp. 1009-18.

Sepulveda, M. R., Hidalgo-Sanchez, M. and Mata, A. M. (2005) 'A developmental profile of the levels of calcium pumps in chick cerebellum', *J Neurochem*, 95(3), pp. 673-83.

Shanmughapriya, S., Rajan, S., Hoffman, N. E., Zhang, X., Guo, S., Kolesar,



- J. E., Hines, K. J., Ragheb, J., Jog, N. R., Caricchio, R., Baba, Y., Zhou, Y., Kaufman, B. A., Cheung, J. Y., Kurosaki, T., Gill, D. L. and Madesh, M. (2015) 'Ca²⁺ signals regulate mitochondrial metabolism by stimulating CREB-mediated expression of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter gene MCU', *Sci Signal*, 8(366), pp. ra23.
- Sharma, S., Quintana, A., Findlay, G. M., Mettlen, M., Baust, B., Jain, M., Nilsson, R., Rao, A. and Hogan, P. G. (2013) 'An siRNA screen for NFAT activation identifies septins as coordinators of store-operated Ca²⁺ entry', *Nature*, 499(7457), pp. 238-42.
- Sheng, L., Leshchynska, I. and Sytnyk, V. (2013) 'Cell adhesion and intracellular calcium signaling in neurons', *Cell Commun Signal*, 11, pp. 94.
- Skibinska-Kijek, A., Wisniewska, M. B., Gruszczynska-Biegala, J., Methner, A. and Kuznicki, J. (2009) 'Immunolocalization of STIM1 in the mouse brain', *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 69(4), pp. 413-28.
- Smyth, J. T., Dehaven, W. I., Bird, G. S. and Putney, J. W., Jr. (2008) 'Ca²⁺-store-dependent and -independent reversal of Stim1 localization and function', *J Cell Sci*, 121(Pt 6), pp. 762-72.
- Soboloff, J., Spassova, M. A., Tang, X. D., Hewavitharana, T., Xu, W. and Gill, D. L. (2006) 'Orai1 and STIM1 reconstitute store-operated calcium channel function', *J Biol Chem*, 281(30), pp. 20661-5.
- Spassova, M. A., Soboloff, J., He, L. P., Xu, W., Dziadek, M. A. and Gill, D. L. (2006) 'STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca(2+) channels', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(11), pp. 4040-5.
- Srikanth, S., Jung, H. J., Kim, K. D., Souda, P., Whitelegge, J. and Gwack, Y. (2010) 'A novel EF-hand protein, CRACR2A, is a cytosolic Ca²⁺ sensor that stabilizes CRAC channels in T cells', *Nat Cell Biol*, 12(5), pp. 436-46.
- Stathopoulos, 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', *J Biol Chem*, 281(47), pp. 35855-62.
- Stathopoulos, P. B., Schindl, R., Fahrner, M., Zheng, L., Gasmi-Seabrook, G. M., Muik, M., Romanin, C. and Ikura, M. (2013) 'STIM1/Orai1 coiled-coil interplay in the regulation of store-operated calcium entry', *Nat Commun*, 4, pp. 2963.
- Streb, H., Irvine, R. F., Berridge, M. J. and Schulz, I. (1983) 'Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate', *Nature*, 306(5938), pp. 67-9.
- Stutzmann, G. E., Smith, I., Caccamo, A., Oddo, S., Laferla, F. M. and Parker, I. (2006) 'Enhanced ryanodine receptor recruitment contributes to Ca²⁺ disruptions in young, adult, and aged Alzheimer's disease mice', *J Neurosci*, 26(19), pp. 5180-9.
- Sun, S., Zhang, H., Liu, J., Popugaeva, E., Xu, N. J., Feske, S., White, C. L. and Bezprozvanny, I. (2014) 'Reduced synaptic STIM2 expression and impaired store-operated calcium entry cause destabilization of mature spines in mutant presenilin mice', *Neuron*, 82(1), pp. 79-93.
- Supnet, C. and Bezprozvanny, I. (2010) 'The dysregulation of intracellular calcium in Alzheimer disease', *Cell Calcium*, 47(2), pp. 183-9.
- Szikra, T., Barabas, P., Bartoletti, T. M., Huang, W., Akopian, A., Thoreson, W. B. and Krizaj, D. (2009) 'Calcium homeostasis and cone signaling are regulated by interactions between calcium stores and plasma membrane ion channels', *PLoS One*, 4(8), pp. e6723.
- Takuma, K., Fang, F., Zhang, W., Yan, S., Fukuzaki, E., Du, H., Sosunov, A., McKhann, G., Funatsu, Y., Nakamichi, N., Nagai, T., Mizoguchi, H., Ibi, D., Hori, O., Ogawa, S., Stern, D. M., Yamada, K. and Yan, S. S. (2009) 'RAGE-mediated signaling contributes to intraneuronal transport of amyloid-beta and neuronal dysfunction', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(47), pp. 20021-6.
- Tanabe, T., Mikami, A., Niidome, T., Numa, S., Adams, B. A. and Beam, K. G. (1993) 'Structure and function of voltage-dependent calcium channels from muscle', *Ann N Y Acad Sci*, 707, pp. 81-6.
- Tarasov, A. I., Griffiths, E. J. and Rutter, G. A. (2012) 'Regulation of ATP production by mitochondrial Ca(2+)', *Cell Calcium*, 52(1), pp. 28-35.
- 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', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(7), pp. 2466-70.
- Thibault, O., Hadley, R. and Landfield, P. W. (2001) 'Elevated postsynaptic [Ca²⁺]_i and L-type calcium channel activity in aged hippocampal neurons: relationship to impaired synaptic plasticity', *J Neurosci*, 21(24), pp. 9744-56.

- 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 McCormack, J.G. & Cobbold, P.H. (eds.) *Cellular calcium*. Oxford, UK: IRL Press, pp. 1-54.
- Tong, B. C., Lee, C. S., Cheng, W. H., Lai, K. O., Foskett, J. K. and Cheung, K. H. (2016) 'Familial Alzheimer's disease-associated presenilin 1 mutants promote γ -secretase cleavage of STIM1 to impair store-operated Ca^{2+} entry', *Sci Signal*, 9(444), pp. ra89.
- Tsien, R. W. (1983) 'Calcium channels in excitable cell membranes', *Annu Rev Physiol*, 45, pp. 341-58.
- Tsien, R. W., Lipscombe, D., Madison, D. V., Bley, K. R. and Fox, A. P. (1988) 'Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation', *Trends Neurosci*, 11(10), pp. 431-8.
- Vaca, L., Sinkins, W. G., Hu, Y., Kunze, D. L. and Schilling, W. P. (1994) 'Activation of recombinant trp by thapsigargin in Sf9 insect cells', *Am J Physiol*, 267(5 Pt 1), pp. C1501-5.
- Van Baelen, K., Vanoevelen, J., Callewaert, G., Parys, J. B., De Smedt, H., Raeymaekers, L., Rizzuto, R., Missiaen, L. and Wuytack, F. (2003) 'The contribution of the SPCA1 Ca^{2+} pump to the Ca^{2+} accumulation in the Golgi apparatus of HeLa cells assessed via RNA-mediated interference', *Biochem Biophys Res Commun*, 306(2), pp. 430-6.
- Veng, L. M., Mesches, M. H. and Browning, M. D. (2003) 'Age-related working memory impairment is correlated with increases in the L-type calcium channel protein $\alpha 1\text{D}$ (Cav1.3) in area CA1 of the hippocampus and both are ameliorated by chronic nimodipine treatment', *Brain Res Mol Brain Res*, 110(2), pp. 193-202.
- Venkiteswaran, G. and Hasan, G. (2009) 'Intracellular Ca^{2+} signaling and store-operated Ca^{2+} entry are required in *Drosophila* neurons for flight', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(25), pp. 10326-31.
- Vig, M., Peinelt, C., Beck, A., Koomoa, D. L., Rabah, D., Koblan-Huberson, M., Kraft, S., Turner, H., Fleig, A., Penner, R. and Kinet, J. P. (2006) 'CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca^{2+} entry', *Science*, 312(5777), pp. 1220-3.
- Villalobos, C., Gutiérrez, L. G., Hernández-Morales, M., Del Bosque, D. and Núñez, L. (2018) 'Mitochondrial control of store-operated Ca^{2+} ', *Pharmacol Res*, 135, pp. 136-143.
- 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 $\text{Ca}_v1.2$ channels', *Science*, 330(6000), pp. 105-9.
- Wang, Y. and Mattson, M. P. (2014) 'L-type Ca^{2+} currents at CA1 synapses, but not CA3 or dentate granule neuron synapses, are increased in 3xTgAD mice in an age-dependent manner', *Neurobiol Aging*, 35(1), pp. 88-95.
- Williams, R. T., Manji, S. S., Parker, N. J., Hancock, M. S., Van Stekelenburg, L., Eid, J. P., Senior, P. V., Kazenwadel, J. S., Shandala, T., Saint, R., Smith, P. J. and Dziadek, M. A. (2001) 'Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins', *Biochem J*, 357(Pt 3), pp. 673-85.
- Wong, F., Schaefer, E. L., Roop, B. C., LaMendola, J. N., Johnson-Seaton, D. and Shao, D. (1989) 'Proper function of the *Drosophila* trp gene product during pupal development is important for normal visual transduction in the adult', *Neuron*, 3(1), pp. 81-94.
- Wootton, L. L., Argent, C. C., Wheatley, M. and Michelangeli, F. (2004) 'The expression, activity and localisation of the secretory pathway Ca^{2+} -ATPase (SPCA1) in different mammalian tissues', *Biochim Biophys Acta*, 1664(2), pp. 189-97.
- Wu, M. M., Buchanan, J., Luik, R. M. and Lewis, R. S. (2006) ' Ca^{2+} store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane', *J Cell Biol*, 174(6), pp. 803-13.
- Yang, S. N. and Berggren, P. O. (2006) 'The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic beta-cell physiology and pathophysiology', *Endocr Rev*, 27(6), pp. 621-76.
- Yoo, S. H., So, S. H., Kweon, H. S., Lee, J. S., Kang, M. K. and Jeon, C. J. (2000) 'Coupling of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and chromogranins A and B in secretory granules', *J Biol Chem*, 275(17), pp. 12553-9.
- 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', *Nat Cell Biol*, 11(3), pp. 337-43.
- Zeiger, W., Vetrivel, K. S., Buggia-Prévot, V., Nguyen, P. D., Wagner, S. L., Villereal, M. L. and Thinakaran, G. (2013) ' Ca^{2+} influx

through store-operated Ca^{2+} channels reduces Alzheimer disease β -amyloid peptide secretion', *J Biol Chem*, 288(37), pp. 26955-66.

Zeng, W., Yuan, J. P., Kim, M. S., Choi, Y. J., Huang, G. N., Worley, P. F. and Muallem, S. (2008) 'STIM1 gates TRPC channels, but not Orai1, by electrostatic interaction', *Mol Cell*, 32(3), pp. 439-48.

Zhang, H., Sun, S., Wu, L., Pchitskaya, E., Zakharova, O., Fon Tacer, K. and Bezprozvanny, I. (2016) 'Store-Operated Calcium Channel Complex in Postsynaptic Spines: A New Therapeutic Target for Alzheimer's Disease Treatment', *J Neurosci*, 36(47), pp. 11837-11850.

Zhang, H., Wu, L., Pchitskaya, E., Zakharova, O., Saito, T., Saido, T. and Bezprozvanny, I. (2015) 'Neuronal Store-Operated Calcium Entry and Mushroom Spine Loss in Amyloid Precursor Protein Knock-In Mouse Model of Alzheimer's Disease', *J Neurosci*, 35(39), pp. 13275-86.

Zhang, S. L., Yeromin, A. V., Zhang, X. H., Yu, Y., Safrina, O., Penna, A., Roos, J., Stauderman, K. A. and Cahalan, M. D. (2006) 'Genome-wide RNAi screen of Ca^{2+} influx identifies genes that regulate Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel activity', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(24), pp. 9357-62.

Zhang, S. L., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J. A., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Stauderman, K. A. and Cahalan, M. D. (2005) 'STIM1 is a Ca^{2+} sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca^{2+} store to the plasma membrane', *Nature*, 437(7060), pp. 902-5.

Zheng, L., Stathopoulos, P. B., Li, G. Y. and Ikura, M. (2008) 'Biophysical characterization of the EF-hand and SAM domain containing Ca^{2+} sensory region of STIM1 and STIM2', *Biochem Biophys Res Commun*, 369(1), pp. 240-6.

Anexo 1

Anexo 1. Relación de construcciones utilizadas en este estudio.

Construcciones para expresión proteica.

Código	Proteína	Especie	Nº de acceso	Plásmido parental
UEX129	STIM1	Mouse	NM_009287	pcDNA3.1
UEX155	STIM1-mCherry	Mouse	NM_009287	pmCherry-N1
DU40799 (Univ.Dundee)	mCherry-GFP-FIS1	Human	NM_016068.2	pBabe-hygro
MR225699 (Origene)	ITPR3-Myc	Mouse	NM_080553	pCMV6-Entry
UEX213	ITPR3-mCherry	Human	NM_002224.3	pmCherry-N1

Construcciones para silenciamiento (shRNA) o edición genómica (CRISPR/Cas9).

Código	Diana	Especie	Plásmido parental
DU52282 (primer KO sense) (Univ. Dundee)	STIM1 (ENSG00000167323)	Human	pBABED PU6
DU52301 (primer KO antisense) (Univ. Dundee)	STIM1 (ENSG00000167323)	Human	pX335
TF314247A (Origene) (shRNA_29mer)	CACNA1C (ENSG00000151067)	Human	pRFP-C-RS