



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**PARTICIPACIÓN DE LAS PROTEÍNAS STIM DURANTE LA
GENERACIÓN DE LA CORRIENTE TRANSITORIA T_{IN} Y LA
MADURACIÓN DEL OVOCITO DE LA RANA *XENOPUS LAEVIS***

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

BARBARA PAMELA SERRANO FLORES

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ROGELIO ARELLANO OSTOA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DR. ATAÚLFO MARTÍNEZ TORRES
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM
DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN ANDRADE
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM**

CIUDAD DE MÉXICO

CIUDAD UNIVERSITARIA

FEBRERO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Jurado de examen certificamos que la tesis elaborada por: Barbara Pamela Serrano Flores, cuyo título es: “Participación de las proteínas STIM durante la generación de la corriente transitoria T_{in} y la maduración del ovocito de la rana *Xenopus laevis*”, se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biomédicas y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Presidente: Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo

Secretario: Dr. Julio Eduardo Roque Moran Andrade

Vocal: Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Vocal: Dra. Laura Escobar Pérez

Vocal: Dr. Juan Carlos Gómora Martínez

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurofisiología Celular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Rogelio Arellano Ostoia, y fue apoyado con recursos financieros del CONACyT (No.82340) y del PAPIIT-UNAM (No.IN214409 y No.IN205312, así como del proyecto PAPIIT-UNAM (No.IN208209) del Dr. Francisco Gabriel Vázquez Cuevas.

Este trabajo contó también con el apoyo técnico y académico de la Dra. Teresa Edith Garay Rojas, a quien agradezco su valiosa participación

Finalmente se agradece al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y al CONACyT la beca 215719 otorgada para la realización de los estudios de posgrado.

También se agradece su colaboración a:

Auxiliar de laboratorio D-13

Horacio Leyva

Unidad de Enseñanza

M. En C. Leonor Casanova Rico

Biblioteca

Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela

Video conferencia

Lic. En Psicología Ma. de Lourdes Lara Ayala

Unidad de Proteogenómica

Dra. Anaid Antaramian

M. en C. Adriana González

Resumen

El ovocito de *Xenopus* ha sido usado como un modelo para el estudio de la homeostasis del calcio intracelular y el ciclo celular. El objetivo de este trabajo fue estudiar con el uso de oligonucleótidos antisentido el papel de las moléculas de interacción estromal (STIM) del ovocito, estas proteínas son elementos fundamentales de la entrada de calcio operada por el vaciamiento de los reservorios intracelulares (SOCE). Las proteínas STIM son sensores de la concentración de Ca^{2+} en los reservorios intracelulares y activan los canales de calcio en la membrana celular que permiten el influjo de este catión al citoplasma. Aquí mostramos la expresión endógena de STIM1 y STIM2 en el ovocito de *Xenopus* e inhibimos su síntesis a través de la inyección de los ovocitos con secuencias antisentido específicas. La disminución específica del ARNm y de las proteínas STIM se confirmó a través de PCR y Western blot, respectivamente. Una vez eliminadas, el papel de STIM1 y STIM2 fue evaluado sobre dos respuestas endógenas: 1) en la apertura de canales SOC estimulada por la liberación de Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares, a través de la activación de receptores membranales acoplados a proteínas G (GPCR) y, 2) el proceso de la maduración del ovocito por progesterona.

La activación de los canales SOC fue monitoreada eléctricamente a través de la respuesta eléctrica transitoria llamada T_{in} , una corriente de Cl^- dependiente del influjo de Ca^{2+} ; en cambio la maduración se evaluó a través del

rompimiento de la vesícula terminal (GVBD) y sus respectivos cambios electrofisiológicos.

En este trabajo, encontramos que STIM2, a diferencia de STIM1, es esencial en ambas respuestas, tanto la corriente T_{in} como GVBD fueron significativamente reducidas o eliminadas en los ovocitos sin STIM2; en cambio la eliminación de STIM1 no presentó efecto sobre el proceso de maduración, pero si se observó una disminución en la respuesta eléctrica de T_{in} en un rango de 15 – 70 %, dependiendo del GPCR estimulado por su agonista. En conclusión, la respuesta endógena de SOCE y la maduración en ovocitos de *Xenopus* depende principalmente de STIM2.

Summary

Xenopus oocyte is a useful cell model to study Ca^{2+} homeostasis and cell cycle regulation, two highly interrelated machineries. Here, we used antisense oligonucleotides to investigate the role in the oocyte of stromal interaction molecule (STIM) proteins that are fundamental elements of the store-operated calcium-entry (SOCE) phenomenon, as they are both sensors for Ca^{2+} concentration in the intracellular reservoirs as well as channel-operators in the cell membrane that allow Ca^{2+} influx. Endogenous STIM1 and STIM2 expression was demonstrated, and their synthesis was knocked down 48-72 h after injecting oocytes with specific antisense sequences. Selective elimination of their mRNA and protein expression was confirmed by PCR and Western blot analysis, and we then evaluated the effect of their absence on two endogenous responses: the opening of SOC channels elicited by G protein-coupled receptor (GPCR)-activated Ca^{2+} release, and the process of maturation stimulated by progesterone. Activation of SOC channels was monitored electrically by measuring the T_{in} response, a Ca^{2+} -influx-dependent Cl^- current, while maturation was assessed by germinal vesicle breakdown (GVBD) scoring and electrophysiology. It was found that STIM2, but not STIM1, was essential in both responses, and T_{in} currents and GVBD were strongly reduced or eliminated in cells devoid of STIM2; STIM1 knockdown had no effect on the maturation process, but it reduced the T_{in} response by 15 to 70%, depending on which GPCR was stimulated. Thus, the endogenous SOCE response in *Xenopus*

oocytes depended mainly on STIM2, and its expression was necessary for entry into meiosis induced by progesterone.

Índice

Resumen	I
Summary	III
Índice	V
Abreviaturas	1
1. Introducción	2
1.1 Incremento intracelular de Ca ²⁺	3
1.2 SOCE	6
1.3 STIM	8
1.3.1 STIM1	10
1.3.2 STIM 2	12
1.4 SOCE y la Maduración del ovocito de <i>Xenopus</i>	17
2. Antecedentes	20
3. Justificación	22
4. Hipótesis	24
5. Objetivo general	25
6. Materiales y métodos	26
6.1 Preparación celular	26
6.2 Expresión de receptores purinérgicos o muscarínicos y el uso de oligonucleótidos antisentido en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	27
6.3 Análisis electrofisiológico	29
6.4 Transcripción reversa y PCR	30
6.5 Western blot	31
6.6 Ensayos de maduración	33
6.7 Substancias	34
6.8 Análisis estadístico	34
7. Resultados	35
7.1 Expresión endógena de STIM1 Y STIM2 en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	35
7.2 Decremento en los niveles de expresión de STIM1 y STIM2 por la inyección de secuencias antisentido de STIM en ovocitos co-expresando GPCR	39
7.3 El silenciamiento de las proteínas STIM no afecta la generación de las corrientes oscilatorias de Cl ⁻ activadas por agonistas	42
7.4 Participación diferencial de STIM1 en la generación de T_{in} , dependiente del GPCR involucrado	44
7.5 El silenciamiento de STIM2 inhibe la generación de la corriente T_{in}	49
7.6 El anticuerpo COOH-STIM2 incrementa la amplitud de la respuesta T_{in}	52
7.7 Sobre el papel de STIM1 y STIM2 durante la estimulación prolongada del receptor	54
7.8 Proceso de maduración y proteínas STIM	57
8. Discusión	60
9. Conclusiones	67
Bibliografía	68
Índice de figuras	78

Abreviaturas

ACh: Acetilcolina

as-Cx38: oligonucleótido antisentido para Cx38

as-STIM1: oligonucleótido antisentido para STIM1

as-STIM2 : oligonucleótido antisentido para STIM2

APY: Apirasa

ATP: Adenosín trifosfato

Cx38: conexina 38

GPCR: Receptor acoplado a proteína G

GVBD: Ruptura de la vesícula germinal

LPAR: Receptor de Ácido lisofosfatídico

M1: Receptor colinérgico M1

P2Y8: Receptor purinérgico acoplado a proteína G Y8

P2Y2: Receptor purinérgico acoplado a proteína G Y2

RE: Retículo Endoplásmico

RS: Retículo Sarcoplásmico

SFB: Suero fetal bovino

STIM 1: Proteína de interacción estromal 1

STIM 2: Proteína de interacción estromal 2

T_{in} : Corriente transitoria de entrada

1. Introducción

El Ca^{2+} es un ión altamente versátil en la señalización intracelular capaz de regular diversas funciones celulares. Esta versatilidad del Ca^{2+} se debe a que el sistema de señalización opera a través de diferentes vías para regular procesos celulares que pueden ser estimulados simultánea o paralelamente. Por ejemplo, el incremento local de Ca^{2+} en la presinapsis puede inducir la exocitosis de neurotransmisores en cuestión de milisegundos, en tanto que en cuestión de minutos u horas puede inducir la transcripción de genes o la proliferación celular (Berridge et al. 2003). Durante todo momento, el nivel de Ca^{2+} intracelular está determinado por el balance de los mecanismos que activan la entrada de Ca^{2+} al citoplasma y los mecanismos que inactivan dicha entrada. Durante su entrada el Ca^{2+} se une a sus efectores, los cuales son responsables de la estimulación de numerosos sistemas de señalización. Los componentes de los sistemas de señalización presentan una diversidad de propiedades lo cual expande la versatilidad del sistema (Berridge et al. 2003) (ilustración 1). El Ca^{2+} como mensajero intracelular depende de sus características espaciales y temporales. Su temporalidad se basa en el hecho de que las señales de Ca^{2+} se liberan de forma transitoria y frecuentemente se organizan en oscilaciones regulares. La frecuencia de las repeticiones transitorias pueden ser variable, permitiendo la codificación de información para regular procesos celulares. La organización espacial de Ca^{2+} en distintos microdominios es otra forma de potenciar la versatilidad de la señalización de dicho ión con el fin de regular procesos en regiones localizadas puntualmente en la célula (Berridge 2006).

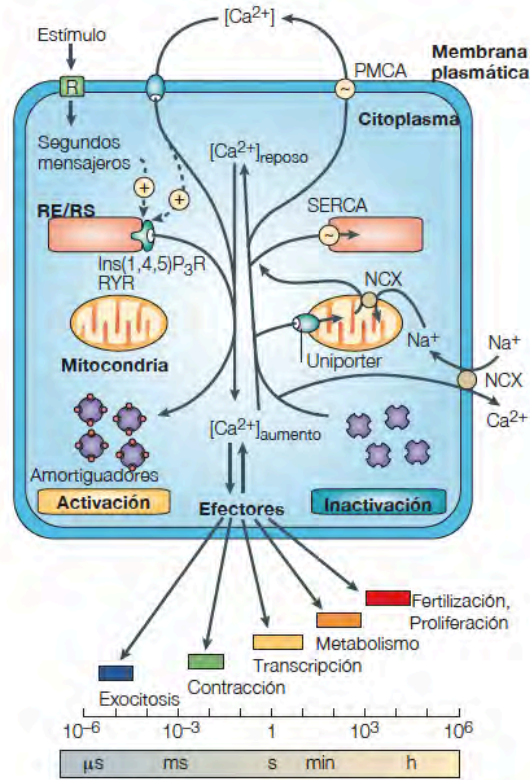


Ilustración 1. Sistema de señalización de Ca^{2+} . Durante aumento del ión, el estímulo incluye tanto la entrada externa como la formación de segundos mensajeros que inducen liberación de Ca^{2+} desde reservorios tales como el retículo endoplásmico y el retículo sarcoplásmico. Gran parte de estos iones (en color rojo) se unen a amortiguadores, y otros a sus efectores que activan diversos procesos celulares, los cuales operan en un amplio espectro temporal y de afinidad. Durante la inactivación del sistema, el Ca^{2+} se desacopla de los efectores y amortiguadores y es exteriorizado a través de intercambiadores y bombas, tales como el intercambiador de Na^+/Ca^{2+} (NCX) y la ATPasa de Ca^{2+} (PMCA) o se transporta en la membrana o (SERCA) en retículos. (Modificado de Berridge et al. 2003).

1.1 Incremento intracelular de Ca^{2+}

Existen dos mecanismos principales capaces de incrementar los niveles intracelulares de Ca^{2+} citoplásmico: 1) La liberación desde reservorios intracelulares de Ca^{2+} tales como el retículo endoplásmico (RE) y, 2) El influjo de

este catión a través de la membrana plasmática utilizando proteínas de membrana como canales o transportadores (Berridge et al. 2000).

Un mecanismo utilizado por las células para el incremento de calcio citoplásmico, es la vía mediada por la estimulación de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), que activan la vía de la fosfolípasa C (PLC) y la producción de inositol trifosfato (IP_3). El IP_3 aumenta los niveles de Ca^{2+} libre en el citosol a través de la unión a su receptor-canal localizado en la membrana del RE, promoviendo la apertura del canal del receptor a IP_3 y dando como resultado el eflujo de Ca^{2+} desde el RE hacia el citoplasma (Clapham 1995). En la mayoría de las células, la liberación de calcio intracelular activado por metabolismo de los fosfoinosítidos es seguido por una entrada capacitativa de calcio (Putney 1986; Berridge MJ 1995). En 1986 J. W. Putney nombró como entrada capacitativa de calcio al modelo según el cual el grado de vaciado o llenado de los reservorios regula la apertura o cierre de los canales en la membrana plasmática. Las corrientes eléctricas que corresponden a este tipo de influjo de calcio fueron caracterizadas inicialmente en mastocitos y linfocitos. Dicha corriente ha sido denominada I_{CRAC} (calcium release-activated calcium current), por su principal característica de por que se activa por la liberación de Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares a través de varios mecanismos, tales como: la liberación fisiológica de calcio por IP_3 , el vaciado farmacológico de los reservorios intracelulares o la inhibición de la ATPasa del retículo endoplásmico, (Hoth & Penner 1992; Parekh & Penner 1997). Estos canales permeables a Ca^{2+} operados por reservorios intracelulares (SOC, por sus siglas en inglés store-

operated Ca^{2+} channel), se activan cuando los reservorios de Ca^{2+} , especialmente el RE, se vacían o disminuyen su concentración en el lumen; la entrada de calcio por los canales SOC se denomina SOCE (store-operated Ca^{2+} entry) (Parekh 2005) (ilustración 2). Otro fenómeno de influjo para este catión, que no involucra vaciado de los reservorios, corresponde a la vía conocida como entrada de Ca^{2+} dependiente de receptor (ROCE, receptor-operated Ca^{2+} entry). SOCE y ROCE poseen características biofísicas y farmacológicas distintivas, por ejemplo, los canales de SOCE son muy selectivos a Ca^{2+} . En cambio, los canales ROCE presentan una selectividad menor a Ca^{2+} , y en algunos casos son canales catiónicos inespecíficos (Yao & Tsien 1997; Parekh 2005; Liao et al. 2008). Otra característica importante es que las vías del tipo ROCE parecen ser insensibles a Gd^{3+} en el rango μM (0.5 – 1 μM), esta característica ha sido utilizada en estudios que tratan de definir los determinantes moleculares de los canales en cada mecanismo (Yao & Tsien 1997; Parekh 2005; Liao et al. 2008; Liao et al. 2009).

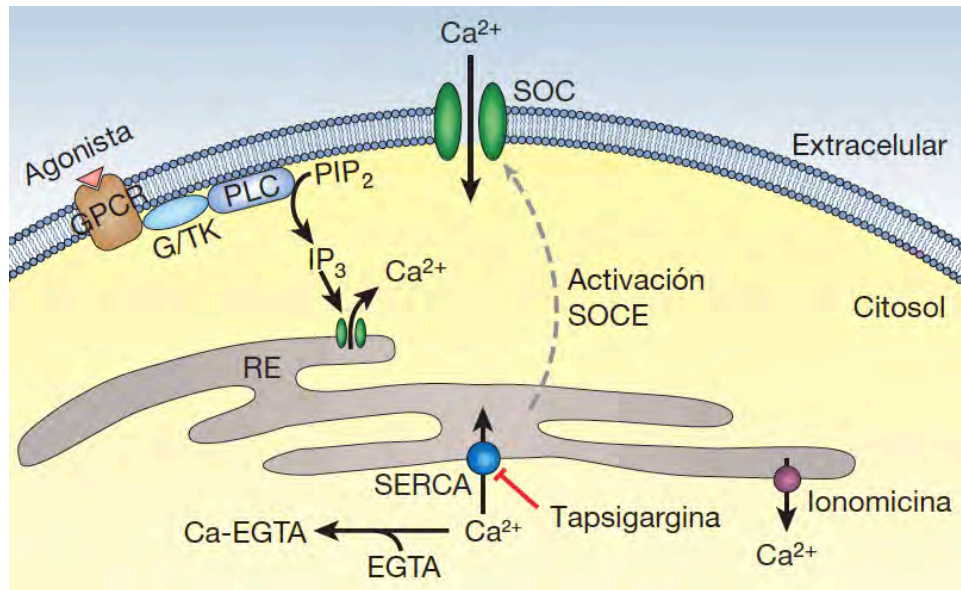


Ilustración 2. Activación de SOCE. La unión del agonista a los GPCR, activa la vía de PLC tras la activación de proteína G. La PLC hidroliza PIP_2 en la membrana plasmática generando IP_3 , el cual activa la liberación de Ca^{2+} a través de los receptores de IP_3 . La disminución de $[Ca^{2+}]$ en el RE activa el sistema de apertura de los canales SOC lo que permite la activación de SOCE. (Modificado de Lewis 2007).

1.2 SOCE

El término SOCE fue propuesto en 1976 por James Putney, quien sugirió un influjo de Ca^{2+} activado por la disminución de este catión en reservorios intracelulares en las células acinares (Putney 1976). El bloqueo del relleno de reservorios intracelulares con el uso de inhibidores de SERCA (sarcoplasmic and endoplasmic reticulum calcium ATPase), en particular la tapsigargina, apoyaron fuertemente la propuesta de Putney; evidenciando que el boqueo del mecanismo de relleno en el RE, activaba un influjo de Ca^{2+} desde el medio extracelular (Putney & Bird 1993) (ilustración 2). Posteriormente, técnicas electrofisiológicas permitieron la identificación y caracterización de la corriente acarreada durante

SOCE, la llamada CRAC, en mastocitos (Hoth & Penner 1992) y células T Jurkat (Lewis & Cahalan 1989; Zweifach & Lewis 1993) que es hasta ahora la corriente SOCE más estudiada. La activación de la corriente CRAC (I_{CRAC}), es fundamental para la respuesta de las células T al antígeno (Liou et al. 2005; Feske et al. 2005), así como para la proliferación y la secreción de citosinas (Lewis 2001).

Los primeros experimentos clave sobre la maquinaria molecular de SOCE fueron los de tamizaje con RNA de interferencia, en células S2 de *Drosophila* o células HeLa en los cuales se pudo identificar a STIM (stromal interaction molecule; conocida anteriormente como olf186-F) como la molécula que participa como intermediaria entre el vaciado de los reservorios intracelulares y la activación de los canales SOCE en la membrana celular (Roos et al. 2005; Liou et al. 2005). La proteína STIM funciona como un sensor de calcio en la membrana del RE, al disminuir los niveles de Ca^{2+} en el lumen del RE, STIM se oligomeriza y forma agregados en regiones cercanas a la membrana plasmática (Liou et al. 2005; Roos et al. 2005). STIM generalmente se localiza en la membrana del RE, sin embargo, se ha reportado que hasta 25% del subtipo STIM1 se encuentra en la membrana plasmática de algunos tipos celulares. Actualmente en mamíferos se conocen dos proteínas llamadas STIM1 y 2 (Frischauf et al. 2008; Cahalan 2009). La co-expresión de ambas proteínas de STIM parece depender del tipo y tejido celular, por ejemplo STIM1 es más abundante que STIM2 en plaquetas y otras células del sistema inmune, en

contraste STIM1 es menos abundante en células de músculo esquelético o riñón (Berna-Erro et al. 2012; López et al. 2012).

También se han identificado las subunidades que conforman el canal SOC o CRAC capaces de generar la I_{CRAC} o SOCE conocidos como Orai (anteriormente llamadas CRACM) (Feske et al. 2006; Vig et al. 2006). Hasta ahora se han identificado en mamíferos 3 proteínas homólogas, llamadas Orai 1, 2 y 3. Durante la generación de SOCE, STIM actúa como un sensor de los niveles de Ca^{2+} en el RE y también como activador del canal de Ca^{2+} en la membrana plasmática que está formado por 6 subunidades de Orai. Estructuralmente Orai no presenta homología con otros canales iónicos y ha mostrado alta selectividad a Ca^{2+} , lo que le permite mediar la homeostasis de este catión a corto plazo y las señales desencadenadas por este mismo catión a largo plazo, recientemente se determinó su estructura cristalográfica (Vig et al. 2006; Rothberg et al. 2013).

1.3 STIM

STIM forma parte del elaborado sistema de señalización de Ca^{2+} en las células eucariotas. STIM se identificó por primera vez en un tamizaje basado en su habilidad de unir a los pre-linfocitos B a las células estromales, de ahí su nombre inicial SIM (stromal interacting molecule) (Oritani & Kincade 1996), el cual cambió tras la descripción de su capacidad de estimular el influjo de calcio a STIM o GOK (Parker et al. 1996). STIM es una proteína de un solo pase transmembranal que atraviesa la membrana del RE, con su amino terminal dispuesto en el lumen del RE y su carboxilo terminal dispuesto hacia el

citoplasma. En su amino terminal tiene un dominio SAM (steril alpha-motif) y un dominio estructural EF (hélix-loop-helix) característico de las proteínas que se unen a calcio. Durante la oligomerización de STIM1 la región de la proteína llamado SAM es determinante, ya que mutaciones puntuales en esta región han mostrado una disminución de la habilidad para formar las regiones de unión a los canales SOC (Baba et al. 2006) (ilustración 3).

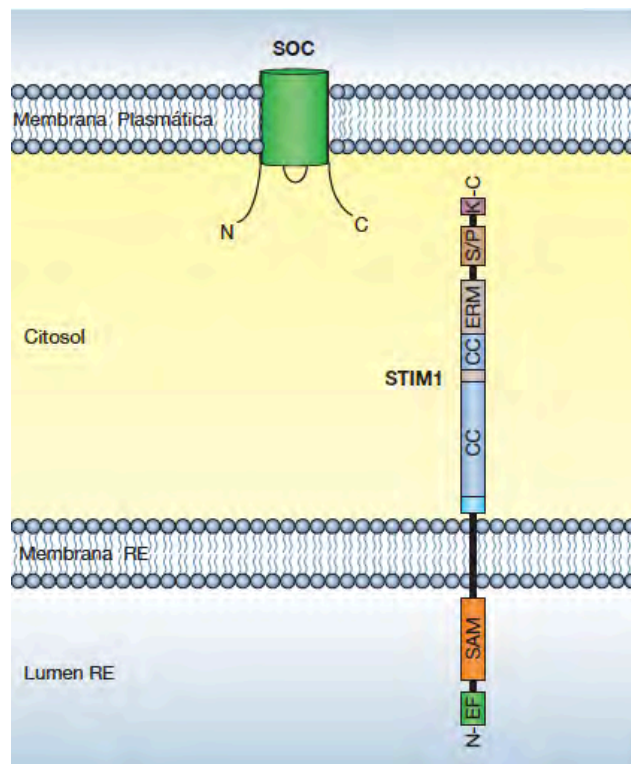


Ilustración 3. Estructura y función de STIM. Las moléculas de STIM principalmente se localizan en la membrana del RE. En la molécula de STIM1, se muestran los dominios EF y SAM en el lumen del RE y, del lado citoplásmico se observan otros dominios como CC; ERM, S/P y el dominio rico en lisina (K). En la membrana plasmática se localizan los canales SOC u Orai, que al ser activados por STIM1 permiten el influjo de Ca^{2+} . (Modificado de Lewis 2007).

En el extremo carboxilo hay dos dominios tipo CC (coiled-coil) con una región ERM (ezrin/radixin/moesin) que participan en la unión de membranas con filamentos de actina, una región variable entre especies rica en prolina-lisina y una región SOAR/CAD que específicamente permite la asociación con las subunidades de Orai (Cahalan 2009; Frischauf et al. 2008; Berna-Erro et al. 2012) (ilustración 3).

El mecanismo de activación de SOCE depende de la oligomerización de moléculas de STIM y su translocación hacia sitios delimitados del RE que son movilizados a una distancia de 10 a 25 nm de la membrana plasmática. Dicha oligomerización comienza cuando la concentración de Ca^{2+} en el lumen del RE disminuye a niveles cercanos o por debajo de 300 μM , valor cercano a la afinidad del sitio EF de STIM1 (Frischauf et al. 2008; Cahalan 2009), (ilustración 4).

1.3.1 STIM1

Como se mencionó anteriormente STIM se localiza principalmente en la membrana del RE aunque se ha reportado en menor densidad en la membrana de otros reservorios e incluso en la membrana plasmática, de manera específica en balsas lipídicas de la membrana (Soboloff et al. 2006; Spassova et al. 2006; Pani et al. 2008; Pani et al. 2009; Dionisio et al. 2011). Se ha sugerido que el dominio EF de STIM1 en la membrana plasmática se encuentra dispuesto hacia el lado extracelular y podría funcionar como un sensor de la concentración extracelular de Ca^{2+} (Spassova et al. 2006; Dionisio et al. 2011). En sistemas de

expresión exógena STIM1 interacciona directamente con las subunidades Orai 1-3 y es capaz de generar el influjo de calcio por lo que se ha denominado como “la unidad elemental” de la generación de SOCE (Cahalan 2009; Berna-Erro et al. 2012) (ilustración 4). Entre las evidencias experimentales que demuestran esta interacción directa se encuentran la co-inmunoprecipitación y estudios de FRET (fluorescence resonance energy transfer) que permite determinar interacciones moleculares en el rango nanométrico. La región del carboxilo terminal de STIM1 de aproximadamente 100 aminoácidos ha mostrado ser esencial para dicha interacción STIM1-Orai, ya que la expresión de esta secuencia parcial es suficiente para activar las corrientes tipo CRAC (Cahalan 2009).

También se ha observado que esta interacción STIM1-Orai promueve la inhibición de canales dependientes de voltaje como $Ca_v1.2$, promoviendo su internalización prolongada (Park et al. 2009). Así mismo, se ha mostrado que carboxilo terminal de STIM1 puede activar a canales tipo TRPC generando la hipótesis de la heteromerización de TRPC y Orai a través de STIM (Yuan JP, Zeng W, Huang GN, Worley PF 2007; Huang et al. 2006; Galán et al. 2009; Horinouchi et al. 2012).

1.3.2 STIM 2

La función celular de esta isoforma no se conoce ya que hasta ahora la mayoría de los estudios se han enfocado a STIM1. STIM2 es una proteína transmembranal tipo I de 833 residuos (105-115 KDa); en humanos su gen (hSTIM2) se identificó en 2001 (Williams et al. 2001).

STIM2 al igual que STIM1, se encuentra en la membrana del RE y también ha sido identificada en otros orgánulos ácidos (Zbidi et al. 2011). A diferencia de STIM1, STIM2 nunca se ha reportado en membrana plasmática, pero se ha sugerido que una pre-proteína de STIM2 se puede acumular en el citoplasma en la cara interna de la membrana plasmática (Graham et al. 2011). Además, se piensa que los genes de STIM evolucionaron de un mismo gen de un eucariota multicelular inferior ya que la organización genómica de homólogos de STIM1 como D-Stim en *D. Melanogaster* es muy similar (López et al. 2012). Aunque STIM2 es 148 residuos más grande que STIM1, ambas proteínas poseen una secuencia y arquitectura similar (Graham et al. 2011). La región N-terminal de STIM2 muestra 66% de homología con STIM1 y posee motivos EF que sensan la concentración del Ca^{2+} , así como la secuencia SAM que permite interacciones proteína-proteína (Qiao & Bowie 2005). En cambio en el C-terminal, el cual participa en las interacciones con los canales Orai (Cahalan 2009), muestra divergencia en la secuencia lo que sugiere diferencias funcionales entre ambas isoformas, aunque STIM2 mantiene los dominios como ERM y los segmentos CC que median la homo o la heterodimerización de esta proteína (Williams et al. 2001; Huang et al. 2006; Parry et al. 2008; Baba et al.

2006). Adyacente a esta región STIM2 posee un dominio rico en prolina e histidina cuya función es hasta ahora desconocida, finalmente un dominio rico en lisina (K) que se cree puede tener una función homóloga a la que presenta en STIM1, que es interactuar con la calmodulina (CaM) de alta o baja afinidad en presencia o ausencia de Ca^{2+} , respectivamente, lo cual provoca la inhibición de la interacción con canales Orai o TRPC1 (Williams et al. 2001; Huang et al. 2006; Bauer et al. 2008; Parvez et al. 2008).

STIM2 se expresa de forma ubicua siendo su expresión la dominante en algunos tejidos como cerebro, particularmente en hipocampo, cerebelo, corteza, tálamo y amígdala (Skibinska-Kijek et al. 2009); entre otros órganos que presentan expresión de STIM2 encontramos: páncreas, placenta, corazón, músculo esquelético, riñón, plaquetas, epitelio de pigmento retinal y epitelio de glándulas mamarias (Berna-Erro et al. 2012; López et al. 2012).

Sus propiedades moleculares son poco comprendidas y su mecanismo de acción principalmente son inferencias de estudios sobre STIM1; el motivo EF de ambas proteínas STIM muestra una afinidad similar por Ca^{2+} (K_d STIM2 \approx 0.5 mM, STIM1 \approx 0.2 mM – 0.6 mM) de acuerdo a ensayos de unión al catión (Stathopoulos et al. 2008; Zheng et al. 2008). STIM2 puede por lo tanto estar activa en concentraciones altas de Ca^{2+} (0.4 mM), es decir, requiere de decrementos menores en la $[\text{Ca}^{2+}]$ en el RE para su activación, incluso puede estar activa en concentraciones basales de este catión en los reservorios [0.3 a 0.5 mM], entonces STIM2 podría activarse antes que STIM1 tras el decremento del catión en reservorios (Barrero et al. 1997; El Boustany et al. 2010; Yu &

Hinkle 2000). Entonces, a diferencia de STIM1, STIM2 cambia a su forma activa con decrementos menores pues STIM1 requiere de $[Ca^{2+}]$ menores o cercanas a 0.2 mM para su activación (Brandman et al. 2007).

STIM2 puede ser modificada post-traduccionalmente principalmente en la región del péptido señal en la región N-terminal, las consecuencias de estas modificaciones no son muy claras (Williams et al. 2001; Smyth et al. 2009; Graham et al. 2011), no obstante se ha sugerido que una región del péptido señal mas larga (101 residuos más), que los 14 originalmente descritos, genera una pre-proteína de STIM2 que no es dirigida hacia el RE y se acumula en el citoplasma (Graham et al. 2011), esto se ha sugerido como una explicación para la activación del influjo de calcio de forma independiente a los reservorios (Parvez et al. 2008).

A través de co-inmunoprecipitación se ha mostrado la interacción entre las dos proteínas de STIM formando hetero-oligómeros (Williams et al. 2002; Li et al. 2007), lo cual podría ser relevante para la regulación de SOCE (Brandman et al. 2007; Darbellay et al. 2010). A diferencia de STIM1, son poco los estudios sobre la interacción STIM2 y Orai, sin embargo, estudios funcionales han mostrado la interacción de STIM2 a través de su carboxilo terminal con Orai y TRPC1, evidenciando su participación en SOCE (Bandyopadhyay et al. 2010a; Brandman et al. 2007; Parvez et al. 2008; Zbidi et al. 2011).

La función de STIM2 en la generación de SOCE sigue siendo controversial, pero a medida que aumenta el conocimiento acerca de las características específicas sobre esta proteína, es claro que su participación es

mucho más compleja de lo que originalmente se había pensado. Reportes recientes sugieren una función prominente de STIM2 en SOCE en neuronas de ratón (Berna-Erro et al. 2009), HEK293 (El Boustany et al. 2010) o células dendríticas (Bandyopadhyay et al. 2010b); entonces la participación preferencial de una de estas proteínas podría depender del tipo celular, la estequiometría entre estas moléculas o los niveles endógenos de éstas.

Se ha observado especialización de las isoformas de STIM a un nivel molecular dado que STIM1 es capaz de agregarse y activarse más rápido y producir corrientes SOCE transitorias y más grandes, mientras que STIM2 responde de una manera lenta y genera corrientes de menor amplitud pero de manera sostenida. La región amino terminal es capaz de enlentecer el acoplamiento con canales Orai, atenuando la corriente SOCE (Zhou et al. 2009). Una forma de explicar estas diferencias puede ser a través de su estructura, el dominio SAM de STIM2 tiene una función auto-inhibitoria a diferencia de la de STIM1, lo cual le da una mayor estabilidad y menor tendencia a la oligomerización, retardando el desarrollo de SOCE (Zheng et al. 2011). Estos datos sugieren importantes consecuencias funcionales en el influjo de Ca^{2+} activado por STIM2.

Se sabe que STIM2 participa en la regulación de expresión de genes y vías apoptóticas inducidas por condiciones hipotóxicas (Berna-Erro et al. 2009; Müller & Rao 2010; Graham et al. 2011). Además el silenciamiento de STIM2 en mioblastos humanos inhibe su diferenciación indicando su papel en el desarrollo y la especialización celular (Darbellay et al. 2010).

A diferencia de STIM1 los ratones knockdown deficientes de STIM2 se desarrollan normalmente, pero mueren a 4-8 semanas de nacidos dependiendo de la cepa (Berna-Erro et al. 2009; Oh-Hora et al. 2008; Varga-Szabo et al. 2008). Ratones deficientes de STIM2 también han mostrado disfunciones cognitivas dependientes de hipocampo, como la memoria espacial (Berna-Erro et al. 2009), evidenciando su importancia en la modulación en la actividad neuronal.

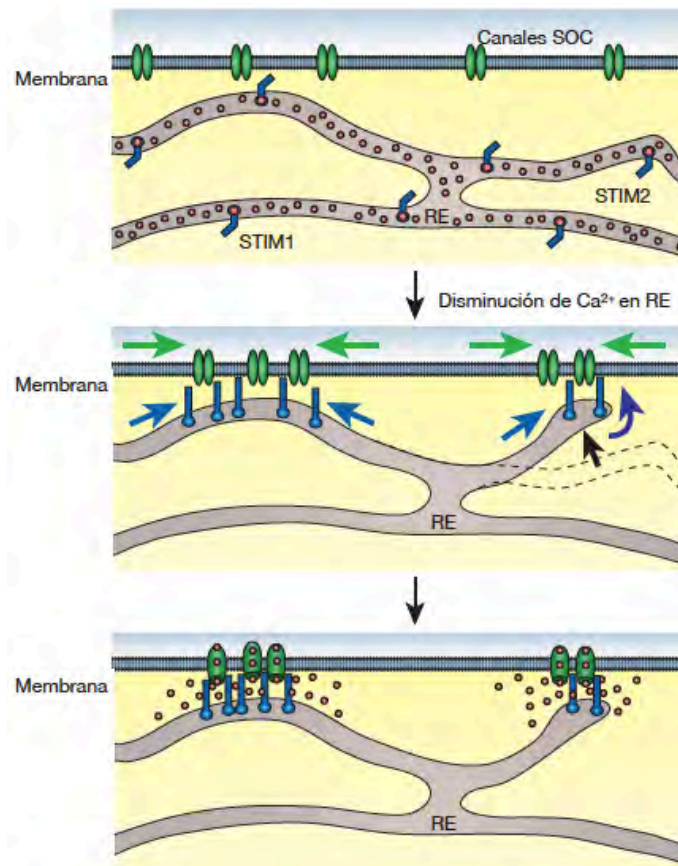


Ilustración 4. Activación del influjo de Ca²⁺. Las unidades funcionales de SOCE se como respuesta a la disminución del Ca²⁺ del RE. En células en reposo (panel superior) los canales SOC y las moléculas de STIM se encuentran dispersos por la membrana plasmática y RE, respectivamente. Con la disminución del Ca²⁺ del RE (panel intermedio) las moléculas de STIM y secciones del RE se reacomodan en puntos yuxtapuestos a la membrana plasmática (flechas negras y azules), en estos puntos de co-localización las moléculas de STIM activan a los canales SOC y se genera el influjo de Ca²⁺ (panel inferior). (Modificado de Lewis 2007).

1.4 SOCE y la Maduración del ovocito de *Xenopus*

El ovocito de *Xenopus laevis* por más de tres décadas ha sido utilizado como un modelo celular para el estudio de la dinámica de Ca^{2+} intracelular. Sus características morfológicas, han generado su uso extensivo como modelo celular en gran variedad de estudios de las moléculas involucradas en dicha dinámica así como los mecanismos que los activan.

El desarrollo de este modelo de expresión heteróloga ha impulsado un gran interés en estudiar las características nativas del modelo, ya que su adecuada comprensión permitirá un análisis más detallado y certero de las moléculas que participan en la dinámica intracelular.

Los ovocitos de *Xenopus* en su estadio VI (Dumont 1978) se encuentran arrestados en la profase de la meiosis I en el ovario; durante el proceso llamado de maduración se lleva a cabo la ruptura de la vesícula germinal (GVBD, germinal vesicle breakdown) completando de esta manera la meiosis I y la generación del cuerpo polar lo que lleva al gameto al arresto en metafase de la segunda división meiótica (MII) (Masui & Clarke 1979).

El proceso de maduración en los ovocitos de *Xenopus* es iniciado por la hormona progesterona, la cual induce la cascada de señalización del factor de promoción de la maduración (MPF), la cual requiere de la activación de algunas cinasas como Mos y MAPK (mitogen-activated protein kinase) entre otras (Sagata 1997). Este factor MPF es un complejo necesario y suficiente para que se lleve a cabo la ruptura de la GVBD, marcando así el inicio del proceso de maduración (Smith 1989; Nebreda & Ferby 2000). Un componente determinante

en este proceso es la maquinaria de regulación de Ca^{2+} citoplásmico; por ejemplo, la fecundación del gameto en *Xenopus* presenta características espaciales y temporales específicas que permiten la activación del huevo y el desarrollo embrionario (Miyazaki 1995; Stricker 1999); el bloqueo de la poliespermia (Kline & Nuccitelli 1985) o la liberación del bloqueo de MII (Meyerhof & Masui 1979).

Dado que SOCE es una vía permeable a Ca^{2+} , y que en células no excitables se ha observado su papel primordial en el influjo de este catión (Parekh & Penner 1997); su estudio en un mecanismo calcio-dependiente como la maduración ha mostrado que SOCE activado por STIM1 se inactiva tras la maduración del ovocito de *Xenopus*, coincidentemente con la aparición de GVBD (Machaca & Haun 2000). Esta inactivación de SOCE y la aparición de GVBD coincide con el incremento de los niveles de MAPK y MPF, siendo este último el factor determinante para la inactivación de SOCE, únicamente cuando SOCE no se encuentra pre-activada (Machaca & Haun 2002). Dicha observación sobre el estado de activación de SOCE antes del efecto inhibitorio de MPF sugiere que la inhibición es en realidad sobre el acoplamiento de la maquinaria SOCE y no directamente sobre el canal (Machaca & Haun 2002). Sin embargo, la regulación de la $[\text{Ca}^{2+}]$ citoplásmico en el proceso de maduración ha mostrado tener un efecto dual, por ejemplo no es indispensable para el inicio de la meiosis o la GVBD, de hecho su ausencia parece facilitar la entrada a la fase de meiosis, en cambio, el incremento citoplásmico de Ca^{2+} si es indispensable para la finalización de la meiosis (Sun & Machaca 2004). Estos datos sugieren que la

señalización de Ca^{2+} regula la temporalidad de la meiosis, desde el inicio hasta su culminación.

2. Antecedentes

La activación de receptores específicos a serotonina, glutamato o acetilcolina expresados en la membrana de los ovocitos de *Xenopus*, propicia que pulsos hiperpolarizantes generen una corriente entrante transitoria llama T_{in} (Parker et al. 1985). Esta corriente se debe principalmente al eflujo de iones Cl^- a través de canales que dependen del influjo de Ca^{2+} (Miledi 1982), dado que la remoción del Ca^{2+} del medio extracelular elimina la respuesta, y ésta es además bloqueada por la aplicación extracelular de iones divalentes como Mn^{2+} , Co^{2+} o lantánidos, bloqueadores inespecíficos de vías de permeabilidad a Ca^{2+} . Una de las características de esta corriente es que durante el lavado del agonista la amplitud de la corriente T_{in} incrementa, para después decrecer en el rango de varios minutos (Parker et al. 1985).

La expresión heteróloga de una variedad de receptores específicos que se acoplan a la vía endógena de PLC/IP₃ del ovocito de *Xenopus* generan en mayor o menor grado la corriente transitoria T_{in} durante pulsos hiperpolarizantes (Ni 1997), con las mismas características electrofisiológicas de T_{in} , originalmente descritas con la expresión del ARNm de cerebro (Parker et al. 1985). Esto indicaba que la corriente T_{in} se debe inicialmente a la activación de los GPCR (G_q) en particular y no de alguna otra molécula co-expresada como resultado de la inyección de ARNm total de cerebro de rata en el ovocito. De forma más detallada se sabe que la inyección de la subunidad α de la proteína G_q en ovocitos de *Xenopus*, es capaz de generar un influjo de calcio, permitiendo la

activación de la corriente T_{in} , pues la subunidad α fue capaz de activar DAG (diacilglicerol) y esta misma molécula se observó que aparece y desaparece en sincronía con el desarrollo de la corriente transitoria T_{in} , la activación de la vía de DAG puede inducir a la maduración ya que induce la ruptura de la vesícula germinal (Guttridge et al. 1995).

Entonces, la respuesta T_{in} es una corriente de Cl^- que depende de: 1) la activación de alguno de los receptores acoplados a proteína G_q , 2) la activación de una vía permeable a calcio; y 3) un aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} promovido por el influjo de este ión desde el medio extracelular que junto con la liberación de Ca^{2+} a través de los receptores de IP_3 permiten que la $[Ca^{2+}]_i$ aumente a niveles que bloquean el IP_3R permitiendo la inactivación de T_{in} . El eflujo de iones Cl^- se lleva a cabo a través de la apertura de los canales de Cl^- dependientes de Ca^{2+} (CDCC) que se encuentran expresados en una alta densidad en la membrana del ovocito. Para propósitos de este escrito la secuencia de eventos que llevan a la activación de T_{in} la definiremos como: receptor \rightarrow proteína $G \rightarrow$ PLC \rightarrow $IP_3R \rightarrow$ liberación de $Ca^{2+} \rightarrow$ activación de SOCE \rightarrow apertura de CDCC.

3. Justificación

El modelo de ovocito de *Xenopus laevis* ha sido usado como un modelo celular para el estudio de mecanismos responsables de la modulación de las concentraciones citoplásmicas de Ca^{2+} , principalmente a través de la liberación del catión desde reservorios intracelulares (Berridge et al. 2000; Parker & Miledi 1986; Parker & Miledi 1987) y por influjo de Ca^{2+} vía canales dependientes de voltaje de Ca^{2+} o canales operados por reservorios intracelulares SOC (Miledi 1982; Parker & Miledi 1987; Yao & Tsien 1997), como resultado de la estimulación de la liberación de calcio tras la síntesis del IP_3/DAG a través de la activación de la PLC (Hartzell 1996; Parekh 1997; Yao & Tsien 1997).

La liberación de Ca^{2+} desde los reservorios y la activación de SOCE son respuestas comunes en ovocitos de *Xenopus*, este sistema endógenamente expresa los elementos necesarios para activar la vía de PLC después de la estimulación de GPCR (Kusano et al. 1982). Como se mencionó previamente, la vía permeable a Ca^{2+} en las corrientes SOCE generalmente son canales formados por subunidades Orai, activado por la asociación de estos con STIM (Williams et al. 2001). La activación de esta corriente en la membrana del ovocito de *Xenopus* fue detectada por primera vez a través de la respuesta eléctrica llamada T_{in} , la cual se genera tras el influjo de Ca^{2+} a través de los canales SOC (Parker et al. 1985). Durante el incremento de Ca^{2+} citoplásmico como resultado de la apertura de los canales SOC y del incremento de la fuerza electroquímica del catión durante los pulsos hiperpolarizantes (Miledi 1982; Parker & Miledi

1986). Los transcritos endógenos de las diferentes isoformas de Orai y STIM se han identificado (Klein et al. 2002), sin embargo, el papel para cada uno de estos tipos de proteínas en las respuestas endógenas del ovocito no se han estudiado; en general, el papel de los elementos moleculares de SOC tampoco se comprenden a detalle; su estudio podría revelar información relevante sobre los mecanismos moleculares que subyacen a este fenómeno.

4. Hipótesis

En el ovocito de *Xenopus laevis* la corriente transitoria T_{in} y el proceso de maduración requieren del reclutamiento de una o ambas proteínas STIM.

5. Objetivo general

Determinar la participación de STIM1 y STIM2 en la generación de la corriente T_{in} y la maduración del ovocito de *Xenopus laevis*.

6. Materiales y métodos

6.1 Preparación celular

Las ranas *Xenopus laevis* se obtuvieron de Xenopus I (Ann Arbor, Mi, USA). Los lóbulos ováricos (4-8) fueron removidos quirúrgicamente de ranas anestesiadas hipotérmicamente en condiciones estériles, a través de una incisión de 7-10 mm en la región abdominal. Tras la cirugía, las ranas fueron suturadas y colocadas en un estanque individual por 3-7 días para su recuperación. Terminado este periodo se colocaron en grupos más grandes y no se les practicó otra cirugía al menos en dos meses. Los lóbulos ováricos se mantuvieron en solución Barth's normal (BN) que contenía (en mM): 88 NaCl, 1 KCl, 2.4 NaHCO₃, 0.33 Ca(NO₃)₂, 0.41 CaCl₂, 0.82 MgSO₄ y 5 HEPES, c gentamicina 75 µg/ml y ajustada a pH 7.4 (ilustraciones 5 A y B). Los estudios experimentales se llevaron a cabo con ovocitos en estadio VI (Dumont 1972) y fueron defoliculados incubando con colagenasa (0.9 mg/ml) a temperatura ambiente por 30 min en solución Ringer normal (RN, que contenía en mM: 115 NaCl, 2KCl, 1.8 CaCl₂, 5 Hepes, ajustada a pH 7.0). Después de este tratamiento los ovocitos se incubaron a 18 °C en solución BN estéril y los registros electrofisiológicos se realizaron tras un periodo de 2-4 días tanto en ovocitos no inyectados como en aquellos inyectados con ARNm específicos para receptores de membrana y/o con oligonucleótidos antisentido específicos para eliminar distintas proteínas (ilustraciones 5 C y D).

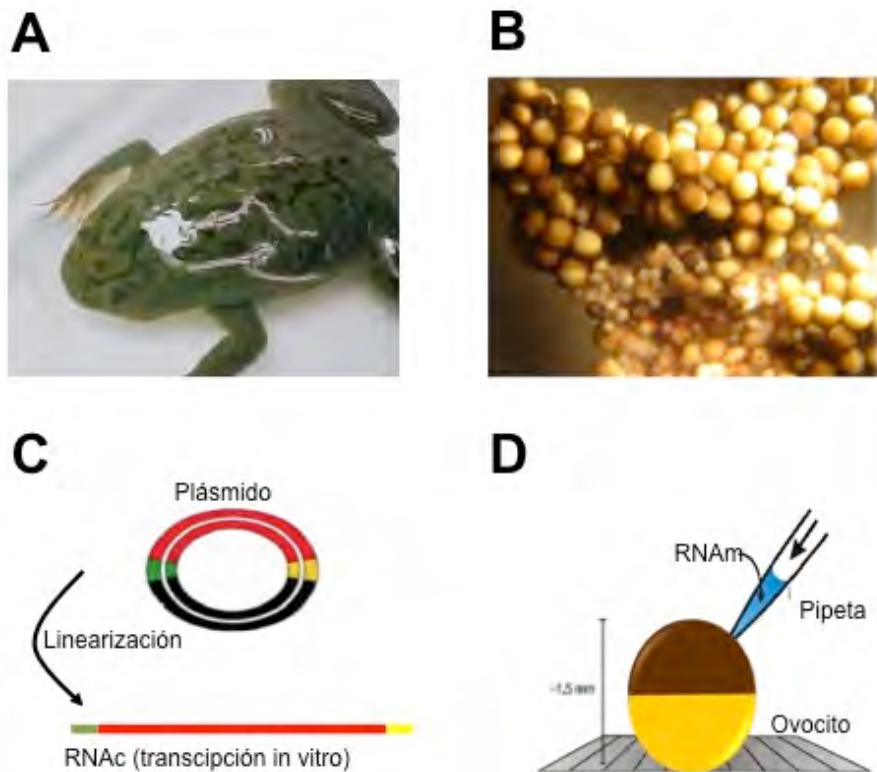


Ilustración 5. Obtención e inyección de ovocitos. A. Rana de *Xenopus laevis* a la cual mediante una pequeña incisión en el abdomen se le extraen los sacos con ovocitos. B. Separación de los ovocitos para su tratamiento en colagenasa y remoción manual de células foliculares. C. Linearización de plásmidos con cada uno de los GPCR para su posterior transcripción in vitro. D. Inyección del ARNm y/u oligonucleótido antisentido.

6.2 Expresión de receptores purinérgicos o muscarínicos y el uso de oligonucleótidos antisentido en ovocitos de *Xenopus laevis*

En la mayoría de los experimentos, 24 horas antes de la defoliculación y con el propósito de expresar receptores de membrana específicos, los ovocitos se inyectaron con 25-50 ng de ARNc [1 ng/nl] de los receptores purinérgicos, P2Y8 (clonado de células foliculares de *X. laevis*), P2Y2 (clonado de *X. tropicalis*), o del receptor muscarínico M1 (clonado de *Homo sapiens*). Los ovocitos de grupos control fueron inyectados con 25-50 nl de H₂O. Los fragmentos amplificados

fueron digeridos con las enzimas de restricción siguientes; NcoI-NotI para P2Y8 y BamHI-NotI para receptores P2Y2 y M1. Todas las secuencias se inertaron en los mismos sitios en pXENEXI diseñados específicamente para la expresión de ARNc en ovocitos de *Xenopus*. El ARNc se sintetizó tras la linearización del plásmido pXENXEI con una de las construcciones anteriormente mencionadas, con las enzimas Sph1 para receptores purinérgicos y HindIII para el muscarínico, (mMessage mMachine, Ambion Austin, TX). La expresión de los transcritos de STIM1, STIM2 y conexina 38 (Cx38) fue eliminada por la inyección de 25-50 ng de oligonucleótidos antisentido con las secuencias siguientes para cada uno de los transcritos antisentido respectivos con las secuencias mostradas en la tabla 1. Después de la inyección, los ovocitos se incubaron a 18 °C en solución BN y su progreso se evaluó electrofisiológicamente por los dos días siguientes. La inyección de oligonucleótidos antisentido en ovocitos ha sido ampliamente utilizada como una técnica eficiente para la transcripción (Hulstrand et al. 2010).

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos antisentido.

	Transcrito	Secuencia 5´- 3´	Nomenclatura
1	<i>stim1</i>	ATAGCAGAGTCCGACACCAAAGCATTCCGC	as-STIM1
2	<i>stim2</i>	TCCTCTTCTTCTTTCTCCCGTTCATGGCTG	as-STIM2
3	<i>cx38</i>	GCTTTAGTAATTCCCATCCTGCCATGTTTC	as-Cx38

6.3 Análisis electrofisiológico

Los registros electrofisiológicos se realizaron a una temperatura ambiente (21 – 24 °C). La corriente de ovocitos se evaluó usando la técnica de control de voltaje con dos electrodos (Miledi 1982). Los electrodos de registro con resistencia de 1-2 M Ω fueron fabricados utilizando capilares de borosilicato (Sutter Instruments) y fueron llenados con una solución 3 M de KCl. Los ovocitos se perfundieron continuamente (10 ml/min) con solución RN en un voltaje de mantenimiento de -10 mV, y fueron estimulados con pulsos de voltaje de 4s a -100 mV aplicados periódicamente cada 40s para activar la corriente T_{in} (ilustración 6), una vez que los ovocitos fueron estimulados con uno de los agonistas durante 120 s.

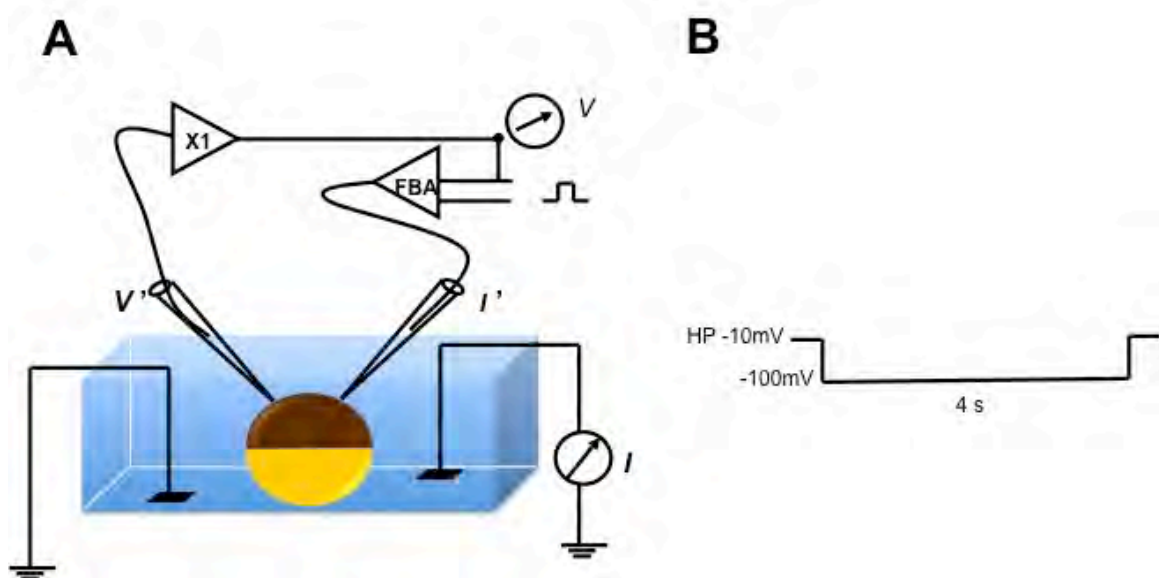


Ilustración 6. Técnica de control de voltaje. A. Esquema de la técnica de control de voltaje en donde V' , es el electrodo de voltaje; X1, es el amplificador; V , es el voltaje de mantenimiento. FBA, es el amplificador de retroalimentación; I' , el electrodo intracelular de corriente; I , el amperímetro que se encuentra en el baño y censa la corriente transmembranal. B. Protocolo de estimulación donde HP, es el potencial de mantenimiento.

Se inyectaron los anticuerpos a los ovocitos con un sistema eyector de aire a presión (20 PSI), ajustando electrónicamente los tiempos necesarios de eyección para cargar los anticuerpos a una concentración final cercana a 1:1000, considerando un volumen del ovocito aproximado de 1 μ l. Las soluciones de inyección fueron preparados en soluciones conteniendo 5 mM Hepes, ajustado a pH 7.0 con KOH.

6.4 Transcripción reversa y PCR

El ARN total de ovocitos se purificó usando los reactivos Trizol (Life Technologies). A partir del ARN obtenido se sintetizó el ADN complementario (ADNc) con la transcriptasa reversa (RT), 2 μ g ARN pre-tratado con DNaseI, 1 μ g oligo (dT), 0.25 μ g oligonucleótidos hexaméricos al azar como cebadores, en un volumen total de 20 μ l. El ADNc se utilizó como templado en las reacciones de PCR donde se utilizaron oligonucleótidos específicos para amplificar fragmentos de ADNc de los transcritos de interés y como control en ARN ribosomal de la proteína S2 (*rps2*). Todos los programas de PCR comenzaron a 95 °C por 2 min y terminaron a 72 °C por 5 minutos. Los 35 ciclos de amplificación consistieron en 45 s a 95 °C, 40 s a 55 °C y 35 s a 72 °C. Las secuencias de oligonucleótidos usadas en este estudio se enlistan en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencias de cebadores para PCR

	Transcrito	Secuencias de cebadores
1	<i>rps2</i>	F: TGGTAACAGGGGAGGTTTCCGC R: ATACCAGCCATCATGAGCAGC
2	<i>stim1</i>	F: CGACGAGTTTCTCAGGGAAG R: CTTTCATGTGGTCCTCGGAGT
3	<i>stim2</i>	F: CCAGCCTTGAGGCAATATGT R: GCAACCTCCAACCTCCGATTA

Los productos amplificados fueron aislados y purificados (QIAEX II, QIAGEN). Clonados en pJet 1.2 vector (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA). Finalmente, las secuencias de nucleótidos fueron confirmadas por secuenciación automática y analizadas en el programa BLAST para corroborar su identidad.

6.5 Western blot

La expresión de proteínas fue evaluada mediante la técnica de Western blot en ovocitos inyectados con los oligonucleótidos antisentido as-STIM1 y as-STIM2. Para cada grupo, 10 ovocitos fueron homogenizados 72 h posteriores a la inyección en un buffer que contenía en mM: 20 Tris-HCl pH 7.6, 1 EDTA pH 8, 80 sacarosa y 1X de complete mini protease inhibitor tablet (Hoffman-La Roche,

Switzerland). Después por centrifugación diferencial a 4 °C; 500 rpm durante 5 min, siguiente 3500 rpm por 10 min y finalmente a 14000 rpm durante 20 min; la pastilla obtenida se resuspendió en buffer que en mM contenía: 50 Tris-HCl pH 7.6, 1 EDTA pH 8, 100 NaCl, 100 MgCl₂ y 1X of complete mini protease inhibitor tablet. La concentración total de proteína se cuantificó por reacción de Bradford. Para la electroforesis, las muestras (1.5 µg por carril) se cargaron y fue fraccionado en un gel 10% de SDS-poliacrilamida y transferida a una membrana de nitrocelulosa (BioRad, Hércules, CA). Las membranas fueron bloqueadas por 1 h a temperatura ambiente en solución salina amortiguadora de Tris y Tween 20 (TBS-T) que contiene en mM: 150 NaCl, 20 Tris, pH 7.4, y 0.1% Tween 20, con 5% de leche seca libre de grasas e incubado posteriormente durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario apropiado en una dilución de (1:1000), el anticuerpo contra la proteína STIM1 el anticuerpo de (Alomone, Jerusalem, Israel, No. de catalogo ACC-063) que reconoce en la parte amino de la proteína, mientras que para la proteína STIM2 se utilizaron 2 diferentes anticuerpos STIM2-NT (que reconoce un sitio cercano al dominio amino) o STIM2-CT (que reconoce un sitio cercano al terminal carboxilo) (ambos de ProSci Inc. Poway, CA, No. de catalogo 4125 y 4123, respectivamente). Como control se utilizó un anticuerpo contra SERCA 2 (Cell Signaling Technology Inc. Danvers, MA, No. de catalogo 4388). Después de la incubación, las membranas fueron lavadas en TBS-T e incubadas por 45 min a temperatura ambiente con anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con enzima HRP (peroxidasa de rábano) (Zymed, Invitrogen Co., Grand Island, NY) diluido en TBS-T (1:10000). Las

proteínas inmunoreactivas fueron detectadas por quimioluminiscencia y los datos fueron analizados con el programa ImageJ (NIH, USA); los resultados se expresan en términos de densidad óptica (unidades arbitrarias) y normalizados con respecto a la condición control. Para analizar los controles de carga, como la detección de SERCA 2, las mismas membranas usadas para detectar las proteínas STIM fueron incubadas por 30 min en solución de lavado (conteniendo en mM: 50 Tris pH 6.8, 100 β -mercapto-ethanol, y 2% SDS) a 55°C, lavadas con TBS-T y nuevamente tratadas con el anticuerpo primario contra SERCA 2 y se procedió con el mismo tratamiento anteriormente descrito.

6.6 Ensayos de maduración

Los ensayos de maduración se realizaron en lotes de 15 a 25 ovocitos, defoliculados previamente incubados en 2 ml de solución BN con 10 μ M de progesterona. La GVBD fue monitoreada por la formación del punto blanco en el polo animal y confirmado al final del experimento cortando los ovocitos a través del ecuador tras la incubación de estos en solución RN caliente por 1 min (Arellano et al. 1995). Los parámetros eléctricos membranales se evaluaron durante la maduración en grupos de ovocitos que fueron inyectados 72 h antes con as-STIM1 o as-STIM2 y comparados con los ovocitos no inyectados o inyectados con H₂O. Las propiedades eléctricas, potencial de membrana de los ovocitos en los diferentes lotes experimentales fueron analizados tras 9-12 h en presencia de la progesterona.

6.7 Substancias

ATP, ACh, Apirasa, colagenasa tipo I, progesterona, SFB y todas las sales fueron adquiridas de Sigma-Aldrich Chemical Co.

6.8 Análisis estadístico

Todos los datos se expresan como la media \pm S.E.M. (error estándar de la mediana) de quince o mas ovocitos por condición de al menos tres donadores diferentes. Las gráficas se realizaron usando el software Igor Pro Wavemetrics, Inc. El análisis estadístico se realizó usando el programa Graphpad Prism 6 con su respectivo análisis de varianza (ANOVA). Los promedios de dos de los grupos se compararon usando la prueba *t* de Student. Las diferencias significativas fueron consideradas significativas con $P < 0.01$.

7. Resultados

7.1 Expresión endógena de STIM1 Y STIM2 en los ovocitos de *Xenopus laevis*

La expresión de los transcritos de ARN para *stim1* y *stim2* se estudió usando la técnica de RT-PCR. Como se muestra en la figura 1, en las muestras de ARN de los ovocitos control (no inyectados), se amplificó para *stim1* un amplicón de 463 pb mientras que, en el caso de *stim2* un fragmento de 494 pb. Ambos fragmentos presentaron el tamaño esperado para el transcrito correspondiente, y los fragmentos fueron clonados en el vector pJET 1.2, secuenciados y analizados en BLAST; las secuencias obtenidas fueron homólogas a lo reportado para *stim1* (99%) de *Xenopus laevis* [GenBank: NM_001097037.1] y para *stim2* (90%) de *Xenopus tropicalis* [GenBank: XM_004916759.1]) el análisis se realizó con 4 diferentes donadores y con 10 ovocitos en cada condición para la obtención del ARN. En todos los ensayos, los controles de amplificación, sin RT o sin molde de ADNc no produjeron producto de PCR alguno (Figura 1). Los grupos de ovocitos inyectados 48-72 h antes con oligonucleótidos antisentido para STIM1 (as-STIM1) o para STIM2 (as-STIM2) mostraron un decremento significativo en el transcrito correspondiente (Figura 1).

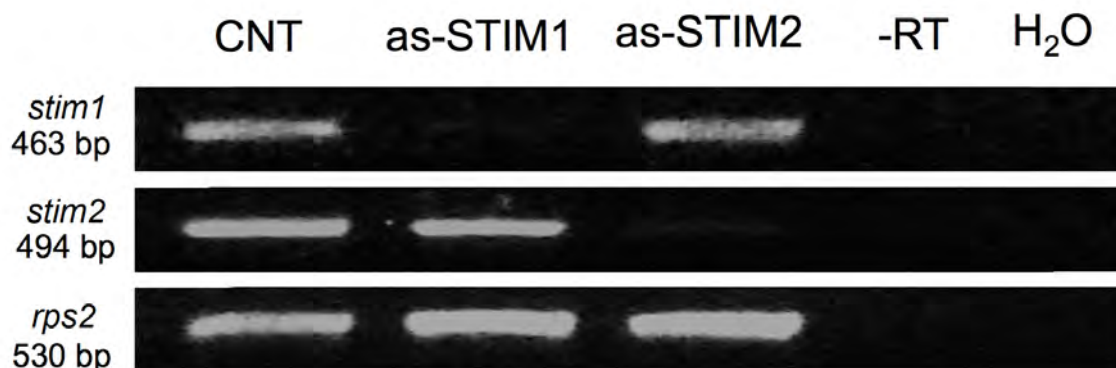


Figura 1. Expresión de los transcritos de STIM y su inhibición por inyección de oligonucleótidos antisentido.

Se muestra un gel representativo de los productos de amplificación por RT-PCR que corresponden al peso esperado para *stim1* y *stim2* en ovocitos nativos o control no inyectados (CNT), los amplicones correspondientes no se observan en los lotes inyectados con as-STIM1 o as-STIM2. El amplicón de *rps2* indica la eficiencia de la reacción, los carriles -RT y H₂O corresponden a los controles negativos con ARN sin reacción RT y producto de RT sin ADNc, respectivamente.

Para determinar si la inyección de oligos antisentido inducía de forma paralela la reducción del nivel proteico de STIM1 y STIM2, estas proteínas fueron detectadas usando la técnica de Western blot con anticuerpos específicos (Figura 2). NH-STIM1 detectó una banda alrededor de 75 KDa, tanto en la preparación de membranas total de ovocitos control (no inyectados) como en la de cerebro de ratón (Figura 2); el peso esperado para esta proteína de acuerdo con estudios anteriores (Galán et al. 2009; López et al. 2006).

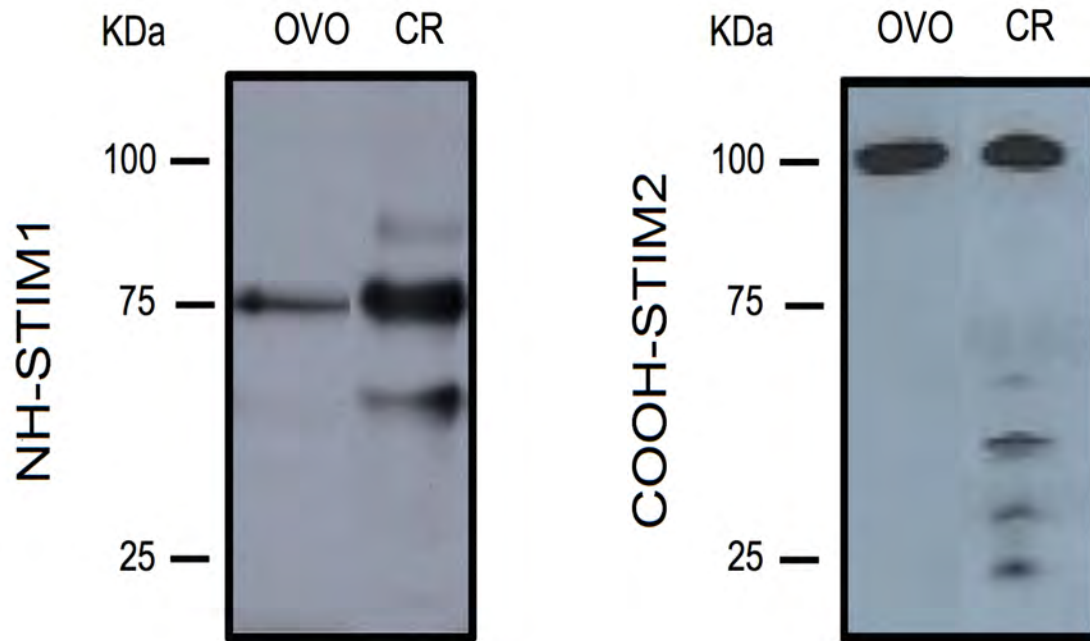


Figura 2. Expresión de proteínas STIM nativas en ovocito de Xenopus. STIM1 y STIM2 fueron detectados por análisis de Western blot en extractos de membrana total de ovocitos nativos (n=10) o proteína total de cerebro de ratón (CR), usando anticuerpos específicos NH-STIM1 (panel izquierdo) o COOH-STIM2 (panel derecho).

Varios grupos de ovocitos que se inyectaron con as-STIM1 se procesaron en WB para comparar la expresión endógena de STIM1 con respecto a los ovocitos control no inyectados, como se observa en la figura 3. Los resultados muestran que los grupos inyectados con el oligonucleótidos antisentido tuvieron un decremento significativo de STIM1, con respecto al grupo control.

De forma similar la proteína STIM2, se detectó con dos anticuerpos, el COOH-STIM2 y el NH-STIM2 (Figuras 2 y 3) en membranas totales de ovocitos control (no inyectados). Ambos anticuerpos revelaron a STIM2 como una banda de alrededor de 100 kDa, dato que concuerda con reportes previos (Brandman

et al. 2007; Song et al. 2011). Como control positivo, se usó una preparación de membrana total de cerebro de ratón en paralelo con la de ovocitos control (no inyectados) con COOH-STIM2, ambas preparaciones mostraron una banda cercana a los 100 kDa (Figura 2). Además, la figura 3 ilustra los resultados del Western blot en ovocitos inyectados con as-STIM2, que después de 48-72 h de su inyección, se produjo una disminución significativa en los niveles de expresión de STIM2 en comparación con los controles.

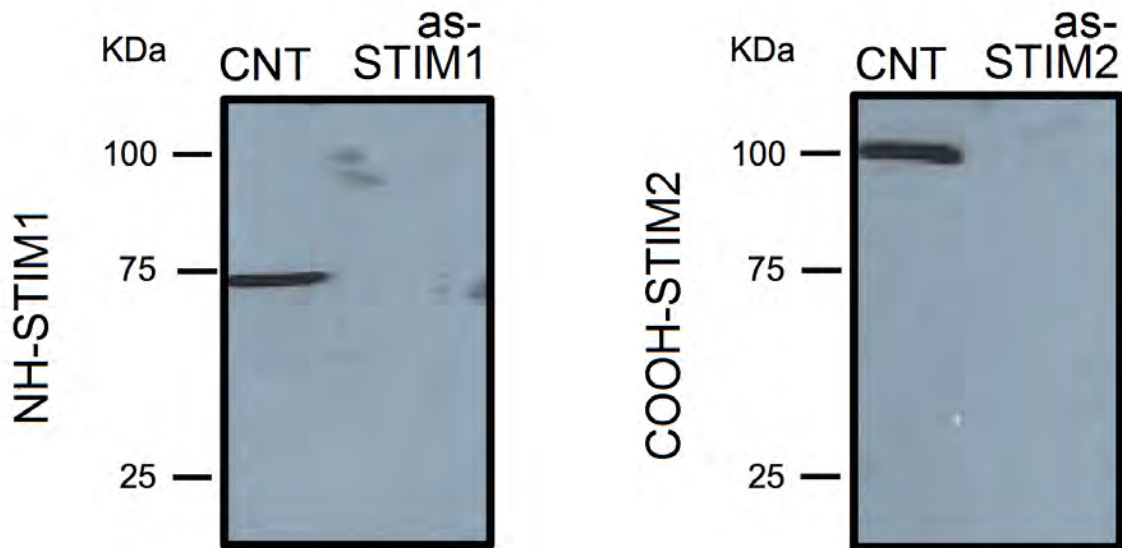


Figura 3. Regulación de la expresión de las proteínas STIM por inyección de oligonucleótidos antisentido. Un análisis similar a la figura 2 se llevo a cabo en lotes de ovocitos (n=10) inyectados con H₂O como control (CNT), o con oligos as-STIM1 o as-STIM2; después de 48 – 72 hrs.

Estos resultados muestran que las secuencias de oligonucleótidos antisentido utilizados resultan en un decremento específico y efectivo de transcritos endógenos para *stim1* y *stim2*, así como una disminución robusta de los niveles de STIM1 y STIM2, proteínas que fueron detectadas como las

principales bandas y presentan un peso similar al observado en cerebro de mamíferos.

7.2 Decremento en los niveles de expresión de STIM1 y STIM2 por la inyección de secuencias antisentido de STIM en ovocitos co-expresando GPCR

La mayoría de los experimentos siguientes fueron realizados con ovocitos expresando de forma heteróloga receptores muscarínicos o purinérgicos, dependiendo del ARNc inyectado; y evaluar si la expresión de estos receptores GPCR afectaba o no, la expresión de los STIM endógenos, con el propósito de determinar los efectos de la inyección de los oligonucleótidos antisentido as-STIM y la disminución de las proteínas correspondientes. Después de 72 h de la inyección de ARNc para cada uno de los GPCR, los ovocitos mostraron corrientes robustas en presencia de sus agonistas respectivos (ver adelante); la expresión de GPCR no afecta los niveles de expresión de los transcritos *stim1* y *stim2* tal como se ilustra en la figura 4. Además, el decremento en la expresión de *stim1* y *stim2* por la inyección de oligos antisentido no fue alterada en ovocitos co-inyectados con M1 o P2Y8 ARNc (figura 4).

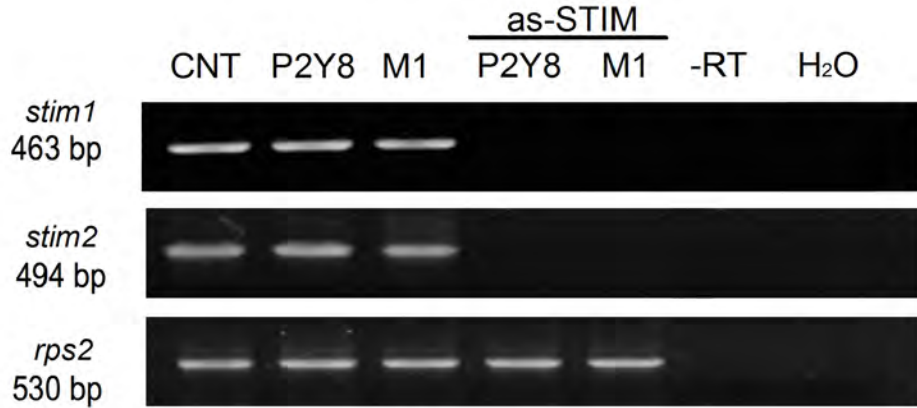


Figura 4. Transcritos de STIM en ovocitos co-inyectados con ARNm de GPCR. Gel representativo de la amplificación de *stim1*, *stim2* y *rps2* en lotes de ovocitos (n=10) inyectados con agua (CNT) o con ARNc (50ng por ovocito) junto con ARNc de receptores P2Y8 o M1. Después de 48 – 72 hrs de la inyección.

Consistente con este resultado, la eliminación de las proteínas de STIM1 o STIM2 no fue afectada por la co-inyección de los as-STIM junto con el ARNc de uno de los GPCR, como se observa en la figura 5. En todos los casos SERCA 2 (114 KDa) se usó como control experimental (Figura 5).

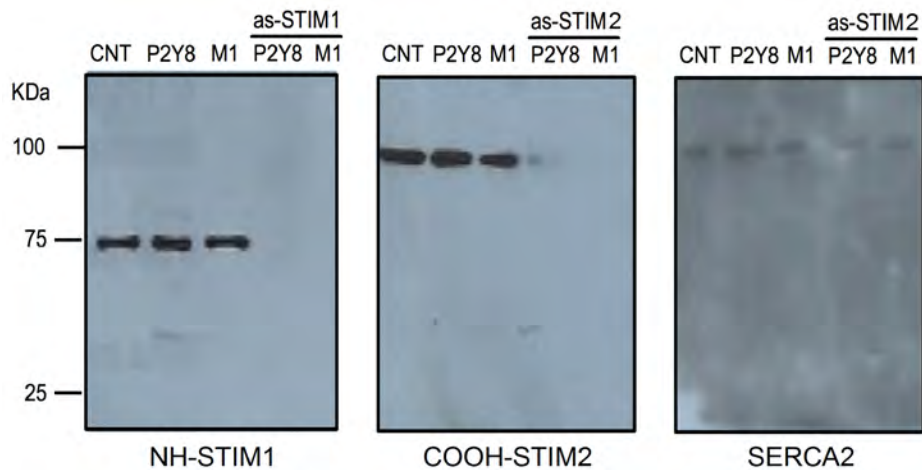


Figura 5. Silenciamiento de las proteínas STIM no sufre cambio por co-inyección de oligos antisentido con ARNc GPCR. Ilustra grupos de ovocitos similares a los utilizados en la figura 4 utilizados para ensayos de Western blot. Ovocitos del mismo donador fueron inyectados con ARNm de un GPCR solo o en conjunto con as-STIM1 o as-STIM2. Identificando con anticuerpos específicos NH-STIM1 o COOH-STIM2. SERCA fue utilizada como control de carga del gel.

Los resultados para las condiciones descritas anteriormente se resumen en la figura 6, la cual muestra la expresión de STIM 1 y 2 tanto a nivel transcrito (PCR) como proteico (WB), para los grupos de ovocitos expresando o no los GPCR exógenos. Estos resultados confirman que los oligonucleótidos antisentido eliminan los STIM endógenos en el ovocito de manera específica y efectiva sin que la expresión de GPCR exógenos altere su eficacia.

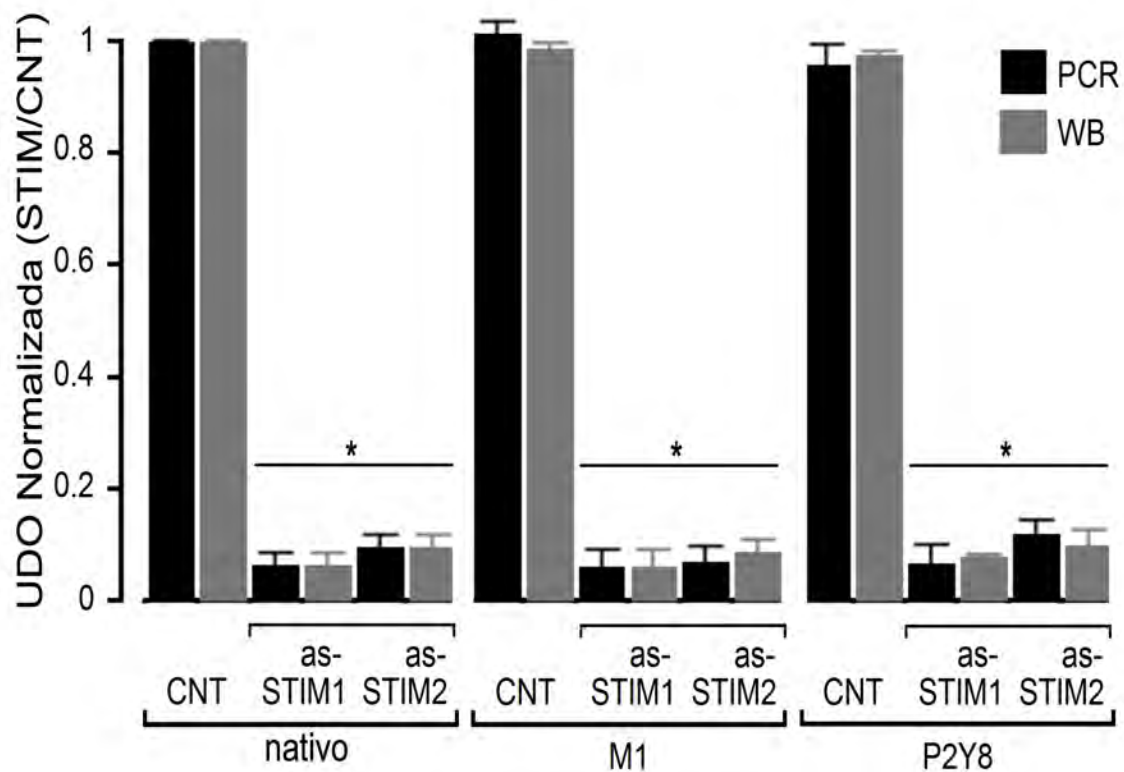


Figura 6. Resumen gráfico de la expresión de STIM en ovocitos por PCR y Western blot. La gráfica muestra el análisis densitométrico de las bandas obtenidas en las figuras 4 y 5, resumiendo los datos obtenidos en las diferentes preparaciones de 10 ovocitos por grupo y repetidos en 3-5 donadores. Tanto los productos de PCR y las bandas detectadas por Western blot (WB) fueron analizados de lotes de ovocitos inyectados únicamente con ARNc de P2Y8 o M1, y ovocitos co-inyectados con un as-STIM o en conjunto con ARNc de GPCR- Unidades de densidad óptica (UDO) para cada banda fue normalizada con el valor obtenido en la condición control (CNT) correspondiente. (* $p < 0.01$).

7.3 El silenciamiento de las proteínas STIM no afecta la generación de las corrientes oscilatorias de Cl^- activadas por agonistas

Para evaluar el papel de STIM1 y STIM2 en la activación de la corriente SOC, monitoreamos la respuesta eléctrica T_{in} . Previo a este análisis se comprobó si la inyección de as-STIM afectaba o no, el mecanismo de liberación de Ca^{2+} estimulado por la aplicación de un agonista. Con esta finalidad y, como una medida de la capacidad de liberación de Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares, los ovocitos fueron expuestos a suero fetal bovino (SFB) para estimular el receptor endógeno a LPA (LPAR) (Tigyi et al. 1990), ACh, o ATP para evaluar la amplitud de las corrientes oscilatorias (I_{osc}) generadas por la aplicación de uno de los agonistas (Kusano et al. 1982). Las respuestas eléctricas generadas por SFB fueron registradas en ovocitos nativos, y aquellas generadas por ACh o ATP fueron registradas en ovocitos expresando receptores M1 o P2Y. La amplitud de las corrientes oscilatorias se compararon entre los ovocitos control (solo inyectados con ARNc de un receptor) y los ovocitos co-inyectados con as-STIM1 o as-STIM2 y ARNc de un receptor. Los resultados no muestran una diferencia significativa entre los grupos de ovocitos evaluados para un agonista particular. La respuesta I_{osc} generada por SFB (1:1000) tuvo una amplitud promedio de 135 ± 17 nA en ovocitos control, en cambio en ovocitos inyectados con as-STIM1 o as-STIM2 la corriente promedio fueron 127 ± 26 nA y 142 ± 54 nA, respectivamente. En los ovocitos que expresaron P2Y2, las corrientes oscilatorias generadas por la aplicación de ATP 100 μM fueron de 685 ± 31 nA, y no mostraron diferencia con respecto a la amplitud de los

ovocitos co-inyectados con oligos antisentido; 741 ± 92 nA para as-STIM1 y 647 ± 46 nA para as-STIM2. Resultados similares se obtuvieron para los grupos de ovocitos que expresaron M1 con 1600 ± 133 nA en ovocitos control sin diferencia significativa con respecto a la amplitud observada en los grupos inyectados con as-STIM1 o as-STIM2, mostrando 1540 ± 104 nA y 1410 ± 115 nA, respectivamente. Finalmente, el grupo de ovocitos control con P2Y8 generó corrientes oscilatorias promedio de 459 ± 26 nA, y los grupos co-inyectados con as-STIM 503 ± 59 nA y 415 ± 24 nA para as-STIM1 y as-STIM2 respectivamente.

Como se resume en la figura 7, estos resultados muestran que la inyección de los oligos antisentido de STIM1 y STIM2 no afectaron la activación de las corrientes I_{osc} estimuladas por primera vez, lo que sugirió que el mecanismo de liberación de Ca^{2+} permaneció sin alteración significativa.

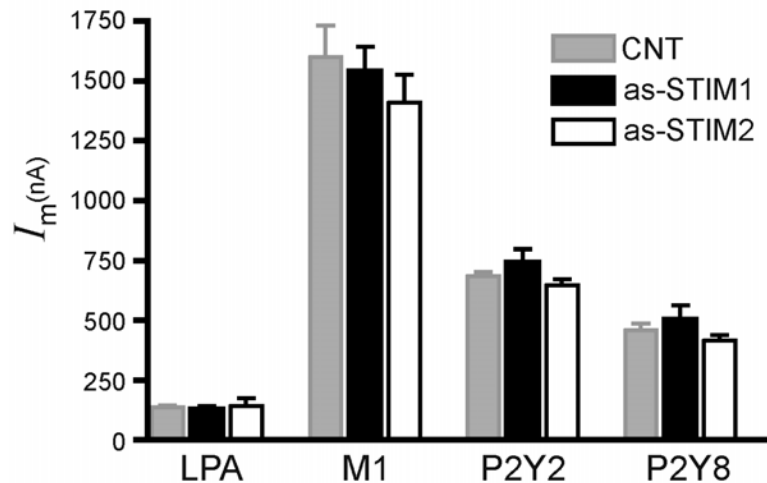


Figura 7. Corrientes oscilatorias de Cl^- activadas por agonistas. La gráfica muestra el promedio de las corrientes oscilatorias generadas por diferentes GPCR activados por sus respectivos agonistas (I_m). Ovocitos nativos, se utilizaron para activar al receptor de LPA, mientras que lotes de ovocitos fueron inyectados con ARNc de receptor M1 o P2Y8 o P2Y2 solo o en conjunto con as-STIM 1 o as-stim2 .

7.4 Participación diferencial de STIM1 en la generación de T_{in} , dependiente del GPCR involucrado

Para analizar el papel de las proteínas STIM durante la generación de la respuesta eléctrica T_{in} , los ovocitos fueron estimulados con su respectivo agonista para inducir la liberación de Ca^{2+} (Figura 8). Entonces, T_{in} fue monitoreada con pulsos de voltaje de -90 mV cada 40 s, desde un potencial de mantenimiento de -10 mV. Como se ilustra en la figura 8A, la amplitud de la corriente T_{in} generalmente incrementa tras una aplicación breve de agonista (ATP, ACh o SFB por 120s), donde la corriente T_{in} alcanza su máxima amplitud después de 400 – 480 s, y después lentamente regresa a sus niveles basales en 600 – 800 s.

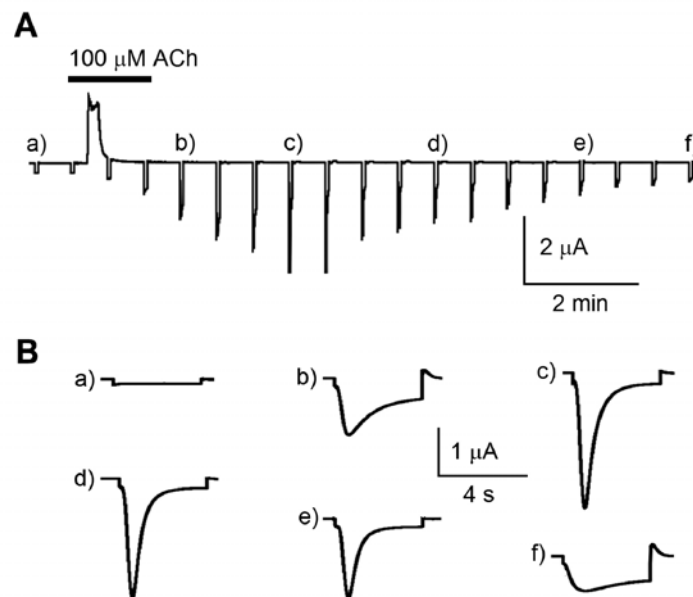


Figura 8. Activación de respuesta T_{in} por estimulación aguda de agonista. A. Ilustra la activación de la corriente T_{in} en ovocitos en la que se activa el receptor M1 a través de una aplicación de 100 μM de ACh durante 40 s. B) Muestra la corriente T_{in} durante los pasos de voltaje indicados en A.

Consistente con estudios previos (Parker et al. 1985), la respuesta T_{in} corresponde a una corriente dependiente del Ca^{2+} extracelular (Figura 9).

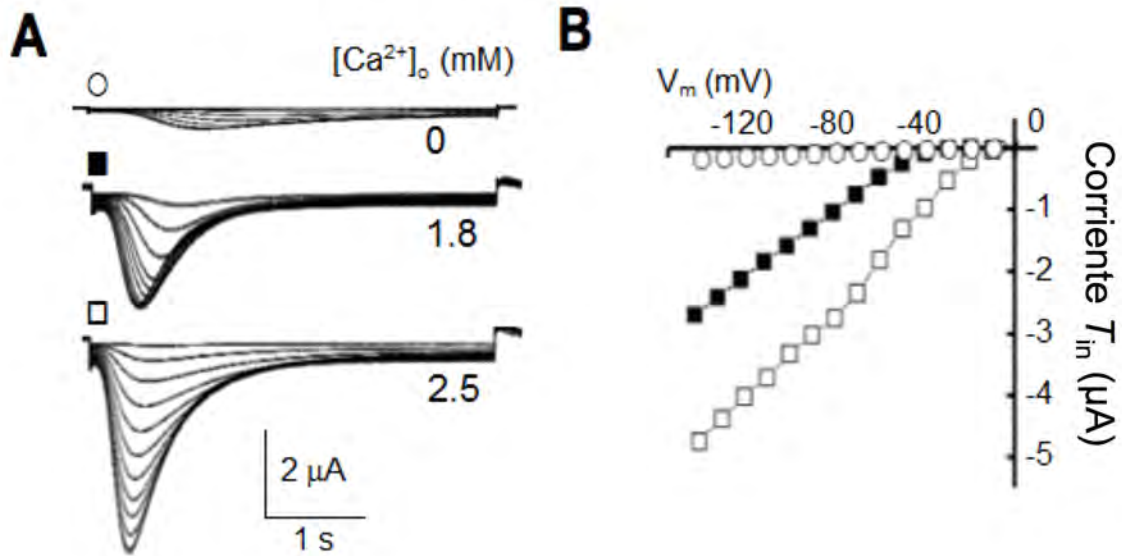


Figura 9. Ca^{2+} -dependencia extracelular de la corriente T_{in} . A. Trazos sobre puestos de la respuesta T_{in} obtenida en pulsos de 10 mV desde 0 mV hasta -140 mV en tres concentraciones de Ca^{2+} : 0, 1.8 y 2.5mM. B. Relación I/V representativa de los trazos en A. Estas respuestas fueron obtenidas en ovocitos expresando P2Y8.

Así mismo esta corriente se inhibió por lantánidos con una IC_{50} para La^{3+} de 41 ± 0.21 nM y para Gd^{3+} de 7 ± 0.23 μ M (Figura 10) con potencia similar a la que se ha reportado para lantánidos que bloquean canales SOC en otros estudios (Parker et al. 1985; Putney 2010; Yao & Tsien 1997).

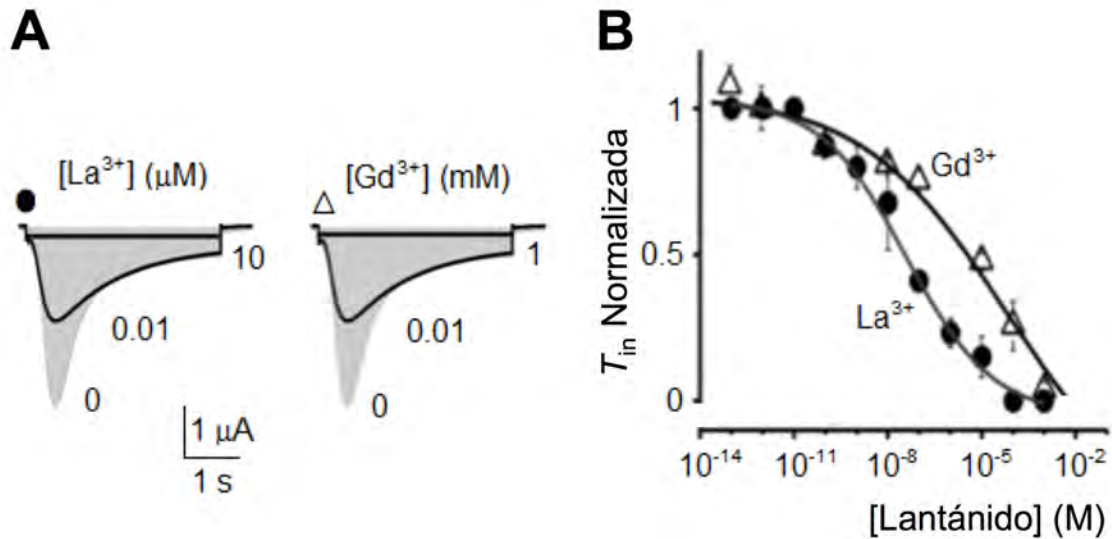


Figura 10. Bloqueo de la corriente T_{in} por Lantánidos. A. Trazos representativos sobrepuestos que ilustran el efecto inhibitorio generado por La^{3+} y Gd^{3+} en la amplitud de T_{in} ; el área gris corresponde a la respuesta control generada en la ausencia de el lantánido, los trazos negros son corrientes obtenidas en presencia de diferentes concentraciones de La^{3+} o Gd^{3+} . B. Curva dosis-respuesta del efecto inhibitorio de lantánidos como se ilustra en A.

Una vez confirmado que los oligonucleótidos antisentido son efectivos en la reducción de los niveles de proteínas STIM, evaluamos la participación de STIM1 en la generación de T_{in} en ovocitos inyectados 48-72 horas antes con as-STIM1. También, en paralelo fueron obtenidas preparaciones de membrana total de estos mismos grupos para ser analizado por Western blot (Figura 5). En ovocitos control, no inyectados, la aplicación de SFB 1:1000 generó corrientes T_{in} con amplitud promedio de $2.5 \pm 0.28 \mu A$ (Figura 11). Sin embargo, en ovocitos inyectados con as-STIM1, la amplitud promedio de la corriente fue de $0.92 \pm 0.38 \mu A$, que representó un decremento del $60 \pm 5.2\%$. De forma similar, ovocitos expuestos a $100 \mu M$ de ACh (receptores M1) mostraron una disminución en la amplitud de la corriente del $70 \pm 9.7 \%$ en el grupo inyectado

con as-STIM1. Sin embargo, los ovocitos que expresaban P2Y8 y que fueron expuestos a 100 μ M de ATP mostraron un decremento de tan solo el $20 \pm 1.4\%$ en la amplitud de la respuesta T_{in} . Dado que la disminución de T_{in} fue claramente menos robusta si las respuestas eran generadas a través de receptores P2Y, probamos un segundo tipo de receptor P2Y con el propósito de explorar si existía un efecto similar. Entonces, ovocitos expresando P2Y2 fueron expuestos a ATP y mostraron una reducción de $15 \pm 1.5\%$ en la amplitud de la corriente, un valor significativamente diferente de los resultados observados con los otros receptores no purinérgicos, sugiriendo que los receptores difieren en su habilidad para reclutar STIM1. Además, estos resultados parecen indicar que la eliminación de STIM1 claramente no causa una pérdida completa de la corriente T_{in} , especialmente si esta es generada a través de receptores P2Y.

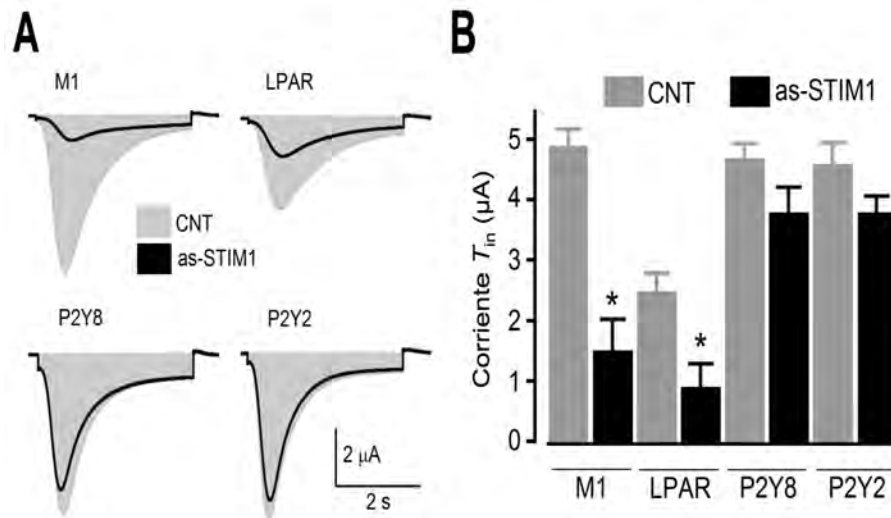


Figura 11. Silenciamiento de STIM1 por inyección de as-STIM1, disminuye diferencialmente T_{in} . A. Ovocitos expresando un GPCR fueron estimulados con su respectivo agonista 100 μ M o SFB 1:1000; la amplitud de las corrientes control se muestran en áreas grises, trazos negros sobrepuestos muestran la amplitud de T_{in} en ovocitos inyectados con as-STIM1. B. La gráfica resume las amplitudes generadas en las diferentes condiciones experimentales ilustradas en A. Cada barra muestra amplitud promedio (\pm ESM). * <0.01 .

Para confirmar esta observación se evaluaron ovocitos co-inyectados con ambos ARNc tanto para el receptor M1 como, para el receptor P2Y8, en conjunto con el as-STIM1, a los que llamamos tri-inyectados (los ovocitos control fueron únicamente inyectados con el ARNc de los receptores). En este caso, se observó una disminución de $71 \pm 6.2\%$ en la amplitud de T_{in} cuando los ovocitos fueron expuestos a ACh (4.9 ± 0.28 en ovocitos no inyectados con as-STIM1 y $1.44 \pm 0.31 \mu A$, en el grupo inyectado con as-STIM1), en cambio, cuando el mismo ovocito se incubó con ATP, la corriente mostró un decremento del $21 \pm 2.7\%$ ($4.7 \pm 0.32 \mu A$ y $3.7 \pm 0.12 \mu A$ en los grupos control e inyectados con as-STIM1, respectivamente), confirmando así, que los receptores purinérgicos son menos dependientes a la activación o interacción con STIM1 en comparación con los receptores muscarínicos.

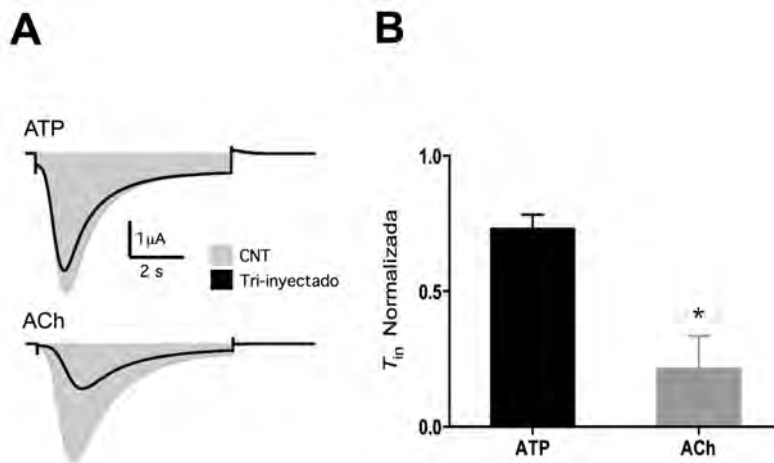


Figura 12. Activación o interacción diferencial de los GPCR con STIM1. A. Ovocitos expresando ambos GPCR fueron estimulados con su respectivo agonista $100 \mu M$; la amplitud de las corrientes control se muestran en áreas grises, trazos negros sobrepuestos muestran la amplitud de T_{in} en ovocitos estimulados con un agonista. B. La gráfica resume las amplitudes generadas en las diferentes condiciones experimentales ilustradas en A. Cada barra muestra amplitud promedio ($\pm ESM$). $* < 0.01$.

7.5 El silenciamiento de STIM2 inhibe la generación de la corriente T_{in}

A continuación se evaluó si el silenciamiento de STIM2 afectaba o no la corriente transitoria activada por los receptores, P2Y, M1 o LPA. Se realizaron experimentos similares a los descritos previamente pero en este caso inhibiendo STIM2 con el uso de as-STIM2. A diferencia de lo descrito para el caso de as-STIM1, el silenciamiento de la proteína endógena de STIM2 redujo drásticamente la amplitud de la corriente T_{in} generada por cualquiera de los receptores que se evaluaron (Figura 13). La amplitud de T_{in} se redujo $96 \pm 6.6\%$ en ovocitos estimulados con SFB $1.6 \pm 0.38 \mu\text{A}$ y en ovocitos inyectados con as-STIM2 $0.15 \pm 0.05 \mu\text{A}$. En el caso de los ovocitos que expresaron receptores M1 la inhibición de la corriente fue de $96 \pm 3.6\%$ en donde los ovocitos control (sin inyección de as-STIM1 generaron una amplitud de $3.3 \pm 0.19 \mu\text{A}$ y el grupo inyectado con el oligonucleótido antisentido generó una corriente promedio de $0.12 \pm 0.04 \mu\text{A}$. En el caso de los ovocitos con receptores P2Y8 y activados con ATP los grupos control generaron una corriente T_{in} promedio de $3.1 \pm 0.19 \mu\text{A}$, en cambio, el grupo inyectado con as-STIM2 $0.22 \pm 0.03 \mu\text{A}$, lo cual es una inhibición del $93 \pm 7.1\%$. Finalmente, los ovocitos con receptores P2Y2 e inyectados con as-STIM2 mostraron una inhibición del $94 \pm 8\%$, en donde el grupo control generó corrientes de $3.2 \pm 0.7 \mu\text{A}$ mientras que el grupo inyectado con el oligo antisentido generó amplitudes de $0.2 \pm 0.07 \mu\text{A}$. En conclusión, no se encontraron diferencias en la inhibición generada por el antisentido entre los receptores estudiados (Figura 13).

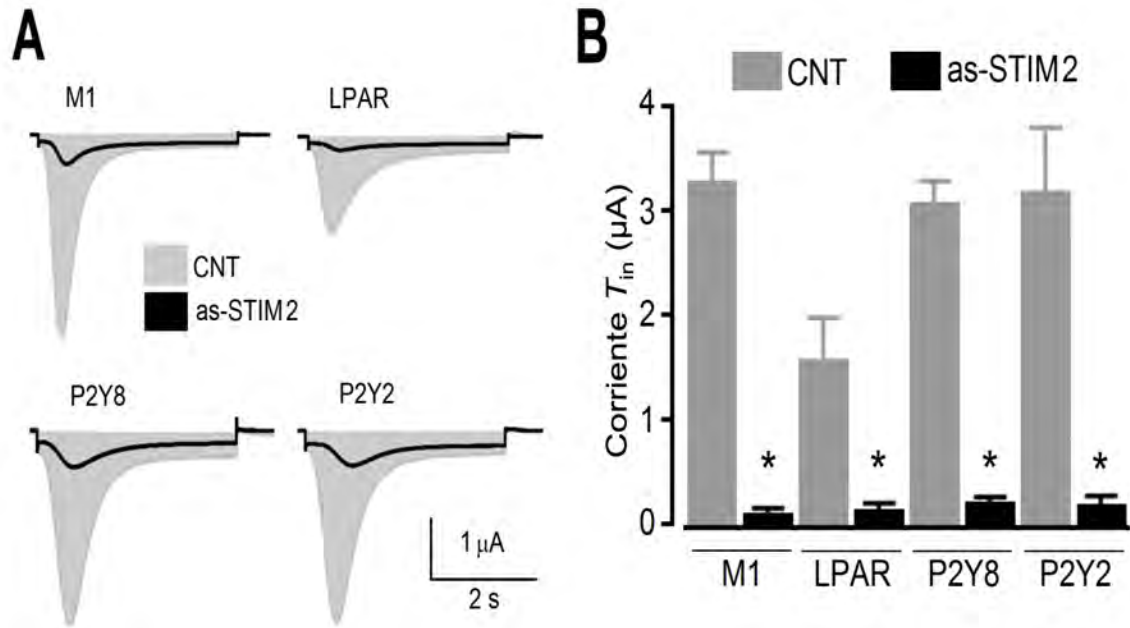


Figura 13. Silenciamiento de STIM2 por la inyección de as-STIM2 y su efecto inhibitorio en la corriente T_{in} . A.

Trazos representativos de la generación de T_{in} a través de GPCR como en Fig. 12, la amplitud de las corrientes control se muestran en áreas grises, trazos negros sobrepuestos muestran la amplitud de T_{in} en ovocitos inyectados con as-STIM2. B. La gráfica resume las amplitudes generadas en las diferentes condiciones experimentales ilustradas en A. Cada barra muestra amplitud promedio (\pm ESM). * <0.01 .

Como se mencionó anteriormente, la disminución T_{in} no parece ser debida a un desacoplamiento de la maquinaria de IP_3/Ca^{2+} dado que las respuestas I_{osc} en todos los grupos experimentales usados no mostraron diferencia significativa (Figura 7).

Los experimentos control se realizaron con otras secuencias de oligonucleótidos antisentido, con el objetivo de descartar que la inyección *per se* presentara efectos no específicos sobre la corriente T_{in} . Por ejemplo, as-Cx38 se ha usado para silenciar los conexiones formados por conexinas 38 (Cx38), que pueden activarse por la perfusión de una solución Ringer sin Ca^{2+} (Arellano et al.

1995), esta manipulación permite un rápido y confiable monitoreo de la expresión de la conexina. Como se resume en la Figura 14, en ovocitos control la corriente I_c nativa fue generada por la perfusión de solución Ringer sin Ca^{2+} ($3.06 \pm 0.16 \mu A$), en cambio en los ovocitos inyectados con as-Cx38 esta corriente fue eliminada. Sin embargo, en los ovocitos de estos dos grupos la amplitud de la corriente T_{in} no presentó diferencias significativas, sin importar el tipo de receptor activado; M1 ($2.98 \pm 0.17 \mu A$ en el grupo sin as-Cx38 y $2.95 \pm 0.18 \mu A$ en el grupo inyectado con antisentido) y para el caso del receptor P2Y8 ($3.14 \pm 0.14 \mu A$ y $3.15 \pm 0.15 \mu A$, respectivamente).

Estos datos indican claramente que la generación de T_{in} en ovocitos de *Xenopus laevis* no se ve afectada de manera inespecífica por el silenciamiento de moléculas endógenas diferentes a STIM.

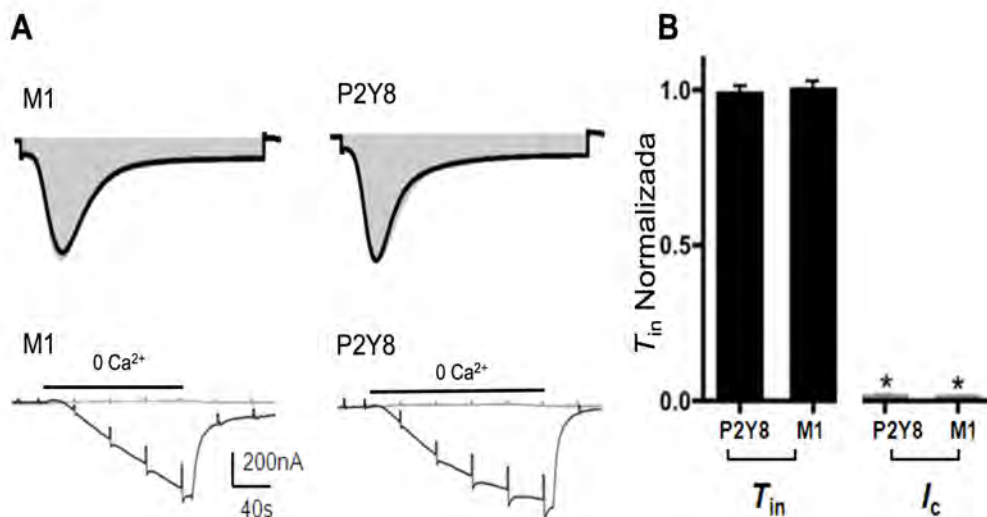


Figura 14. Inyección de as-Cx38 no afecta la generación de T_{in} . A. Trazos representativos del efecto de la inyección de as-Cx38 sobre la generación de T_{in} e I_c en ovocitos expresando receptores M1 o P2Y8 e inyectados con as-Cx38. T_{in} : en áreas grises se muestra la amplitud de la corriente, trazos negros sobrepuestos muestran la amplitud de T_{in} en ovocitos inyectados con as-Cx38; I_c : En trazo negro se muestra la corriente control generada en ovocitos nativos en presencia de Ringer sin Ca^{2+} , en trazos grises el efecto de la inyección de as-Cx38 en la amplitud de la corriente I_c . B. La gráfica resume las amplitudes normalizadas de las diferentes condiciones experimentales ilustradas en A (as-Cx38/CNT). Cada barra muestra amplitud promedio (\pm ESM). * <0.01 .

7.6 El anticuerpo COOH-STIM2 incrementa la amplitud de la respuesta T_{in}

Los mismos anticuerpos usados en los estudios de Western blot fueron usados para probar el posible efecto *in situ* en la generación de T_{in} , ya que la unión del anticuerpo a STIM1 o STIM2 podría afectar potencialmente la función de estas proteínas, si este es el caso los anticuerpos podrían ser utilizados como herramientas para evaluar la participación de STIM en respuestas específicas.

Para este propósito los anticuerpos fueron microinyectados en el citoplasma del ovocito a una concentración final de 1:1000. La Figura 15 muestra

que la aplicación de ACh en ovocitos precargados con el anticuerpo COOH-STIM2 resulta en una potenciación robusta de la respuesta T_{in} , incrementando su amplitud $158 \pm 25\%$ ($2.4 \pm 0.34 \mu\text{A}$ en el grupo control, sin anticuerpo precargado y $6.2 \pm 0.86 \mu\text{A}$ en el grupo con anticuerpo). La inyección del anticuerpo también potenció las respuestas T_{in} generadas por aplicación de SFB que activa a LPAR, en donde la respuesta aumentó $168 \pm 30\%$, y un efecto similar fue observado en ovocitos estimulados a través de P2Y8 (incrementó de $126 \pm 37\%$) y en el caso del receptor P2Y2 ($129 \pm 23\%$). En contraste, los ovocitos precargados con el anticuerpo COOH-STIM2 inactivado (incubado 10 min a 70°C), la potenciación en la corriente T_{in} se eliminó completamente. Así mismo, la inyección de los anticuerpos NH-STIM1 o NH-STIM2 no generó ningún cambio en la amplitud de la respuesta transitoria comparada con el grupo control no inyectado, ($2.4 \pm 0.34 \mu\text{A}$ grupo control y $2.5 \pm 0.41 \mu\text{A}$ y $2.2 \pm 0.09 \mu\text{A}$, para NH-STIM1 y NH-STIM2, respectivamente). Otros resultados indican que la potenciación de la corriente T_{in} por el anticuerpo COOH-STIM2 fue específica; por ejemplo, la inyección de anticuerpos contra el receptor P2Y2 no tuvo efecto alguno sobre la amplitud de la corriente ($2.3 \pm 0.43 \mu\text{A}$ y $2.4 \pm 0.34 \mu\text{A}$ en los grupos cargado y no cargado de anticuerpo respectivamente). Todos los resultados indican claramente que el anticuerpo COOH-STIM2 específicamente potencia la corriente T_{in} , sin importar el receptor estimulado.

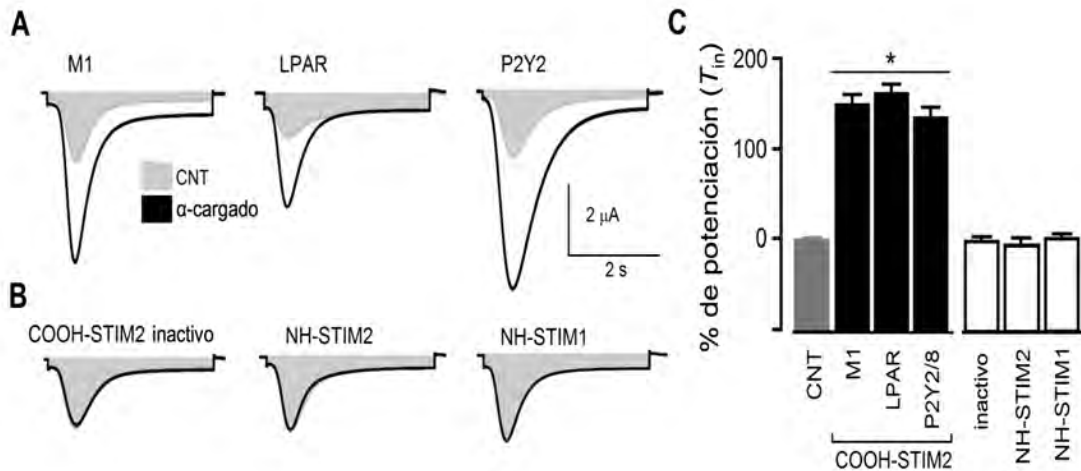


Figura 15. Potenciación de T_{in} por inyección del anticuerpo COOH-STIM2. A. Respuestas T_{in} monitoreadas en dos condiciones-, ovocitos control, CNT no cargados y ovocitos cargados con el anticuerpo COOH-STIM2 (α -cargado). La corriente fue generada por un GPCR y la aplicación de su agonista específico. B. Trazos representativos de ovocitos expresando M1 y cargados con un anticuerpo inactivo o diferente a A. C. La gráfica muestra el resultado el % de potenciación de las condiciones ilustradas en A y B. Las barras representan α -cargado/CNT en %. (* $p < 0.01$).

7.7 Sobre el papel de STIM1 y STIM2 durante la estimulación prolongada del receptor

Los experimentos siguientes se diseñaron para explorar la posibilidad de que las proteínas STIM tuviesen diferentes efectos dependiendo de la duración del estímulo que las active. Esta es una pregunta importante dado que existe información que apoya la idea de que STIM1 y STIM2 funcionan de forma diferencial, dependiendo del tipo de receptor, intensidad del estímulo, y/o grado del vaciado de los reservorios de Ca^{2+} (Gruszczynska-Biegala et al. 2011; Kar et al. 2012; Thiel M, Lis A 2013). Los ovocitos que se inyectaron con as-STIM1 o as-STIM2 y con receptores M1, P2Y8 o P2Y2 se incubaron 1-4 horas en presencia de 1 μ M de sus respectivos agonistas, como se muestra en la Figura

16. Es importante mencionar que en el caso particular de los receptores P2Y fue suficiente omitir la incubación en apirasa (enzima que degrada el ATP extracelular), permitiendo así que el ATP liberado de manera endógena active a estos receptores (Saldaña et al. 2009). Estos experimentos muestran que la incubación prolongada con el agonista genera corrientes T_{in} estables, permaneciendo así por períodos más largos de 60 minutos de registro continuo aun en perfusión continua con solución RN, presentando su disminución en la amplitud tras 120-180 minutos de lavado; asumimos entonces que en esta condición la maquinaria SOC se encontraba sobre estimulada, y que el tiempo que dura activada podría reflejar el tiempo necesario para rellenar los reservorios. En los ovocitos pre-incubados por períodos largos, la activación de GPCR por su agonista produjo una inhibición transitoria sobre la respuesta T_{in} (Figura 16, trazo b); esta inhibición es aparentemente independiente de la expresión de STIM1 o STIM2, y no fue estudiado con detalle en este estudio.

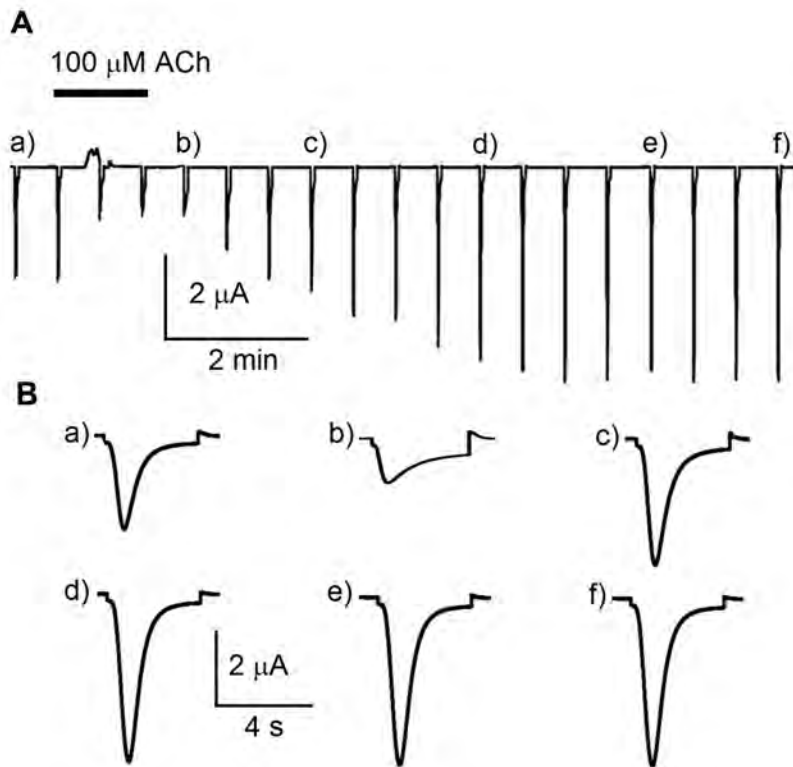


Figura 16. Activación de T_{in} por estimulación prolongada. A. El registro ilustra la activación de la corriente por ovocitos expresando receptor M1, pre-incubado 1-4 h con 1 μM de ACh , y monitoreado con los mismos parámetros eléctricos que en Fig. 8.y estimulado con 100 μM de ACh. D. Trazos representativos indicados en A, En este protocolo la corriente transitoria regularmente estaba activada desde el comienzo del registro, y durante la aplicación del agonista se observo una inhibición (b).

En ovocitos donde el STIM1 fue silenciado, la corriente T_{in} fue activada por activación prolongada de P2Y8 con ATP y no mostró diferencia significativa con los ovocitos control ($4.1 \pm 0.57 \mu\text{A}$ y $3.8 \pm 0.41 \mu\text{A}$, respectivamente). Resultados similares se obtuvieron en ovocitos expresando receptores P2Y2 ($4.2 \pm 0.43 \mu\text{A}$ y $3.9 \pm 0.27 \mu\text{A}$ en ovocitos inyectados con as-STIM1 y control, respectivamente), incluso con la estimulación prolongada del receptor M1 con 1 μM de ACh la corriente T_{in} en ovocitos inyectados con as-STIM1 generó una

amplitud promedio de $2.25 \pm 0.62 \mu\text{A}$ y en ovocitos no inyectados con el antisentido $2.35 \pm 0.34 \mu\text{A}$. Estos resultados claramente contrastan con los resultados obtenidos usando una estimulación puntual. En ovocitos inyectados con as-STIM2 y expresando uno de los receptores purinérgicos o el M1, la corriente T_{in} no fue generada, sugiriendo fuertemente que STIM2 en el ovocito fue esencial para generar esta respuesta eléctrica en el protocolo de estimulación puntual y prolongada.

7.8 Proceso de maduración y proteínas STIM

Durante el proceso de maduración, elementos moleculares que controlan y regulan la dinámica intracelular de Ca^{2+} en ovocitos de *Xenopus* sufren una reconfiguración; este fenómeno ha sido observado en diferentes especies, incluso cambios similares se observan durante la mitosis (Machaca & Haun 2002; Preston et al. 1991). Dada la importancia de dichos eventos para el control del ciclo celular, resulta relevante investigar si el silenciamiento de las proteínas STIM afectan el proceso de maduración. Así, lotes de ovocitos fueron inyectados con as-STIM1 o as-STIM2 y tras 48-72 horas se incubaron con $10 \mu\text{M}$ de progesterona en solución BN.

La maduración del ovocito fue monitoreada a través del rompimiento de la vesícula germinal o GVBD, esto es evidenciado por, la aparición de un punto blanco en el polo animal después de 8 a 12 h en presencia de la progesterona. Posteriormente la GVBD fue confirmada a través de la observación directa de la falta de la vesícula germinal. El número de ovocitos con GVBD se comparó para

cada uno de los grupos inyectados con los oligos antisentido, con la observada en ovocitos no inyectados, además se monitoreó otro grupo control de ovocitos que no fueron tratados con progesterona. Como se observa en la Figura 17, ovocitos inyectados con as-STIM1 no mostraron efecto sobre la eficiencia de la maduración, en cambio el silenciamiento de STIM2 produjo una potente inhibición del proceso de maduración. Aunque los ovocitos inyectados con as-STIM2 no mostraron GVBD, en algunos casos mostraron un cambio atípico en la coloración del polo animal del ovocito; comúnmente observado como un anillo claro cubriendo la mitad del diámetro del polo animal. La falta de GVBD en ovocitos inyectados con as-STIM2 parece indicar la deficiencia para entrar en fase de meiosis o bien un proceso de maduración incompleto; esta interpretación fue apoyado por el monitoreo de parámetros electrofisiológicos en todos los grupos experimentales. Se sabe que el proceso de maduración genera disminución en el potencial de reposo de la membrana, incremento en la resistencia, así como una regulación a la baja de las respuestas endógenas tales como la respuesta oscilatoria de Cl^- dependiente de Ca^{2+} o la respuesta I_c (Kusano et al. 1982; Arellano et al. 1995).

Como se ilustra en la figura 18, los parámetros eléctricos del grupo inyectado con as-STIM2 (tratado con progesterona) fueron diferentes de aquellos observados en el grupo inyectado con as-STIM1 y grupo control, aún cuando estos dos últimos grupos se incubaron por el mismo periodo de tiempo.

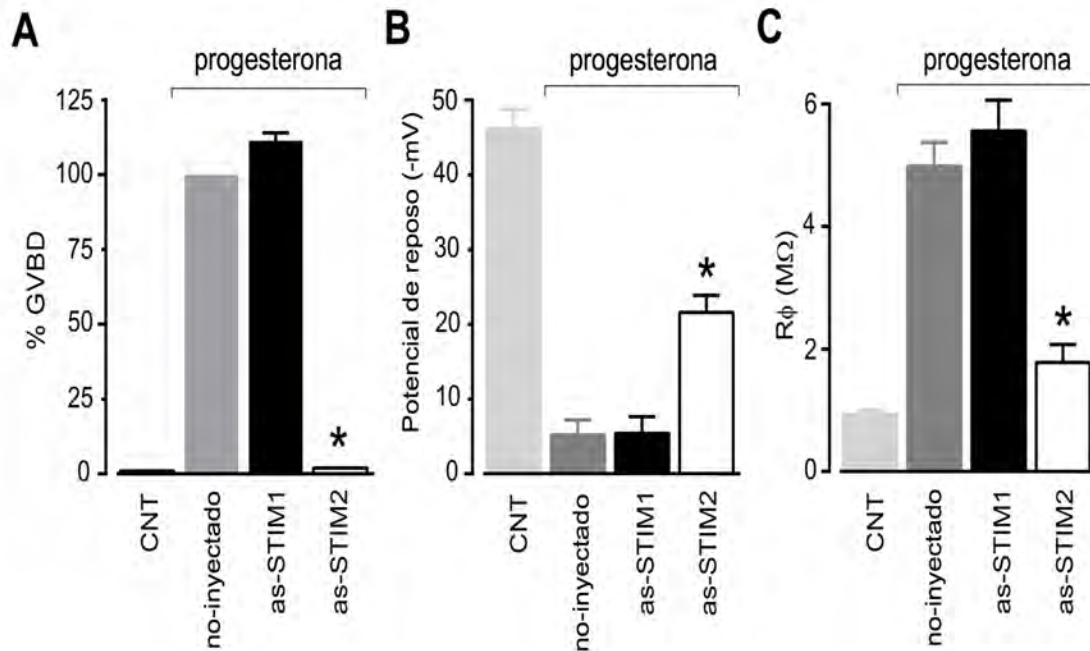


Figura 17. Efecto de la inyección de as-STIM en GVBD y parámetros de la membrana celular durante la maduración inducida por progesterona en ovocitos. A. Análisis del proceso de maduración inducida por progesterona en ovocitos, no inyectados con un as-STIM comparado con ovocitos control sin incubación en la hormona. La maduración fue registrada por la cuantificación de la GVBD. B. Potencial de membrana en reposo monitoreado tras 8-12 h en incubación con progesterona. C. La resistencia de entrada en la membrana (R_{ϕ}) se calculó en un rango de -80 a -20 mV en los diferentes grupos experimentales. Los grupos control sin progesterona incluyen ambos grupos no inyectados con as-STIM. (* $p < 0.01$).

En conjunto, estos resultados muestran que en los ovocitos donde la proteína STIM2 se inhibió, el proceso de maduración es interrumpido. Este efecto de la inyección de as-STIM2 no parece requerir influjo de Ca^{2+} extracelular durante el proceso, ya que experimentos control mostraron que el inicio de la meiosis no requiere Ca^{2+} extracelular (datos no mostrados), esta última observación confirmó datos presentados en estudios previos (Sun & Machaca 2004).

8. Discusión

Cuando se libera el Ca^{2+} desde reservorios intracelulares como el RE, las proteínas STIM son activadas al ser translocadas y oligomerizadas en uniones formadas entre el RE y la membrana plasmática, en donde se unen y activan a canales altamente selectivos a Ca^{2+} formados por subunidades Orai que permiten el influjo del catión (Cahalan 2009; Rothberg et al. 2013). El principal iniciador de este fenómeno es la disminución de Ca^{2+} en el lumen del RE, sin embargo, existe evidencia indicando que la isoforma STIM2 puede ser capaz de mantener una activación basal de los canales Orai sin una liberación *a priori* de Ca^{2+} , regulando así la concentración del catión en el citoplasma (Brandman et al. 2007; Hoth & Niemeyer 2013). El nivel de expresión de STIM1 y/o STIM2 pareciera depender del tipo celular, y tal vez del estado patofisiológico. Aquí mostramos que los ovocitos de *Xenopus* expresan ambas STIM, esto también se ha reportado para otros tipos celulares tales como las células T (Oh-Hora et al. 2008), los mioblastos (Darbellay et al. 2010), el músculo esquelético y el hígado (Berna-Erro et al. 2009). Técnicas de silenciamiento y sobre expresión se han utilizado en diversos estudios con el propósito de distinguir los papeles de STIM1 y STIM2 en numerosos tipos celulares. La inyección de oligonucleótidos antisentido para cada una de las proteínas STIM se eligió en este estudio por la facilidad de uso y la eliminación de los efectos inespecíficos. Las secuencias antisentido fueron diseñadas contra la región del codón de inicio AUG, esta estrategia ha sido utilizada con anterioridad (Hulstrand et al. 2010). De hecho, el

efecto de la inyección sobre la expresión de STIM se demostró cuantificando ambos ARNm y la expresión proteica por técnicas tales como RT-PCR y Western blot, respectivamente. Entonces, este análisis muestra que en ovocitos inyectados con las secuencias de oligos antisentido para STIM1 y STIM2, su expresión es inhibida. Este efecto de los oligos antisentido no fue afectado por la co-expresión con GPCR, usados aquí experimentalmente para estimular la liberación de Ca^{2+} a través de la activación de una vía endógena. También, se mostró que el silenciamiento de las proteínas STIM no afectó el incremento de IP_3 o la subsecuente liberación de Ca^{2+} , como lo muestra la amplitud de las respuestas oscilatorias evocadas al inicio de cada experimento con la aplicación aguda del agonista respectivo.

Los ovocitos inyectados con cualquiera de los oligos antisentido se evaluaron para analizar su habilidad de generar la corriente T_{in} usando los dos protocolos descritos para la estimulación. En el primero, la aplicación aguda del agonista produjo una corriente oscilatoria típica; seguida de la generación de la corriente transitoria que declinó en 680 a 800 s. En el segundo protocolo, de estimulación prolongada (1-4 horas) con 1 μM del agonista, dio como resultado respuestas eléctricas T_{in} que permanecían activas 60-180 min, incluso en perfusión constante de la solución RN. Una posible explicación para este cambio en la cinética de la corriente es que la estimulación prolongada produjo una fuerte activación del mecanismo SOCE, probablemente debido a un decremento pronunciado de la concentración de Ca^{2+} en el RE. Ambos protocolos se aplicaron en ovocitos inyectados con uno de los antisentidos para el

silenciamiento de uno u otro de los STIM. Los resultados claramente indican que el silenciamiento de STIM2 produjo una disminución pronunciada en la generación de T_{in} , ya que la inhibición fue entre 93 – 100% en ambos protocolos de estimulación, indicando que STIM2 es indispensable en la generación de T_{in} .

No obstante, la eliminación de STIM1 provocó una menor pero significativa disminución en la generación de T_{in} , como se observó con el protocolo de aplicación aguda de agonista, indicando que STIM2 por sí mismo no fue capaz de mantener la activación completa de T_{in} durante la aplicación aguda de agonista; sugiriendo una necesaria asociación de STIM2 con STIM1 para activar la respuesta. También se observó, que el requerimiento de STIM1 fue dependiente del tipo de receptor estimulado: la activación de esta proteína parece entonces ser mayor durante la estimulación de M1 o LPAR, mientras que con la activación de receptores P2Y claramente es menor. Este efecto no puede ser explicado por las amplitudes de las corrientes I_{osc} generadas por los agonistas, ya que ACh o LPA fueron menos efectivos en generar la respuesta comparado con los receptores P2Y, y también porque ambos agonistas mostraron patrones similares en la disminución de T_{in} . Este resultado podría indicar algún tipo de especificidad molecular, tal vez propiedades intrínsecas de las moléculas involucradas o como consecuencia de una expresión y localización diferencial en el ovocito. La inserción diferencial de diversas proteínas expresadas en la membrana del ovocito ha sido demostrada; entonces, los dominios membranales con mayor expresión de STIM2 en conjunto con los receptores P2Y es una posible explicación.

Una función principal de STIM2 en la generación de SOCE se ha mostrado previamente en algunos tipos celulares tales como neuronas (Berna-Erro et al. 2009) y en las células dendríticas (Bandyopadhyay et al. 2010b); sin embargo, no hay evidencia que indique que la expresión de STIM1 pueda o no afectar la respuesta endógena en estos casos. Por ejemplo, se ha mostrado la participación esencial de STIM2 en la activación de SOCE en espinas dendríticas, y que ésta no se restablece por la sobreexpresión de STIM1 (Sun et al. 2014). Estos efectos podrían deberse a la sensibilidad diferencial a Ca^{2+} entre los STIM y/o la localización subcelular de estas proteínas. Por ejemplo, en otros sistemas celulares, se ha postulado la coparticipación o complementariedad de las proteínas STIM (Gruszczynska-Biegala et al. 2011; Kar et al. 2012). En este último caso, la activación diferencial de STIM1 se mostró como resultado de la estimulación de diferentes receptores membranales; en células RBL-1, por ejemplo, los agonistas generan el reclutamiento diferencial de las proteínas STIM, las oscilaciones de Ca^{2+} del receptor CysLTR1 fueron mantenidas exclusivamente por STIM1, en cambio el receptor RTK-FC ϵ R 1 requirió de ambos STIM (Kar et al. 2012). Finalmente, cuando los ovocitos fueron estimulados usando el protocolo de estimulación prologada, el silenciamiento de STIM1 no tuvo efecto alguno sobre la corriente, indicando que en este caso T_{in} fue activada únicamente por STIM2. El papel primordial de STIM2 es apoyado por los resultados, tal como el incremento del 100% en la amplitud de la corriente T_{in} por la inyección del anticuerpo de STIM2 (COOH-STIM2), de forma independientemente al agonista usado para generar la respuesta T_{in} .

Este efecto potenciador del anticuerpo COOH-STIM2 sobre la corriente podría indicar que la fuerza de interacción entre Orai y STIM2 puede ser regulada, tanto positiva como negativamente, a través de un sitio que es afectado por el anticuerpo, confirmando de forma indirecta el papel principal de STIM2 durante la generación de T_{in} . De acuerdo a lo esperado por la disposición estructural de STIM, los dos anticuerpos que reconocen dominios cercanos al extremo amino (NH-STIM2 y NH-STIM1), no tuvieron efecto sobre la respuesta T_{in} .

Se sabe que la región carboxilo terminal, en ambos STIM, contiene el dominio responsable de interactuar y activar el canal SOC formado por Orai (SOAR) (Cahalan 2009). Un dominio que normalmente inhibe la interacción de STIM2-Orai, o tal vez un sitio directo sobre Orai podría ser afectado por el anticuerpo debido a la proximidad que se da entre estas dos moléculas para formar el canal SOC; como por ejemplo, el sitio regulador descrito para calmodulina en la subunidad Orai (Mullins et al. 2009). Dado que una vez activada T_{in} , la inyección del anticuerpo no tiene efecto sobre la corriente podría indicar que el sitio de reconocimiento del anticuerpo COOH-STIM2 solo esta disponible cuando la proteína STIM2 esta en configuración no activa, es decir antes de su oligomerización o interacción con Orai. Sería interesante elucidar si COOH-STIM2 es efectiva potenciando canales SOC en otros tipos celulares o si el efecto es especie-específico.

Se observó un efecto inhibitorio significativo en el proceso de maduración en los ovocitos sin proteína STIM2. Esto sugiere la participación de STIM2

durante la maduración o la preparación para la maduración, ya que su silenciamiento elimina el proceso de la GVBD. Una vez más, este resultado contrasta con los datos de los ovocitos sin STIM1, en donde la maduración se mantuvo similar al grupo control de ovocitos. En otros trabajos se ha mostrado que la función de STIM1 es regulada a la baja durante el proceso de maduración, lo cual contribuye a la eliminación de la respuesta SOCE en este modelo celular (El-Jouni et al. 2005; Machaca & Haun 2002; Yu et al. 2009); una condición similar se ha reportado en ovocito de mamíferos (Cheon et al. 2013), aunque este fenómeno sigue siendo controversial (Gomez-Fernandez et al. 2011). Actualmente, no hay información sobre lo que sucede con la sobreexpresión o la eliminación de STIM2 durante el proceso de maduración en el ovocito de rana o mamífero, ya que los estudios se han enfocado en el papel de STIM1. Sin embargo, se sabe que el ovocito de ratón expresa STIM2 en el RE, durante la maduración STIM2 se re-configura desde una localización homogénea a una más cercana al huso meiótico, sugiriendo un papel durante este proceso (Miao & Williams 2012). En la rana, es posible que el efecto inhibitorio de la eliminación de STIM2 no estuviera relacionado con su papel en la activación de SOCE, pues el inicio de la meiosis en *Xenopus* no requiere el influjo de Ca^{2+} (Petersen & Berridge 1994).

En resumen, el papel de STIM2 en el ovocito es fundamental para la respuesta endógena SOC generada durante T_{in} , aunque su asociación con STIM1 parece ser necesaria para la generación completa de la respuesta. De forma relevante, la participación de STIM1 mostró ser dependiente del receptor

activado, una observación que indica especificidad molecular, tal vez intrínsecamente a las moléculas involucradas o como una consecuencia de su expresión diferencial o localización en la membrana, obviamente entre muchas otras opciones. Tanto el mecanismo de este fenómeno como el de dependencia para inicio de la meiosis durante el silenciamiento de STIM2, son preguntas fundamentales que permanecen abiertas y podrían ayudar en el entendimiento sobre la función de STIM en el ovocito de *Xenopus* y otros tipos celulares. Estudios más detallados serán requeridos para caracterizar el nivel al cuál la ausencia de STIM2 afecta la maduración, así como para determinar si esta ausencia tendría más implicaciones generales en otras especies así como en meiosis y mitosis.

9. Conclusiones

Empleando técnicas electrofisiológicas y bioquímicas, abordamos el estudio del silenciamiento de proteínas STIM endógenas en ovocitos de *Xenopus laevis*, particularmente sobre dos repuestas, la activación de SOCE evaluada a través de la generación de la respuesta transitoria T_{in} y el proceso de maduración inducido por progesterona. Donde encontramos:

- 1) Ambas proteínas STIM1 y STIM2 son endógenamente expresadas en el ovocito de *Xenopus laevis*.
- 2) la inyección de los oligonucleótidos antisentido de STIM1 y STIM2 silencian la expresión del ARNm y la proteína correspondiente.
- 3) El silenciamiento de STIM1 y STIM2 no parece afectar la maquinaria de señalización o liberación de Ca^{2+} responsable de la generación de las respuestas oscilatorias de Ca^{2+} del ovocito.
- 4) STIM2, pero no STIM1, mostró ser fundamental para la generación de T_{in} , esta observación fue constante en ambos protocolos de activación de T_{in} , tanto en estimulación aguda como una estimulación prolongada.
- 5) El silenciamiento de STIM2 impide el proceso de maduración inducido vía progesterona, mientras que la eliminación de STIM1 no afecta este proceso.
- 6) Un anticuerpo que reconoce la COOH terminal de STIM2 mostro un efecto potenciador sobre la amplitud de la corriente T_{in} .

Bibliografía

- Arellano, R.O., Woodward, R.M. & Miledi, R., 1995. A monovalent cationic conductance that is blocked by extracellular divalent cations in *Xenopus* oocytes. *The Journal of physiology*, 484
- Baba, Y. et al., 2006. Coupling of STIM1 to store-operated Ca²⁺ entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(45), pp.16704–9.
- Bandyopadhyay, B.C., Pingle, S.C. & Ahern, G.P., 2010a. Store-operated Ca²⁺ signaling in dendritic cells occurs independently of STIM1. *Journal of leukocyte biology*, 89(January), pp.1–6.
- Bandyopadhyay, B.C., Pingle, S.C. & Ahern, G.P., 2010b. Store-operated Ca²⁺ signaling in dendritic cells occurs independently of STIM1. *Journal of leukocyte biology*, 89(1), pp.57–62.
- Barrero, M.J., Montero, M. & Alvarez, J., 1997. Dynamics of [Ca²⁺] in the endoplasmic reticulum and cytoplasm of intact HeLa cells. A comparative study. *The Journal of biological chemistry*, 272(44), pp.27694–9.
- Bauer, M.C. et al., 2008. Calmodulin binding to the polybasic C-termini of STIM proteins involved in store-operated calcium entry. *Biochemistry*, 47(23), pp.6089–91.
- Berna-Erro, A. et al., 2009. STIM2 regulates capacitive Ca²⁺ entry in neurons and plays a key role in hypoxic neuronal cell death. *Science signaling*, 2(93), p.ra67.
- Berna-Erro, A., Redondo, P.C. & Rosado, J.A., 2012. Store-operated Ca(2+) entry. *Advances in experimental medicine and biology*, 740, pp.349–82.
- Berridge, M.J., 2006. Calcium microdomains: organization and function. *Cell calcium*, 40(5-6), pp.405–12.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D. & Roderick, H.L., 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4(7), pp.517–29.
- Berridge, M.J., Lipp, P. & Bootman, M.D., 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 1(1), pp.11–21.

- Berridge MJ, P.C., 1995. G-protein regulation of capacitative calcium entry protein kinases A and C in *Xenopus* oocytes. *Journal of biochemistry*, 307, pp.663–668.
- El Boustany, C. et al., 2010. Differential roles of STIM1, STIM2 and Orai1 in the control of cell proliferation and SOCE amplitude in HEK293 cells. *Cell calcium*, 47(4), pp.350–9.
- Brandman, O. et al., 2007. STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ levels. *Cell*, 131(7), pp.1327–39.
- Cahalan, M.D., 2009. STIMulating store-operated Ca²⁺ entry. *Nature cell biology*, 11(6), pp.669–677.
- Cheon, B. et al., 2013. Ca²⁺ influx and the store-operated Ca²⁺ entry pathway undergo regulation during mouse oocyte maturation. *Molecular biology of the cell*, 24(9), pp.1396–410.
- Clapham, D.E., 1995. Calcium signaling. *Cell*, 80(2), pp.259–68. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7834745> [Accessed July 17, 2014].
- Darbellay, B. et al., 2010. Human muscle economy myoblast differentiation and excitation-contraction coupling use the same molecular partners, STIM1 and STIM2. *The Journal of biological chemistry*, 285(29), pp.22437–47.
- Dionisio, N. et al., 2011. Lipid rafts are essential for the regulation of SOCE by plasma membrane resident STIM1 in human platelets. *Biochimica et biophysica acta*, 1813(3), pp.431–7.
- Dumont, J.N., 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *Journal of morphology*, 136(2), pp.153–79.
- Dumont, J.N., 1978. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). VI. The route of injected tracer transport in the follicle and developing oocyte. *The Journal of experimental zoology*, 204(2), pp.193–217.
- El-Jouni, W. et al., 2005. Calcium signaling differentiation during *Xenopus* oocyte maturation. *Developmental biology*, 288(2), pp.514–25.
- Feske, S. et al., 2006. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*, 441(7090), pp.179–85.
- Feske, S. et al., 2005. A severe defect in CRAC Ca²⁺ channel activation and altered K⁺ channel gating in T cells from immunodeficient patients. *The Journal of experimental medicine*, 202(5), pp.651–62.

- Frischauf, I. et al., 2008. The STIM/Orai coupling machinery. *Channels (Austin, Tex.)*, 2(4), pp.261–8.
- Galán, C. et al., 2009. STIM1, Orai1 and hTRPC1 are important for thrombin- and ADP-induced aggregation in human platelets. *Archives of biochemistry and biophysics*, 490(2), pp.137–44.
- Gomez-Fernandez, C. et al., 2011. Calcium signaling in mouse oocyte maturation: the roles of STIM1, ORAI1 and SOCE. *Molecular Human Reproduction*, 18(4), pp.194–203.
- Graham, S.J.L., Dziadek, M.A. & Johnstone, L.S., 2011. A cytosolic STIM2 preprotein created by signal peptide inefficiency activates ORAI1 in a store-independent manner. *The Journal of biological chemistry*, 286(18), pp.16174–85.
- Gruszczynska-Biegala, J. et al., 2011. Differential Roles for STIM1 and STIM2 in Store-Operated Calcium Entry in Rat Neurons. *PloS one*, 6(4), p.e19285.
- Guttridge, K.L., Smith, L.D. & Miledi, R., 1995. Xenopus Gq alpha subunit activates the phosphatidylinositol pathway in Xenopus oocytes but does not consistently induce oocyte maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(5), pp.1297–301.
- Hartzell, H.C., 1996. Activation of different Cl currents in Xenopus oocytes by Ca liberated from stores and by capacitative Ca influx. *The Journal of general physiology*, 108(3), pp.157–75.
- Horinouchi, T. et al., 2012. Different binding property of STIM1 and its novel splice variant STIM1L to Orai1, TRPC3, and TRPC6 channels. *Biochemical and biophysical research communications*, 428(2), pp.252–8.
- Hoth, M. & Niemeyer, B.A., 2013. The neglected CRAC proteins: Orai2, Orai3, and STIM2. *Current topics in membranes*, 71, pp.237–71.
- Hoth, M. & Penner, R., 1992. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*, 355(6358), pp.353–6.
- Huang, G.N. et al., 2006. STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels. *Nature cell biology*, 8(9), pp.1003–10.
- Hulstrand, A.M., Schneider, P.N. & Houston, D.W., 2010. The use of antisense oligonucleotides in Xenopus oocytes. *Methods (San Diego, Calif.)*, 51(1), pp.75–81.

- Kar, P. et al., 2012. Different agonists recruit different stromal interaction molecule proteins to support cytoplasmic Ca²⁺ oscillations and gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(18), pp.6969–74.
- Klein, S.L. et al., 2002. Genetic and genomic tools for *Xenopus* research: The NIH *Xenopus* initiative. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 225(4), pp.384–91.
- Kline, D. & Nuccitelli, R., 1985. The wave of activation current in the *Xenopus* egg. *Developmental biology*, 111(2), pp.471–87.
- Kusano, K., Miledi, R. & Stinnakre, J., 1982. Cholinergic and catecholaminergic receptors in the *Xenopus* oocyte membrane. *The Journal of physiology*, 328, pp.143–70.
- Lewis, R.S., 2001. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annual review of immunology*, 19, pp.497–521.
- Lewis, R.S. & Cahalan, M.D., 1989. Mitogen-induced oscillations of cytosolic Ca²⁺ and transmembrane Ca²⁺ current in human leukemic T cells. *Cell regulation*, 1(1), pp.99–112.
- Li, Z. et al., 2007. Mapping the interacting domains of STIM1 and Orai1 in Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel activation. *The Journal of biological chemistry*, 282(40), pp.29448–56.
- Liao, Y. et al., 2009. A role for Orai in TRPC-mediated Ca²⁺ entry suggests that a TRPC:Orai complex may mediate store and receptor operated Ca²⁺ entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9), pp.3202–6..
- Liao, Y. et al., 2008. Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/Icrac channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8), pp.2895–900.
- Liou, J. et al., 2005. STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Current biology : CB*, 15(13), pp.1235–41.
- López, E. et al., 2012. Unraveling STIM2 function. *Journal of physiology and biochemistry*, 68(4), pp.619–33.
- López, J.J. et al., 2006. Interaction of STIM1 with endogenously expressed human canonical TRP1 upon depletion of intracellular Ca²⁺ stores. *The Journal of biological chemistry*, 281(38), pp.28254–64.

- Machaca, K. & Haun, S., 2002. Induction of maturation-promoting factor during *Xenopus* oocyte maturation uncouples Ca(2+) store depletion from store-operated Ca(2+) entry. *The Journal of cell biology*, 156(1), pp.75–85.
- Machaca, K. & Haun, S., 2000. Store-operated calcium entry inactivates at the germinal vesicle breakdown stage of *Xenopus* meiosis. *The Journal of biological chemistry*, 275(49), pp.38710–5.
- Masui, Y. & Clarke, H.J., 1979. Oocyte maturation. *International review of cytology*, 57, pp.185–282.
- Meyerhof, P.G. & Masui, Y., 1979. Properties of a cytostatic factor from *Xenopus laevis* eggs. *Developmental biology*, 72(1), pp.182–7.
- Miao, Y.-L. & Williams, C.J., 2012. Calcium signaling in mammalian egg activation and embryo development: the influence of subcellular localization. *Molecular reproduction and development*, 79(11), pp.742–56.
- Miledi, R., 1982. A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. Royal Society (Great Britain)*, 215(1201), pp.491–7.
- Miyazaki, S., 1995. Calcium signalling during mammalian fertilization. *Ciba Foundation symposium*, 188, pp.235–47; discussion 247–51.
- Müller, M.R. & Rao, A., 2010. NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. *Nature reviews. Immunology*, 10(9), pp.645–56.
- Mullins, F.M. et al., 2009. STIM1 and calmodulin interact with Orai1 to induce Ca2+-dependent inactivation of CRAC channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(36), pp.15495–500.
- Nebreda, A.R. & Ferby, I., 2000. Regulation of the meiotic cell cycle in oocytes. *Current opinion in cell biology*, 12(6), pp.666–75.
- Ni, Y., 1997. Efficient coupling of 5-HT1a receptors to the phospholipase C pathway in *Xenopus* oocytes. *Molecular Brain Research*, 51(1-2), pp.115–122.
- Oh-Hora, M. et al., 2008. Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance. *Nature immunology*, 9(4), pp.432–43.

- Oritani, K. & Kincade, P.W., 1996. Identification of stromal cell products that interact with pre-B cells. *The Journal of cell biology*, 134(3), pp.771–82.
- Pani, B. et al., 2009. Activation of TRPC1 by STIM1 in ER-PM microdomains involves release of the channel from its scaffold caveolin-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(47), pp.20087–92.
- Pani, B. et al., 2008. Lipid rafts determine clustering of STIM1 in endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions and regulation of store-operated Ca²⁺ entry (SOCE). *The Journal of biological chemistry*, 283(25), pp.17333–40.
- Parekh, A.B. and P.J.W.J., 2005. Store-Operated Calcium Channels. *Physiological Reviews*, 85, pp.757– 810.
- Parekh, A.B. and P.R., 1997. Store depletion and calcium influx. *Physiological reviews*, 77(4), pp.901–930.
- Parekh, A.B. & Penner, R., 1997. Store depletion and calcium influx. *Physiological reviews*, 77(4), pp.901–30.
- Park, C.Y. et al., 2009. STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell*, 136(5), pp.876–90.
- Parker, I., Gundersen, C.B. & Miledi, R., 1985. A transient inward current elicited by hyperpolarization during serotonin activation in *Xenopus* oocytes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. Royal Society (Great Britain)*, 223(1232), pp.279–92.
- Parker, I. & Miledi, R., 1986. Changes in intracellular calcium and in membrane currents evoked by injection of inositol trisphosphate into *Xenopus* oocytes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. Royal Society (Great Britain)*, 228(1252), pp.307–15.
- Parker, I. & Miledi, R., 1987. Inositol Trisphosphate Activates a Voltage-Dependent Calcium Influx in *Xenopus* Oocytes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 231(1262), pp.27–36.
- Parker, N.J. et al., 1996. Molecular cloning of a novel human gene (D11S4896E) at chromosomal region 11p15.5. *Genomics*, 37(2), pp.253–6.
- Parry, D.A.D., Fraser, R.D.B. & Squire, J.M., 2008. Fifty years of coiled-coils and alpha-helical bundles: a close relationship between sequence and structure. *Journal of structural biology*, 163(3), pp.258–69.

- Parvez, S. et al., 2008. STIM2 protein mediates distinct store-dependent and store-independent modes of CRAC channel activation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(3), pp.752–61.
- Petersen, C.C. & Berridge, M.J., 1994. The regulation of capacitative calcium entry by calcium and protein kinase C in *Xenopus* oocytes. *The Journal of biological chemistry*, 269(51), pp.32246–53.
- Preston, S.F., Sha'afi, R.I. & Berlin, R.D., 1991. Regulation of Ca²⁺ influx during mitosis: Ca²⁺ influx and depletion of intracellular Ca²⁺ stores are coupled in interphase but not mitosis. *Cell regulation*, 2(11), pp.915–25.
- Putney, J.W., 1986. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell calcium*, 7(1), pp.1–12.
- Putney, J.W., 2010. Pharmacology of store-operated calcium channels. *Molecular interventions*, 10(4), pp.209–18.
- Putney, J.W., 1976. Stimulation of ⁴⁵Ca influx in rat parotid gland by carbachol. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 199(3), pp.526–37.
- Putney, J.W. & Bird, G.S., 1993. The inositol phosphate-calcium signaling system in nonexcitable cells. *Endocrine reviews*, 14(5), pp.610–31.
- Qiao, F. & Bowie, J.U., 2005. The many faces of SAM. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, 2005(286), p.re7.
- Roos, J. et al., 2005. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *The Journal of cell biology*, 169(3), pp.435–45.
- Rothberg, B.S., Wang, Y. & Gill, D.L., 2013. Orai channel pore properties and gating by STIM: implications from the Orai crystal structure. *Science signaling*, 6(267), p.pe9.
- Sagata, N., 1997. What does Mos do in oocytes and somatic cells? *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 19(1), pp.13–21.
- Saldaña, C. et al., 2009. Native ion current coupled to purinergic activation via basal and mechanically induced ATP release in *Xenopus* follicles. *Journal of cellular physiology*, 218(2), pp.355–65.

- Skibinska-Kijek, A. et al., 2009. Immunolocalization of STIM1 in the mouse brain. *Acta neurobiologiae experimentalis*, 69(4), pp.413–28.
- Smith, L.D., 1989. The induction of oocyte maturation: transmembrane signaling events and regulation of the cell cycle. *Development (Cambridge, England)*, 107(4), pp.685–99.
- Smyth, J.T. et al., 2009. Phosphorylation of STIM1 underlies suppression of store-operated calcium entry during mitosis. *Nature cell biology*, 11(12), pp.1465–72.
- Soboloff, J. et al., 2006. Calcium signals mediated by STIM and Orai proteins--a new paradigm in inter-organelle communication. *Biochimica et biophysica acta*, 1763(11), pp.1161–8.
- Song, M.Y., Makino, A. & Yuan, J.X.-J., 2011. STIM2 Contributes to Enhanced Store-operated Ca Entry in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells from Patients with Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Pulmonary circulation*, 1(1), pp.84–94.
- Spassova, M.A. et al., 2006. STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca(2+) channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(11), pp.4040–5.
- Stathopoulos, P.B. et al., 2008. Structural and mechanistic insights into STIM1-mediated initiation of store-operated calcium entry. *Cell*, 135(1), pp.110–22.
- Stricker, S.A., 1999. Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals. *Developmental biology*, 211(2), pp.157–76.
- Sun, L. & Machaca, K., 2004. Ca(2+)(cyt) negatively regulates the initiation of oocyte maturation. *The Journal of cell biology*, 165(1), pp.63–75.
- Sun, S. et al., 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.
- Thiel M, Lis A, P.R., 2013. STIM2 drives Ca²⁺ oscillations through store-opera... [J Physiol. 2013] - PubMed - NCBI. *J Physiol*, pp.1433–45.
- Tigyi, G. et al., 1990. A serum factor that activates the phosphatidylinositol phosphate signaling system in *Xenopus* oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(4), pp.1521–5.

- Varga-Szabo, D. et al., 2008. Store-operated Ca²⁺ entry in platelets occurs independently of transient receptor potential (TRP) C1. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 457(2), pp.377–87.
- Vig, M. et al., 2006. CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca²⁺ entry. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5777), pp.1220–3.
- Williams, R.T. et al., 2001. Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins. *The Biochemical journal*, 357(Pt 3), pp.673–85.
- Williams, R.T. et al., 2002. Stromal interaction molecule 1 (STIM1), a transmembrane protein with growth suppressor activity, contains an extracellular SAM domain modified by N-linked glycosylation. *Biochimica et biophysica acta*, 1596(1), pp.131–7.
- Yao, Y. & Tsien, R., 1997. Calcium current activated by depletion of calcium stores in *Xenopus* oocytes. *The Journal of general physiology*, 109(6), pp.703–715.
- Yu, F., Sun, L. & Machaca, K., 2009. Orai1 internalization and STIM1 clustering inhibition modulate SOCE inactivation during meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(41), pp.17401–6.
- Yu, R. & Hinkle, P.M., 2000. Rapid turnover of calcium in the endoplasmic reticulum during signaling. Studies with cameleon calcium indicators. *The Journal of biological chemistry*, 275(31), pp.23648–53.
- Yuan JP, Zeng W, Huang GN, Worley PF, M.S., 2007. STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nature cell biology*, 9(6), pp.636–645.
- Zbidi, H. et al., 2011. STIM1 and STIM2 are located in the acidic Ca²⁺ stores and associates with Orai1 upon depletion of the acidic stores in human platelets. *The Journal of biological chemistry*.
- Zheng, L. et al., 2011. Auto-inhibitory role of the EF-SAM domain of STIM proteins in store-operated calcium entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(4), pp.1337–42.
- Zheng, L. et al., 2008. Biophysical characterization of the EF-hand and SAM domain containing Ca²⁺ sensory region of STIM1 and STIM2. *Biochemical and biophysical research communications*, 369(1), pp.240–6.

Zhou, Y. et al., 2009. The short N-terminal domains of STIM1 and STIM2 control the activation kinetics of Orai1 channels. *The Journal of biological chemistry*, 284(29), pp.19164–8.

Zweifach, A. & Lewis, R.S., 1993. Mitogen-regulated Ca²⁺ current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca²⁺ stores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(13), pp.6295–9.

Índice de figuras

Ilustración 1. Sistema de señalización de Ca^{2+}	3
Ilustración 2. Activación fisiológica de SOCE	6
Ilustración 3. Estructura y función de STIM	9
Ilustración 4. Activación del influjo de Ca^{2+}	16
Ilustración 5. Obtención e inyección de ovocitos	27
Ilustración 6. Técnica de control de voltaje	29
Figura 1. Expresión de los transcritos de STIM y su regulación por inyección de oligos antisentido	36
Figura 2. Expresión de proteínas STIM nativas en ovocito de <i>Xenopus</i>	37
Figura 3. Regulación de la expresión de las proteínas STIM por inyección de oligonucleótidos antisentido	38
Figura 4. Regulación de transcritos de STIM en ovocitos co-inyectados con ARNm de GPCR	40
Figura 5. Silenciamiento de las proteínas STIM no sufre cambio por co-inyección de oligos antisentido con ARNc GPCR	40
Figura 6. Resumen gráfico de la expresión de STIM en ovocitos por PCR y Western blot	41
Figura 7. Corrientes oscilatorias de Cl^- activadas por agonistas	43
Figura 8. Activación de respuesta T_{in} por estimulación aguda de agonista	44
Figura 9. Ca^{2+} -dependencia extracelular de la corriente T_{in}	45
Figura 10. Bloqueo de la corriente T_{in} por Lantánidos	46

Figura 11. Silenciamiento de STIM1 por inyección de as-STIM1, disminuye diferencialmente T_{in}	47
Figura 12. Activación o interacción diferencial de los GPCR con STIM1	48
Figura 13. Silenciamiento de STIM2 por la inyección de as-STIM2 y su efecto inhibitorio en la corriente T_{in}	50
Figura 14. Inyección de as-Cx38 no afecta la generación de T_{in}	52
Figura 15. Potenciación de T_{in} por inyección del anticuerpo COOH-STIM2	54
Figura 16. Activación de T_{in} por estimulación prolongada	56
Figura 17. Efecto de la inyección de as-STIM en GVBD y parámetros de la membrana celular durante la maduración inducida por progesterona en ovocitos	59
Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos antisentido	28
Tabla 2. Secuencias de cebadores para PCR	31

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Differential role of STIM1 and STIM2 during transient inward (T_{in}) current generation and the maturation process in the *Xenopus* oocyte

Barbara Serrano-Flores, Edith Garay, Francisco G Vázquez-Cuevas and Rogelio O Arellano*

Abstract

Background: The *Xenopus* oocyte is a useful cell model to study Ca^{2+} homeostasis and cell cycle regulation, two highly interrelated processes. Here, we used antisense oligonucleotides to investigate the role in the oocyte of stromal interaction molecule (STIM) proteins that are fundamental elements of the store-operated calcium-entry (SOCE) phenomenon, as they are both sensors for Ca^{2+} concentration in the intracellular reservoirs as well as activators of the membrane channels that allow Ca^{2+} influx.

Results: Endogenous STIM1 and STIM2 expression was demonstrated, and their synthesis was knocked down 48–72 h after injecting oocytes with specific antisense sequences. Selective elimination of their mRNA and protein expression was confirmed by PCR and Western blot analysis, and we then evaluated the effect of their absence on two endogenous responses: the opening of SOC channels elicited by G protein-coupled receptor (GPCR)-activated Ca^{2+} release, and the process of maturation stimulated by progesterone. Activation of SOC channels was monitored electrically by measuring the T_{in} response, a Ca^{2+} -influx-dependent Cl^{-} current, while maturation was assessed by germinal vesicle breakdown (GVBD) scoring and electrophysiology.

Conclusions: It was found that STIM2, but not STIM1, was essential in both responses, and T_{in} currents and GVBD were strongly reduced or eliminated in cells devoid of STIM2; STIM1 knockdown had no effect on the maturation process, but it reduced the T_{in} response by 15 to 70%. Thus, the endogenous SOCE response in *Xenopus* oocytes depended mainly on STIM2, and its expression was necessary for entry into meiosis induced by progesterone.

Keywords: SOCE, STIM1, STIM2, *Xenopus* oocyte, Ca^{2+} -entry, Maturation

Background

For approximately three decades, the *Xenopus* oocyte has been a useful cell model to determine the underlying mechanisms responsible for the increase of the cytoplasmic Ca^{2+} concentration through its release from intracellular reservoirs [1,2] and by calcium influx either through Ca^{2+} -dependent voltage-dependent channels or via store-operated Ca^{2+} (SOC) channels [3-5]. The latter results from the activation of the phenomenon known as store-operated Ca^{2+} entry (SOCE), which allows the replenishment of emptied reservoirs [5] after the stimulation of Ca^{2+} release through IP_3 /diacylglycerol synthesis by

phospholipase C (PLC). Release of Ca^{2+} from intracellular reservoirs and SOCE activation are common responses in the *Xenopus* oocytes since they endogenously express the machinery that activates PLC by stimulating endogenous G protein-coupled receptors (GPCR); cytoplasmic Ca^{2+} -increase, through either release or influx, opens Ca^{2+} -dependent Cl^{-} channels in the oocyte membrane generating conspicuous current responses [6]. SOCE activation in the membrane of the *Xenopus* oocyte was first detected by measuring the transient inward (T_{in}) current response [6] after Ca^{2+} release in the oocyte. The T_{in} response is generated by hyperpolarizing steps, and is mainly due to the Ca^{2+} -influx that subsequently opens Ca^{2+} -dependent Cl^{-} channels; this membrane response has been used as a reliable monitor of SOC channel activation [3,7].

* Correspondence: arellano.ostoa@comunidad.unam.mx
Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Boulevard Juriquilla 3001, Juriquilla Querétaro, Querétaro, C.P. 76230, Mexico

The SOCE current is most likely driven through Ca^{2+} -permeable channels formed by Orai, a channel activated by association with the stromal interaction molecule (STIM) [8], a protein that is localized mainly in the endoplasmic reticulum (ER) membrane and that senses the Ca^{2+} concentration in its lumen [9]. Although transcripts for endogenous Orai and STIM molecules have been reported in the oocyte [10], the role for the different types and isoforms of these proteins and their relation with endogenous responses in the oocyte have not been thoroughly studied; these issues are of interest given that the roles for the different SOC molecular elements are also incompletely understood, and their study in a well-known model such as the *Xenopus* oocyte might reveal important information.

Two STIM proteins, STIM1 and STIM2, are expressed in eukaryotic cells [11]. A different role for each of them has been proposed; for example, the ER Ca^{2+} content must be greatly reduced in order to activate STIM1 protein, while the more Ca^{2+} -sensitive STIM2 seems to require only a slight reduction in ER Ca^{2+} concentration [12-14]. It has been proposed that STIM2 participates in maintaining the cytoplasmic Ca^{2+} concentration [12-15]. Although the fundamental role of STIM1 in activating SOCE has been demonstrated in several cell types [16-18], other information indicates that STIM2 is the main protein involved in SOCE generation in neurons, dendritic cells, and mammary epithelial cells [19-21]. Thus, it is plausible that the specific functions of STIM1 and STIM2 depend on the cell type, their relative rates of expression, and other factors such as interactions among them or with regulatory proteins.

It has also been shown that during maturation, the Ca^{2+} -signaling pathway in the oocyte is significantly reconfigured, probably as part of the mechanism that prepares the gamete for fertilization and subsequent embryonic development. This reconfiguration includes Orai1 channels and STIM1, which are regulated during maturation thus eliminating the SOCE response [22-25]. Due to the importance of this phenomenon for cell cycle control in general, it is also of interest to explore the effects on oocyte maturation of altered STIM expression [26,27].

In the present study, we specifically knocked down STIM1 or STIM2 in the *Xenopus* oocyte to analyze the effect on two endogenous phenomena, the generation of the T_{in} current response (i.e., SOC channel activation) and the maturation process. We found that STIM2 expression was essential in both phenomena, while STIM1 expression was not.

Methods

Cell preparation

Xenopus laevis frogs were obtained from Xenopus I (Ann Arbor, MI, USA). Ovary lobules [28] were surgically

removed under sterile conditions from frogs that had been anaesthetized using 0.1% aminobenzoic acid ethyl ester and rendered hypothermic. After surgery, frogs were sutured and allowed to recover from anesthesia. Frogs were maintained for 3–7 days in individual tanks until healing was complete; they were then housed in larger groups, and no further oocytes were taken from them for at least 2 months. Procedures were approved by the institutional animal committees (INB-UNAM). The lobules were placed in sterile Barth's solution containing (in mM): 88 NaCl, 1 KCl, 2.4 NaHCO_3 , 0.33 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.41 CaCl_2 , 0.82 MgSO_4 , and 5 HEPES, with 75 $\mu\text{g/ml}$ gentamicin and adjusted to pH 7.4. Studies were carried out using oocytes at stage VI [29] dissected from the ovaries and defolliculated by collagenase (1 mg/ml) treatment at room temperature for 30 min in normal frog Ringer's solution (NR, containing in mM: 115 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl_2 , 5 HEPES, pH 7.0). After washing, the oocytes were stored at 18°C in sterile Barth's solution, and electrical recordings were performed over a period of 2–4 days in either uninjected oocytes or in those injected with cRNA for specific receptors and/or with antisense oligonucleotide to knock down specific proteins.

Reverse transcription polymerase chain reactions

Total RNA from the oocytes was purified using Trizol Reagent (Life Technologies). First-strand cDNA was synthesized using 2 μg of DNase-treated RNA as template and 1 μg of oligo (dT), 0.25 μg random hexamers, and reverse transcriptase. The cDNA was used as template in a polymerase chain reaction to amplify cDNA fragments for *stim1* and *stim2*, and the ribosomal protein S2 (*rps2*) was used as a control. All the PCR programs started at 95°C for 2 min. The amplification in the 35 cycles consisted in 45 s at 95°C, 40 s at 55°C, and 35 s at 72°C, and a final extension at 72°C for 5 min. The sequences of oligonucleotides used were: *stim1*, forward, 5'-CGACGAGTTTCT-CAGGGAAG-3' and reverse, 5'-CTTCATGTGGTCTC GGAGT-3'; *stim2*, forward, 5'-CCAGCCTTGAGGCAAT ATGT-3' and reverse, 5'-GCAACCTCCAACCTCCGATT A-3'; *rps2*, forward, 5'-TGGTAACAGGGGAGGTTTCC GC-3' and reverse, 5'-ATACCAGCCATCATGAGCAGC-3'.

The amplified products were isolated, purified (QIAEX II, QIAGEN, Hilden, Germany), and subcloned into the pJET 1.2 vector (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA). Finally, their nucleotide sequences were confirmed by Sanger sequencing (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems).

Western blot

Protein expression was assessed by Western blot in either control oocytes or in those injected with as-STIM1 or as-STIM2. For each group, 10 oocytes were homogenized 72 h post-injection in a buffer containing (in mM): 20

Tris-HCl pH 7.6, 1 EDTA pH 8, 80 sucrose, and 1X complete mini protease inhibitor (Hoffmann-La Roche, Switzerland). Then samples were centrifuged at 4°C and 500 rpm for 5 min, at 3500 rpm for 10 min, and at 14,000 rpm for 20 min. Subsequently, the final pellets were resuspended in 50 µl of buffer containing (in mM): 50 Tris-HCl pH 7.6, 1 EDTA pH 8, 100 NaCl, 100 MgCl₂, and 1X complete mini protease inhibitor. Total membrane protein concentration was quantified with a Bradford assay. For electrophoresis, samples (1.5 µg per lane) were fractionated in a 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred to a nitrocellulose membrane (BioRad, Hercules, CA, USA). Membranes were blocked for 1 h at room temperature in TBS-T solution (in mM): 150 NaCl, 20 Tris, pH 7.4, and 0.1% Tween 20, containing 5% nonfat dry milk and then incubated overnight at 4°C with a 1:1000 dilution of rabbit primary antibody. The antibody denoted NH-STIM1 (Alomone, Jerusalem, Israel) was directed against a region of the amino-terminus of the STIM1 protein, and the antibodies denoted NH-STIM2 (Alomone, Jerusalem, Israel) and COOH-STIM2 (ProSci Inc., Poway CA, USA) were against the amino and carboxy termini, respectively, of STIM2. Western blot analysis was also used to detect SERCA2 expression, used as a loading control (antibody from Cell Signaling Technology Inc. Danvers, MA, USA). After incubation, the membranes were washed with TBS-T and incubated for 45 min at room temperature with HRP-conjugated goat anti-rabbit antibody (Life Technologies) in TBS-T. The immunoreactive proteins were detected by chemiluminescence, and analyzed with ImageJ Software (NIH, USA); the results were normalized against the control condition and expressed in optical density units. To analyze loading controls such as SERCA2, the same membranes used to detect STIM proteins were incubated for 30 min in stripping solution (in mM): 50 Tris pH 6.8, 100 β-mercaptoethanol, and 2% SDS at 55°C and then washed twice with TBS-T. Then the membranes were treated with a primary antibody against the SERCA2 protein and finally with an HRP-conjugated goat anti-rabbit antibody (Life Technologies) in TBS-T and quantified as above.

Expression of purinergic and muscarinic receptors and transcript knockdown using antisense oligonucleotides in *Xenopus laevis* oocytes

In order to express the desired membrane receptors, cDNA coding for P2Y₂, P2Y₈, or M1 receptors were cloned into the plasmid pEXENEX1 and linearized with Sall or HindIII, then purified and transcribed to capped RNA with T7 polymerase using the mMESSAGE mMACHINE kit (Life Technologies CA, USA). Oocytes were injected with 25–50 ng of the respective cRNA (1 ng/nl). For purinergic receptors the P2Y₈ *Xenopus laevis* [cDNA clone

MGC: 52559, Source BioScience Nottingham, UK], and the P2Y₂ *Xenopus tropicalis* [cDNA clone IMAGE 5383884, ATCC Manassas, USA] subtypes were used, and for muscarinic receptors, the M1 subtype [human cDNA Clone ID IOH56940 (Life Technologies CA, USA)]. Another group was injected with 25–50 nl of H₂O for control experiments.

The antisense sequences were designed to target the initiation translation region, a strategy that has been successfully used in several experimental protocols; antisense oligonucleotide strongly inhibits mRNA expression via an RNase-H-dependent mechanism [30].

Expression of endogenous STIM1 or STIM2 was knocked down by the injection of 25–50 ng of antisense oligonucleotides with the following sequences: for antisense oligonucleotide STIM1 (as-STIM1), 5'-A TAGCAGAGTCCGACACCAAAGCATTCCGC-3', and for antisense oligonucleotide STIM2 (as-STIM2), 5'-TCC TCTTCTTCTTCTCCCGTTCATGGCTG-3'. Control experiments for antisense oligonucleotides were performed injecting (50 ng per oocyte) scrambled sequences for both as-STIM, and a second control for antisense oligonucleotide injection (as-Cx38) was made knocking down the expression of connexin 38 (Cx38) which was monitored measuring the I_c current in Ca²⁺-free Ringer solution [28], the sequence for as-Cx38 was: 5'-GCTTTAGTAATTCC CATCCTGCCATGTTTC-3'. In general, after injection, oocytes were incubated at 18°C in Barth's solution, and the effects of these procedures on protein expression and current responses were examined by biochemical and electrophysiological methods. Unless otherwise stated, groups of injected oocytes that were induced to express purinergic receptors were incubated in Barth's solution containing 5 U/ml apyrase to hydrolyze the ATP that is released from the oocyte into the medium, thus avoiding stimulation of purinergic receptors during the incubation period [31].

Electrophysiology

Oocyte membrane currents were monitored using the two-electrode voltage-clamp technique. The cells were continuously superfused (10 ml/min) with NR solution and held at -10 mV. Voltage steps to -100 mV with a duration of 4 s were applied every 40 s to activate the T_{in} current response, and the oocytes were stimulated for 120 s (acute protocol stimulation) with one of the agonists (100 µM ATP or ACh, or a 1:1000 dilution of FBS) added to the bath solution. For long-lasting stimulation, GPCR-expressing oocytes were incubated for 1–4 h with 1 µM agonist, and P2Y₈- or P2Y₂-expressing oocytes were incubated in medium devoid of apyrase; in this condition, endogenously released ATP activated the receptors in most cases.

Intra-oocyte injection of antibodies during electrophysiological recording was achieved by pneumatic pressure ejection from a third micropipette [32]. The injection micropipette was loaded with antibody dissolved in 5 mM HEPES, adjusted to pH 7.0 with KOH.

Oocyte maturation assays

Maturation studies were carried out on batches of 15–25 defolliculated oocytes, stage VI, incubated in 2 ml of Barth's solution plus 10 μ M progesterone. GVBD was scored by white-spot formation and confirmed by cutting the oocytes through the equator after incubating them in hot NR for 1 min [32]. Maturation was analyzed in groups of oocytes that had been injected 72 h earlier with as-STIM1 or as-STIM2, and they were compared with uninjected oocytes or those injected with H₂O. Electrical properties of oocytes from the different groups were analyzed after 9–12 h in the presence of progesterone.

Reagents

ATP, ACh, apyrase, collagenase type I, progesterone, FBS, and all salts were from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA).

Statistical analysis

All data are expressed as mean \pm SEM of at least 10–15 oocytes from three different frogs for each condition. Statistical analysis was performed using the Igor Pro Wavemetrics, Inc. software through analysis of variance (ANOVA). The means of two different experimental groups were compared using a Student's *t*-test. Differences were considered to be significant at $p < 0.01$.

Results

Expression of endogenous STIM1 and STIM2 in *Xenopus* oocytes

Expression of RNA transcripts *stim1* and *stim2* was determined in oocytes using RT-PCR. In RNA samples from

control (non-injected) oocytes (Figure 1A) the use of oligonucleotide primers for *stim1* resulted in an amplicon of 463 bp, while *stim2* primers amplified a fragment of 494 bp. Both had the expected size for the corresponding transcript, and the amplified fragments were then cloned into the pJET 1.2 vector, sequenced, and analyzed using BLAST. The sequences obtained were highly homologous to those reported for *stim1* (99%) from *Xenopus laevis* [GenBank: NM_001097037.1] and for *stim2* (90%) from *Xenopus tropicalis* [GenBank: XM_004916759.1] (Additional file 1). Control amplifications without RT or without a cDNA template did not produce any PCR products (Figure 1A). Groups of oocytes that had been injected 48–72 h earlier with either the as-STIM1 or the as-STIM2 oligonucleotide sequences showed a dramatic decrease in the corresponding transcripts.

To determine whether the injection of antisense oligonucleotides induced a parallel reduction in level of STIM1 and STIM2 proteins, these were evaluated using Western blot analysis with specific antibodies (Figures 1 and 2). As expected, NH-STIM1 detected a band above 75 KDa in total membrane fractions from control oocytes, and from the mouse brain (Figure 1B) [33,34]. Then, a group of oocytes injected with as-STIM1 was tested; as illustrated in Figure 1C, antisense-injected oocytes showed a significant STIM1 decrease compared to the control group.

Similarly, STIM2 was detected using two distinct antibodies, COOH-STIM2 (Figures 1B-C) and NH-STIM2, which revealed STIM2 as a band about 100 KDa, in both the total membrane preparation of control oocytes and in total protein from mouse brain, in agreement with previous reports [12,21]. Western blot analysis in oocytes injected with as-STIM2 indicated that antisense produced a large decrease in the amount of STIM2 as compared to control oocytes (Figure 1C).

These results showed that the antisense sequences used specifically decreased the endogenous transcripts for

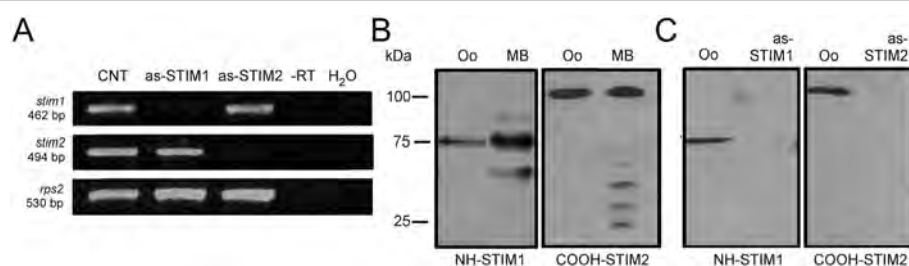
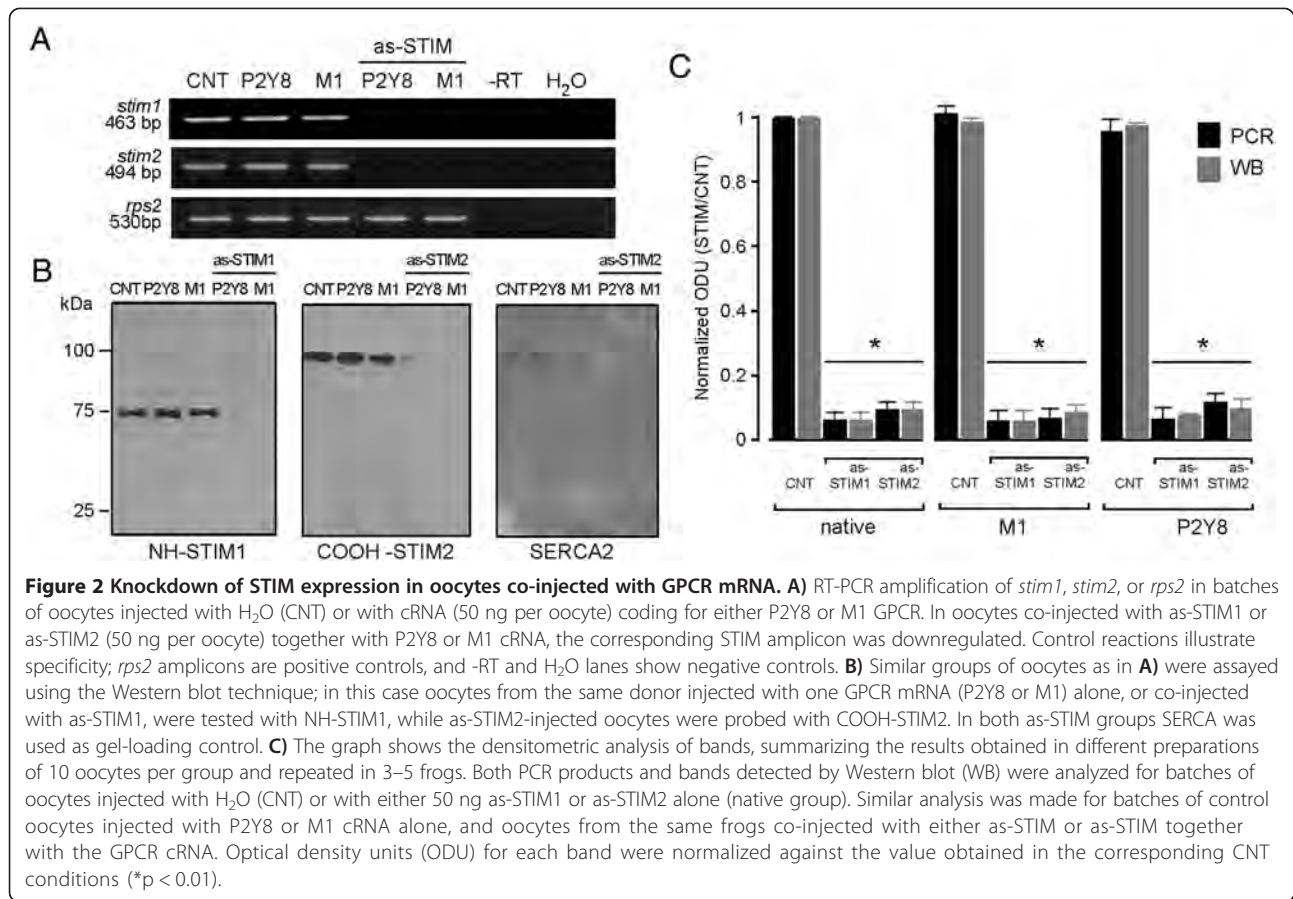


Figure 1 STIM expression in the *Xenopus* oocyte and its downregulation by as-STIM injection. **A)** shows the RT-PCR amplification of products that corresponded to the size expected for either *stim1* or *stim2* in native oocytes (CNT); the corresponding amplicons were absent in oocytes from the same batch that had been injected with either as-STIM1 or as-STIM2 48 h before the assay. The *rps2* amplicon indicates the reaction efficiency, and -RT and H₂O lanes correspond to negative controls, either RNA without RT, or to the reaction mix without a cDNA template, respectively. **B)** STIM1 and STIM2 were identified by Western blot analysis in protein extracts from oocytes (Oo) or mouse brain (MB, positive control) using either NH-STIM1 (left panel) or COOH-STIM2 (right panel) as antibody. **C)** A similar analysis as in **B)** was made for batches of oocytes injected with H₂O as control (CNT), or with as-STIM1 or as-STIM2 48 h before the protein extraction, in which cases proteins were eliminated. (in all cases 10 oocytes per condition).



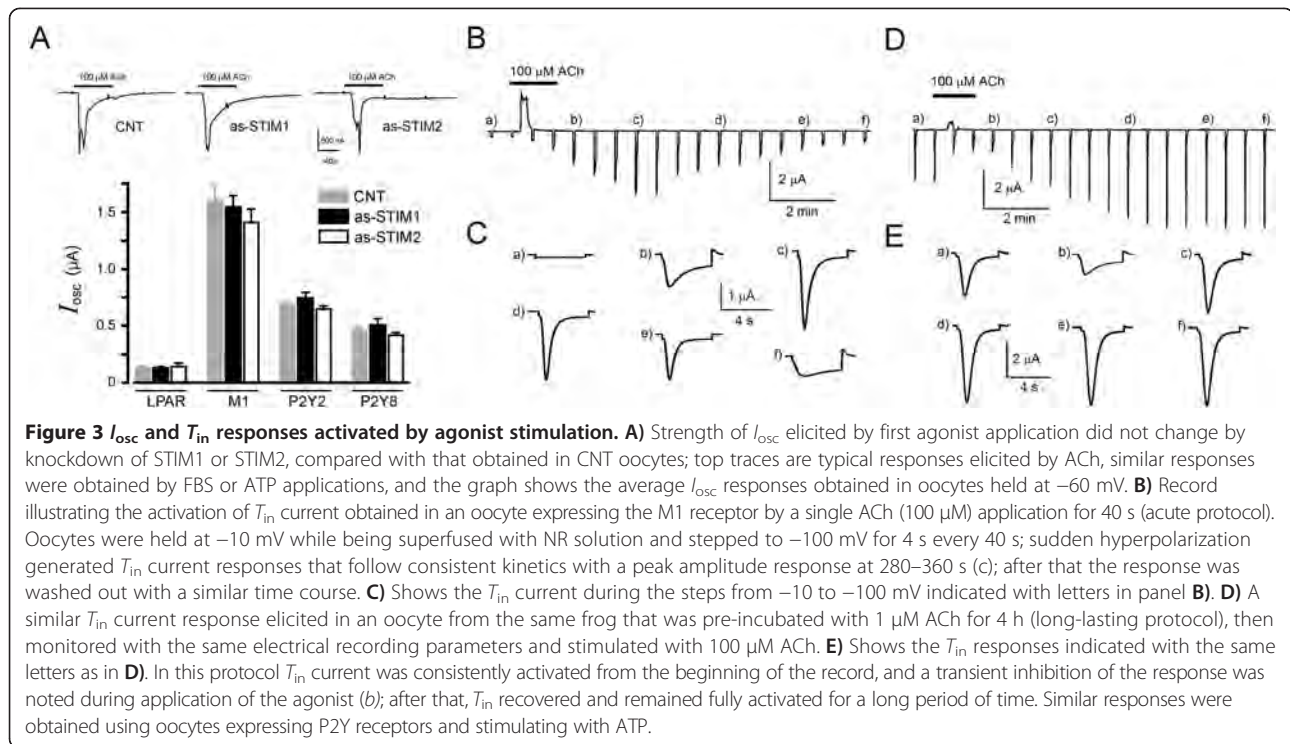
stim1 or *stim2*, with a concomitant depletion of STIM1 and STIM2 proteins.

STIM1 and STIM2 levels were decreased by injection of antisense-STIM sequences in oocytes co-expressing GPCR
 Most of the following experiments were made using oocytes exogenously expressing muscarinic or purinergic receptors due to injection of the respective cRNA in order to get a robust and consistent response; therefore, it was determined if GPCR expression affected either the endogenous expression of STIM or its decrease due to as-STIM injection. Seventy-two hours after injection with cRNA coding for GPCR, oocytes exhibited strong current responses in the presence of their respective agonists (see below); this GPCR expression did not affect the level of *stim1* or *stim2* transcripts, as illustrated in Figure 2A. Moreover, the decrease of *stim1* or *stim2* expression due to antisense injection was also not affected in oocytes that were co-injected with either P2Y8 or M1 receptor cRNA (Figure 2A). Consistent with this result, knockdown of neither STIM1 nor STIM2 protein was altered by co-injecting oocytes with cRNA to express GPCR, as shown in Figure 2B. In all cases, SERCA2 (114 KDa, used as the loading control) did not show significant changes in response to the various experimental conditions (Figure 2B).

The results obtained for all conditions described above are summarized in Figure 2C. Taken together, they confirm that antisense knockdown of endogenous STIM proteins in the oocyte was specific and effective and that this was not affected by simultaneous exogenous GPCR expression.

STIM protein knockdown did not affect the generation of the oscillatory Cl⁻ current induced by agonist

To evaluate the role of STIM1 and STIM2 in SOC current activation, we monitored the *T_{in}* response generation. Prior to this analysis we tested whether or not as-STIM injection affected the Ca²⁺-dependent Cl⁻ oscillatory current (*I_{osc}*) generated by the first application of one of the agonists (Figure 3A). For this, groups of oocytes were exposed to either FBS (stimulation of the endogenous LPA receptor (LPA)) [35], ACh, or ATP in order to monitor the *I_{osc}* amplitude, as a measure of the oocyte capacity to release Ca²⁺ from intracellular reservoirs [2,36-39]. *I_{osc}* elicited by FBS were recorded from native oocytes, and those generated by ACh or ATP were recorded from oocytes expressing M1 or P2Y receptors. The *I_{osc}* amplitude was then compared among control oocytes and oocytes co-injected with as-STIM1 or as-STIM2. The results showed no significant difference among the various groups



of oocytes tested for a particular agonist (Figure 3A), although average current amplitude was consistently smaller for LPAR stimulation, and larger for M1-stimulated responses. Together, these results showed that the injection of antisense oligonucleotides did not affect I_{osc} activation, strongly suggesting that the Ca^{2+} -release mechanism remained intact and showing that its strength was dependent on the receptor type stimulated.

Participation of STIM1 in T_{in} generation

To analyze the role of STIM1 and STIM2, T_{in} current was monitored by applying hyperpolarizing voltage steps of -90 mV every 40–60 s, from a holding potential of -10 mV (Figure 3B-E). As illustrated in Figure 3B, the T_{in} current amplitude generally increased after acute agonist application (either ATP, ACh, or FBS for 120 s), reached a peak after 400–480 s, and then slowly returned to basal levels after 680–800 s (65 oocytes, 12 frogs). Consistent with previous studies [6], T_{in} was a Cl^- current that was dependent on extracellular Ca^{2+} , and it was blocked by lanthanides with an IC_{50} for La^{3+} of 41 ± 0.21 nM and for Gd^{3+} of 7 ± 0.23 μM , potencies similar to those shown to block SOC channels in other studies [3,6,40].

Then the effect of as-STIM1 injection on T_{in} current generation (121 oocytes, 9 frogs) was assessed. In control oocytes, application of FBS (1:1000) elicited T_{in} current responses of 2.5 ± 0.28 μA (Figure 4A-B). However, in as-STIM1-injected oocytes, the average T_{in} generated was 0.92 ± 0.38 μA , which represented a decrease of $60 \pm 5.2\%$.

Similarly, oocytes exposed to $100 \mu\text{M}$ ACh (expressing M1 receptor) showed a $70 \pm 9.7\%$ decrease in T_{in} in the as-STIM1-injected group. However, oocytes expressing P2Y8 and exposed to $100 \mu\text{M}$ ATP exhibited a $20 \pm 1.4\%$ decrease in T_{in} and oocytes expressing P2Y2 exhibited a reduction of only $15 \pm 1.5\%$ (Figure 4B). The results clearly indicated that elimination of STIM1 did not cause a complete loss of the T_{in} response elicited by any of the agonists used.

STIM2 knockdown potently inhibited T_{in} generation regardless of the receptor stimulated

We next tested whether STIM2 knockdown affected T_{in} currents activated either by P2Y or M1 receptors with experiments similar to those described above. In contrast to what happened with STIM1 knockdown, as-STIM2 injection drastically reduced the T_{in} response elicited by the acute stimulation of any of the receptors tested (Figure 4C-D). T_{in} current amplitude was reduced by $96 \pm 6.6\%$ in oocytes stimulated with FBS, by $96 \pm 3.6\%$ with ACh, by $93 \pm 7.1\%$ with ATP for oocytes expressing P2Y8 receptors, and by $94 \pm 8\%$ for those expressing P2Y2. In this case, the amount of decrease observed did not differ among the receptors studied (Figure 4D). As shown above, it was evident that the decrease in the T_{in} response was not due to uncoupling of the $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ -release system since the oscillatory responses in all the oocyte groups remained unchanged.

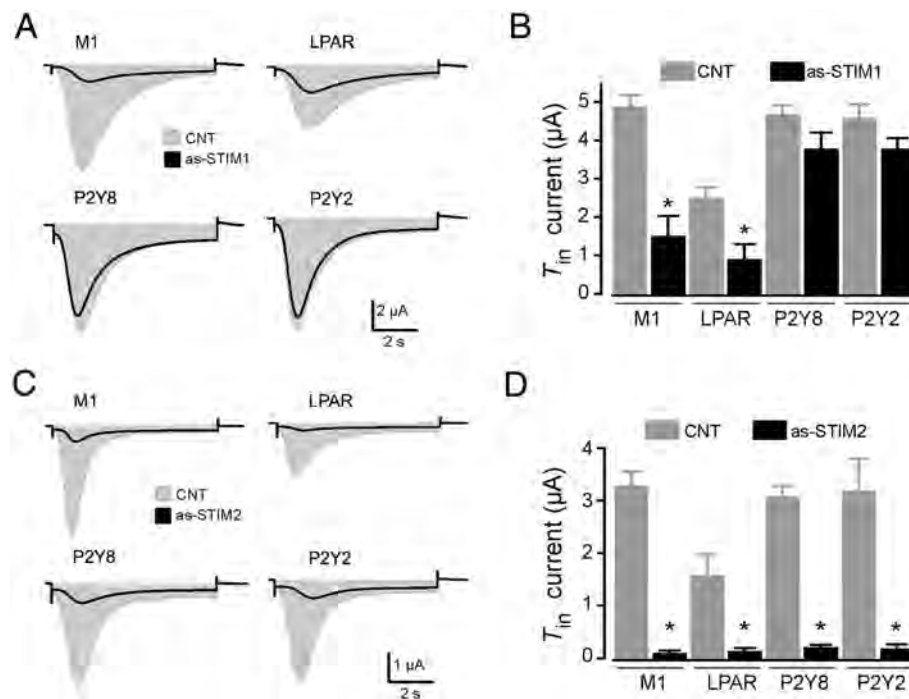


Figure 4 Specific STIM knockdown by oocyte injection of as-STIM differentially decreased the T_{in} current. **A)** Oocytes induced to express M1, P2Y8, or P2Y2 receptors were stimulated with either ACh or ATP (100 μ M), and LPAR in native oocytes were stimulated by FBS (1:1000 dilution); the resulting T_{in} currents (CNT, gray areas) were compared with the T_{in} obtained in oocytes from the corresponding group that were also injected with 50 ng as-STIM1 (superimposed black traces); all responses were monitored 48–72 h after oocyte injection. **B)** The graph shows the results obtained using the different experimental conditions illustrated in **A)**. **C)** In a set of experiments similar to those shown in **A)**, T_{in} currents were monitored, and the peak amplitudes of non-injected CNT oocytes were compared with those of oocytes injected (48–72 h before recording) with 50 ng as-STIM2 and stimulated with the agonists. **D)** The graph shows the results obtained using the different experimental conditions illustrated in **C)**. Bars correspond to the mean (\pm SEM) of the T_{in} peak amplitude of 10–15 oocytes from 5–6 frogs (* $p < 0.01$, as-STIM vs. CNT).

Control experiments were also made using scrambled oligonucleotide sequences as well as as-Cx38 a different antisense oligonucleotide sequence to rule out the possibility that injection *per se* yielded nonspecific results, in these cases no effects were observed on T_{in} current amplitude. For example, as-Cx38 was used to knockdown connexons formed by Cx38, whose opening by superfusion of Ca^{2+} -free Ringer's solution [28,32] results in a fast and reliable test for Cx38 expression. Thus, in control oocytes the I_c current response was elicited by superfusion of Ca^{2+} -free Ringer's solution ($3.06 \pm 0.16 \mu A$; 9 oocytes, 3 frogs) while in as-Cx38 injected oocytes the current response was eliminated. However, in the same oocytes from both groups, the T_{in} current amplitude was similar, regardless the membrane receptor stimulated, either M1 ($2.98 \pm 0.17 \mu A$ vs. $2.95 \pm 0.18 \mu A$) or P2Y8 ($3.14 \pm 0.14 \mu A$ vs. $3.15 \pm 0.15 \mu A$) (16 oocytes, 4 frogs).

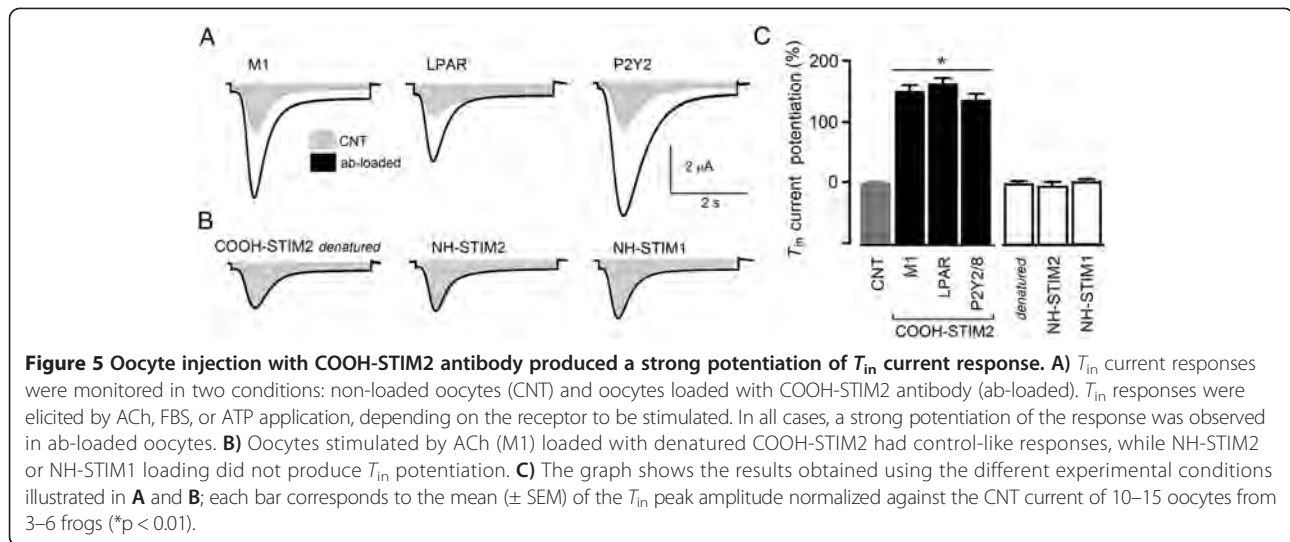
All together, these results indicate that T_{in} generation in the *Xenopus* oocyte requires STIM2 protein.

COOH-STIM2 antibody enhances the T_{in} current response

Envisioning that specific binding of antibody to STIM1 or STIM2 might affect the function of these proteins

and then serve as a specific tool to evaluate the involvement of STIM in a particular response, we tested the same antibodies used in the Western blot for their effect on T_{in} generation. For this purpose, antibodies were microinjected into the oocyte cytoplasm to reach a final dilution of 1:1000. Figure 5 shows that ACh application onto oocytes pre-loaded with COOH-STIM2 resulted in a robust potentiation of the T_{in} response, increasing the amplitude by $158 \pm 25\%$ (15 oocytes, 5 frogs). COOH-STIM2 injection also potentiated by $168 \pm 30\%$ the T_{in} responses elicited by FBS, and a similar effect was observed in oocytes stimulated through the P2Y8 ($126 \pm 37\%$) or the P2Y2 receptor ($129 \pm 23\%$) (Figure 5). However, in oocytes ($n = 22$) from the same frogs that were injected with denatured COOH-STIM2 (incubated for 10 min at $70^\circ C$), T_{in} potentiation was completely abolished (Figure 5B). Also, injection of NH-STIM1 or NH-STIM2 antibody did not produce any changes in the T_{in} response, nor did the injection of a P2Y2 antibody.

All these results clearly indicated that the COOH-STIM2 antibody specifically potentiated the T_{in} current, regardless of the receptor stimulated.



Role of STIM1 and STIM2 during long-lasting agonist stimulation

The following experiments were designed to explore the possibility that STIM1 and STIM2 have different effects, depending on the duration of the stimulus. Thus, oocytes injected with as-STIM1 or with as-STIM2 and expressing M1, P2Y8, or P2Y2 receptors were incubated for 1–4 h in the presence of their respective agonists at 1 μ M (Figure 3D-E). Extended agonist incubation generated strong T_{in} currents that remained stable for more than the 60-min recording time, even under constant superfusion of the oocytes with NR solution, and it began to decrease after 120–180 min of wash; we assumed that in this condition the SOC machinery was over-stimulated, and that the time spent in the activated state reflected the time necessary to refill the reservoirs.

In the oocytes knocked down for STIM1, T_{in} currents activated by long-lasting stimulation with any of the agonists analyzed were no different from those observed in control oocytes. In contrast, in oocytes injected with as-STIM2 and expressing P2Y or M1 receptors that had been stimulated for long intervals with their respective agonists, the T_{in} current was no longer generated (10–15 oocytes in each group, 5 frogs), strongly suggesting that STIM2 in the oocyte was essential for responses generated through both the acute and long-lasting stimulation protocols.

STIM proteins and the maturation process

During the maturation process, molecular elements that control the Ca^{2+} dynamics in the *Xenopus* oocyte undergo an important reconfiguration; this observation has been extended to different species, and similar changes are known to occur during mitosis [23,31,41]. Given the importance of these events for cell cycle control, we asked whether or not the knockdown of STIM proteins affected

the maturation process. Thus, batches of control oocytes, and those that were injected with as-STIM1 or as-STIM2 were assayed 48–72 h after injection with 10 μ M progesterone in Barth's solution to induce maturation. Oocyte maturation entry was scored by the appearance of GVBD after 8–12 h in the presence of progesterone. The GVBD score obtained was compared against progesterone-treated control oocytes. The results are illustrated in Figure 6A; as-STIM1-injected oocytes did not show any effect on the efficiency of maturation, while STIM2 knockdown produced a strong inhibition of the process (the experiment was repeated in oocytes from 3 different donors). Lack of GVBD in as-STIM2-injected oocytes seemed to indicate a failure to enter meiosis and a consequent incomplete maturation process; this interpretation was also supported by monitoring electrophysiological parameters in all of the groups tested. As illustrated in Figure 6B-C, electrical parameters of as-STIM2-injected oocytes (progesterone-treated) were different from those displayed by as-STIM1-injected oocytes and control oocytes maintained in progesterone for the same period of time.

Taken together, these results clearly showed that in oocytes where STIM2 was knocked down, the process of maturation was inhibited at some early point. The first manifestation of this was the complete blockage of GVBD, i.e., of the signal for meiosis entry; this result was clearly different from that observed in STIM1-deprived oocytes.

Discussion

Here, using biochemical strategies and electrophysiology, we studied what effects the knockdown of endogenous STIM proteins had on two important *Xenopus* oocyte responses: the activation of SOCE monitored by measuring T_{in} current generation, and the maturation process induced by progesterone. We found that: *i*) Both STIM1

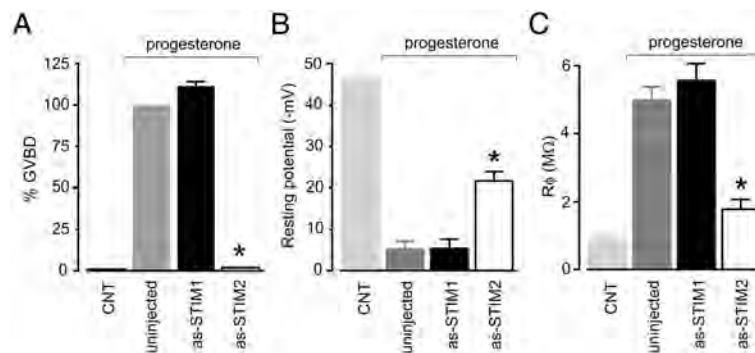


Figure 6 Effect of as-STIM2 on GVBD and oocyte membrane characteristics during maturation induced by progesterone. **A)** The maturation process promoted by progesterone (10 μ M) was analyzed in uninjected oocytes, or in oocytes injected 72 h prior to the assay with either as-STIM1 or as-STIM2, and compared with control oocytes in the absence of progesterone. GVBD was quantified after 8–12 h in presence of progesterone (10 oocytes per group, repeated using 3 different frogs) and is normalized against the value observed in uninjected oocytes. **B)** Resting membrane potential was monitored 8–12 h after addition of progesterone in the same groups of oocytes (n = 3–5, repeated in 3 frogs) as in **A)**. **C)** The input membrane resistance (R_{ϕ}) was estimated over the range from -80 to -20 mV in the different oocyte groups treated in the same conditions. Control groups, without progesterone, included both uninjected and antisense-injected oocytes. In all cases, values for as-STIM2-injected groups were different from as-STIM1-injected or uninjected groups (* $p < 0.01$).

and STIM2 proteins were endogenously expressed in the *Xenopus* oocyte; *ii*) Injection of antisense oligonucleotide sequences of STIM1 or STIM2 potentially knocked down the expression of both the corresponding mRNA and the protein; *iii*) STIM1 or STIM2 knockdown did not seem to affect the Ca^{2+} -signaling machinery responsible for generating oscillatory Ca^{2+} -signals in the oocyte; *iv*) STIM2, but not STIM1, proved to be fundamental for T_{in} current generation; this was observed both in acute stimulation protocols or after long-lasting stimulation periods, and it did not depend on the receptor type stimulated; *v*) STIM2 protein knockdown blocked entry into the process of maturation induced by progesterone, while STIM1 elimination did not affect this process; and *vi*) an antibody against the COOH terminus of STIM2 potentiated T_{in} current generation.

Calcium release and influx are two phenomena well studied in the *Xenopus* oocyte. The main subject addressed here is the identity and role of STIM proteins during calcium influx stimulated through endogenous responses. It is known that after GPCR stimulation, both endogenous as well as exogenously expressed GPCR generate in the oocyte mainly two Ca^{2+} -dependent Cl^{-} ion currents, one due to intracellular Ca^{2+} release that is normally followed by another current dependent on Ca^{2+} influx; this pattern is generated through an enzymatic cascade involving IP_3 synthesis, a common mechanism in most cell systems [1]. Following the original nomenclature, in the oocyte the first response is named I_{osc} , while the second generates the T_{in} current response [6]. The Ca^{2+} -influx magnitude is directly related to the amplitude of Ca^{2+} -release; the main molecular element responsible for this linkage is the STIM protein, since it is the Ca^{2+} -sensor within the Ca^{2+} reservoir. As in previous

studies [8,42,43], to monitor the $[Ca^{2+}]_i$ increase produced by both mechanisms in the oocyte, here we used the Ca^{2+} -dependent Cl^{-} current as an endogenous sensor whose amplitude accurately reflects the concentration of Ca^{2+} beneath the plasmatic membrane. This is especially true for Ca^{2+} influx, since this occurs in the plasma membrane where the Ca^{2+} -dependent Cl^{-} channels are co-expressed with the SOC channels responsible for the influx. Thus, monitoring an endogenous Ca^{2+} sensor such as the Cl^{-} channel offers not only spatial and temporal advantages, but also amplifies the normally small Ca^{2+} current through SOC channels and avoids altering the Ca^{2+} dynamics with further pharmacological manipulations. STIM protein expression and function was then studied in the *Xenopus* oocyte using this tool.

It is well known that when Ca^{2+} is released from the ER, STIM proteins are activated, rapidly translocated, and oligomerized into junctions formed between the ER and the plasma membrane, where they bind to and activate highly selective Ca^{2+} channels formed by Orai proteins that allow Ca^{2+} influx [44,45]. The main trigger for this phenomenon is a decrease in ER Ca^{2+} content; however, evidence indicates that isoforms of STIM2 protein might maintain a basal activation of Orai channels without prior Ca^{2+} release, thereby controlling the cytoplasmic Ca^{2+} concentration [12,46]. The ratio of STIM1 to STIM2 expression seems to depend on the cell type, and perhaps on the pathophysiological state; as shown here for the *Xenopus* oocyte, other cells such as T cells, myoblasts, skeletal muscle, and liver cells also co-express both STIM proteins [20,47–49]. Studies to distinguish the roles of STIM1 and STIM2 in various cells have employed diverse silencing strategies and overexpression. The injection of an antisense oligonucleotide sequence for each STIM

protein was chosen here for its simplicity and because it excludes potential non-specific effects caused by protein over-expression. The effect of antisense injection on STIM expression was demonstrated by analyzing both its mRNA and protein expression by RT-PCR and Western blot, respectively. This analysis demonstrated that expression of STIM1 or STIM2 was strongly down-regulated in oocytes injected with the corresponding antisense oligonucleotide sequence. This antisense effect was not affected by co-expression of GPCR proteins, used experimentally to stimulate Ca^{2+} -release. Also, it was shown that STIM protein knockdown did not affect the IP_3 increase and subsequent Ca^{2+} release, as indicated by the I_{osc} amplitude responses evoked at the beginning of each experiment by acute application of one of the agonists studied. In addition, preliminary results using RT-PCR showed amplification of transcripts for Orai1 and Orai2 in the oocyte (not shown).

Oocytes injected with either antisense STIM1 or STIM2 were then monitored to analyze their ability to generate T_{in} current using two stimulation protocols. In the first, acute application of the agonist produced the typical I_{osc} response; in control conditions it was followed by T_{in} generation that declined after 680–800 s. In the second protocol, long-lasting (1–4 h) stimulation of control oocytes with a low concentration of agonist (1 μM) gave strong T_{in} current responses that remained active for 60–180 min, even in constant superfusion with NR solution. A possible explanation for this difference in response kinetics is that prolonged stimulation produced a stronger activation of the SOCE mechanism, probably due to a more marked decrease in ER Ca^{2+} concentration. Both protocols were applied in oocytes in which STIM1 or STIM2 expression had been eliminated. The STIM2 knockdown produced a severe decrease in T_{in} current generation (93 - 100%) in both stimulation protocols, indicating that STIM2 was indispensable to induce the T_{in} current response. Using acute receptor stimulation, elimination of STIM1 caused a smaller but significant decrease in T_{in} current generation thus, STIM2 alone was unable to support full T_{in} activation during acute stimulation, suggesting that an association of STIM2 with STIM1 was necessary in order to activate the endogenous response. Also it was observed that STIM1 requirement seemed to be minor during P2Y purinergic stimulation, this difference cannot be explained by the amplitudes of I_{osc} generated by the agonists, given that ACh and LPA were the more and less effective, respectively, in generating the response, and both agonists showed similar patterns of T_{in} decrease by STIM1 knockdown. Thus, this result might indicate some type of molecular specificity, perhaps intrinsic to the molecules involved or as a consequence of their differential expression and localization in the oocyte membrane. Differential insertion

of several proteins expressed in the oocyte membrane has been demonstrated; thus, membrane domains with greater expression of STIM2 together with P2Y receptors are plausible.

A central role for STIM2 protein in SOCE generation has been shown before in some cell types such as neurons [20,50] and dendritic cells [19]; however, there is no information indicating whether or not the expression of STIM1 might affect the full endogenous response in these cases. For example, it has been shown the essential role of STIM2 in SOCE activation in dendritic spines [50], which was not substituted by overexpression of STIM1. The authors concluded that this is due to differences in STIM- Ca^{2+} sensitivity and subcellular localization of the proteins. In many other cell systems, co-participation or complementary roles for the two STIM proteins have been postulated [15,48]. Finally, when the oocytes were stimulated using the long-lasting protocol, elimination of STIM1 had no effect indicating that, in this case, the T_{in} current was activated by STIM2 alone. The central role for STIM2 is supported by the latter result as well as by the finding that injecting the antibody (COOH-STIM2) against STIM2 specifically increased the current amplitude by more than 100%, regardless of the agonist used to generate the T_{in} response. It is known that the COOH region, in both STIM1 and STIM2, contains the domain necessary to interact and activate the SOC channel formed by Orai [44]. Thus, a potentiating effect of the COOH-STIM2 antibody indicates that the strength of the STIM2-Orai interaction might be regulated, either positively or negatively, through a site that is affected by the antibody, indirectly confirming the central role of STIM2 during T_{in} generation. As expected given the STIM structure proposed, the two antibodies that recognized domains close to the amino-terminus had no effect on the T_{in} response.

Significant inhibition of the maturation process was observed in oocytes devoid of STIM2 protein. Here, we provided clear-cut evidence of STIM2 involvement during or in preparation for maturation, since its absence eliminated the process of GVBD. Once again, this result contrasted with the lack of effect in STIM1-knockdown oocytes, whose maturation was similar to that of control oocytes. Indeed, it has been shown that the function of STIM1 is downregulated during the maturation process, which contributes to elimination of the SOC response in *Xenopus* oocytes [22-24]; a similar condition has been shown in the mammalian oocyte [25], although in the latter this phenomenon remains controversial [51]. There is no previous information regarding the effect produced by lack (or overexpression) of STIM2 during maturation either in frog or mammalian oocytes, as most previous studies focused on the role of STIM1. However, mouse oocyte is known to express STIM2 protein in the ER; during maturation, STIM2 re-localizes from a homogeneous

distribution to one closer to the meiotic spindles, suggesting a role during this process [52]. In frog, is possible that the inhibitory effect of STIM2 knockdown was unrelated to its role in SOCE activation, since meiosis entry in *Xenopus* does not require Ca^{2+} -influx [42]. Further studies will be necessary to characterize the level at which the lack of STIM2 had such a dramatic effect on the maturation process, and to determine if it might have more general implications. One possibility is that as-STIM2 might cause downregulation of a STIM2 isoform different from that involved in SOCE activation. Another possibility relates to its role regulating cytoplasmic $[\text{Ca}^{2+}]$, in which case as-STIM2 might affect the activation of Ca^{2+} -dependent processes required prior to meiosis entry.

Conclusion

In this study, STIM2 is fundamental for the endogenous SOC response in the oocyte, although an association with STIM1 seemed to be necessary for its full generation. The mechanism responsible for the clear dependence of meiosis entry on STIM2 expression is a fundamental question that remains open, and its elucidation might help to understand the function of STIM proteins in the *Xenopus* oocyte and in other cell types as well.

Additional file

Additional file 1: BLAST analysis for the amplified sequences of stim1 and stim2. Alignment produced by BLAST for the amplified sequences of stim1 (stim1X1a) (Panel A) and stim2 (stim2X1) (Panel B) with the sequences reported for stim1X1 (GenBank accession number NM_001097037.1) and stim2Xt (GenBank accession number XM_004916759.1), respectively.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author's contributions

B.S.-F. performed experiments, collected data, provided input in data analysis and was involved in drafting the manuscript. F.G.V.-C. and E. G. performed experiments and provided substantial input in design and interpretation of data. R.O.A. designed research, performed experiments and drafted the manuscript. All authors gave final approval to the version to be published.

Acknowledgments

The author's thank to Dr. Dorothy D. Pless for editing the manuscript. We also thank Mr. Horacio Ramírez Leyva, M. en C. Leonor Casanova, Ing. Ramón Martínez Olvera, and ISC Omar González Hernández, for their expert technical assistance. B.S.-F. as a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas at Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) is grateful that she received fellowship 215719 from CONACyT-México. R.O.A. received grants by CONACyT-México 82340 and PAPIIT-UNAM-México IN205312, lastly, F.G.V.-C. is grateful for the grants received by CONACyT-México No. 166725 and PAPIIT-UNAM-México No. IN205114.

Received: 1 July 2014 Accepted: 29 October 2014

References

1. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD: The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000, **1**:11–21.
2. Parker I, Miledi R: Changes in intracellular calcium and in membrane currents evoked by injection of inositol trisphosphate into *Xenopus* oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1986, **228**:307–315.
3. Yao Y, Tsien R: Calcium current activated by depletion of calcium stores in *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol* 1997, **109**:703–715.
4. Hartzell HC: Activation of different Cl^- currents in *Xenopus* oocytes by Ca^{2+} liberated from stores and by capacitative Ca^{2+} influx. *J Gen Physiol* 1996, **108**:157–175.
5. Parekh AB, Penner R: Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev* 1997, **77**:901–930.
6. Parker I, Gundersen C, Miledi R: A transient inward current elicited by hyperpolarization during serotonin activation in *Xenopus* oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1985, **223**:279–292.
7. Sun L, Machaca K: Ca^{2+} (cyt) negatively regulates the initiation of oocyte maturation. *J Cell Biol* 2004, **165**:63–75.
8. Williams RT, Manji SS, Parker NJ, Hancock MS, Van Stekelenburg L, Eid JP, Senior PV, Kanzenwadel JS, Shandala T, Saint R, Smith PJ, Dziadek MA: Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins. *Biochem J* 2001, **357**:673–685.
9. Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV, Ohlsen K, Lioudyno M, Zhang S, Safrina O, Kozak JA, Wagner SL, Cahalan MD, Velicheli G, Stauderman KA: STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca^{2+} channel function. *J Cell Biol* 2005, **169**:435–445.
10. Klein SL, Strausberg RL, Wagner L, Pontius J, Clifton SW, Richardson P: Genetic and genomic tools for *Xenopus* research: The NIH *Xenopus* initiative. *Dev Dyn* 2002, **225**:384–391.
11. Soboloff J, Rothberg BS, Madesh M, Gill DL: STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012, **13**:549–565.
12. Brandman O, Liou J, Park WS, Meyer T: STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca^{2+} levels. *Cell* 2007, **131**:1327–1339.
13. Frischauf I, Schindl R, Derler I, Bergsmann J, Fahrner M, Romanin C: The STIM/Orai coupling machinery. *Channels (Austin)* 2008, **2**:261–268.
14. López E, Salido GM, Rosado JA, Berna-Ero A: Unraveling STIM2 function. *J Physiol Biochem* 2012, **68**:619–633.
15. Gruszczynska-Biegala J, Pomorski P, Wisniewska MB, Kuznicki J: Differential roles for STIM1 and STIM2 in store-operated calcium entry in rat neurons. *PLoS One* 2011, **6**:e19285.
16. Stiber J, Hawkins A, Zhang ZS, Wang S, Burch J, Graham V, Ward CC, Seth M, Finch E, Malouf N, Williams RS, Eu JP, Rosenberg P: STIM1 signalling controls store-operated calcium entry required for development and contractile function in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 2008, **10**:688–697.
17. Varga-Szabo D, Authi KS, Braun A, Bender M, Ambily A, Hassock SR, Gudermann T, Dietrich A, Nieswandt B: Store-operated Ca^{2+} entry in platelets occurs independently of transient receptor potential (TRP) C1. *Pflugers Arch* 2008, **457**:377–387.
18. Zhang SL, Yu Y, Roos J, Kozak JA, Deerinck TJ, Ellisman MH, Stauderman KA, Cahalan MD: STIM1 is a Ca^{2+} sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca^{2+} store to the plasma membrane. *Nature* 2005, **437**:902–905.
19. Bandyopadhyay BC, Pingle SC, Ahern GP: Store-operated Ca^{2+} signaling in dendritic cells occurs independently of STIM1. *J Leukoc Biol* 2010, **89**:57–62.
20. Berna-Ero A, Braun A, Kraft R, Kleinschnitz C, Schuhmann MK, Stegner D, Wultsch T, Eilers J, Meuth SG, Stoll G, Nieswandt B: STIM2 regulates capacitive Ca^{2+} entry in neurons and plays a key role in hypoxic neuronal cell death. *Sci Signal* 2009, **2**:ra67.
21. Song MY, Makino A, Yuan JX-J: STIM2 Contributes to enhanced store-operated Ca^{2+} entry in pulmonary artery smooth muscle cells from patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ* 2011, **1**:84–94.
22. El-Jouni W, Jang B, Haun S, Machaca K: Calcium signaling differentiation during *Xenopus* oocyte maturation. *Dev Biol* 2005, **288**:514–525.
23. Machaca K, Haun S: Induction of maturation-promoting factor during *Xenopus* oocyte maturation uncouples Ca^{2+} store depletion from store-operated Ca^{2+} entry. *J Cell Biol* 2002, **156**:75–85.
24. Yu F, Sun L, Machaca K: Orai1 internalization and STIM1 clustering inhibition modulate SOCE inactivation during meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**:17401–17406.

25. Cheon B, Lee H-C, Wakai T, Fissore RA: **Ca²⁺ influx and the store-operated Ca²⁺ entry pathway undergo regulation during mouse oocyte maturation.** *Mol Biol Cell* 2013, **24**:1396–1410.
26. Abdullaev IF, Bisailon JM, Potier M, Gonzalez JC, Motiani RK, Trebak M: **Stim1 and Orai1 mediate CRAC currents and store-operated calcium entry important for endothelial cell proliferation.** *Circ Res* 2008, **103**:1289–1299.
27. El Boustany C, Katsogiannou M, Delcourt P, Dewailly E, Prevarskaya N, Bprpwiec AS, Capiod T: **Differential roles of STIM1, STIM2 and Orai1 in the control of cell proliferation and SOCE amplitude in HEK293 cells.** *Cell Calcium* 2010, **47**:350–359.
28. Arellano RO, Robles-Martínez L, Serrano-Flores B, Vázquez-Cuevas F, Garay E: **Agonist-activated Ca²⁺ influx and Ca²⁺-dependent Cl⁻ channels in *Xenopus* ovarian follicular cells: functional heterogeneity within the cell monolayer.** *J Cell Physiol* 2012, **227**:3457–3470.
29. Dumont JN: **Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals.** *J Morphol* 1972, **136**:153–179.
30. Hulstrand AM, Schneider PN, Houston DW: **The use of antisense oligonucleotides in *Xenopus* oocytes.** *Methods* 2010, **51**:75–81.
31. Saldaña C, Garay E, Rangel GE, Reyes LM, Arellano RO: **Native ion current coupled to purinergic activation via basal and mechanically induced ATP release in *Xenopus* follicles.** *J Cell Physiol* 2009, **218**:355–365.
32. Arellano RO, Woodward RM, Miledi R: **A monovalent cationic conductance that is blocked by extracellular divalent cations in *Xenopus* oocytes.** *J Physiol* 1995, **484**:593–604.
33. Galán C, Zbidi H, Bartegi A, Salido GM, Rosado JA: **STIM1, Orai1 and hTRPC1 are important for thrombin- and ADP-induced aggregation in human platelets.** *Arch Biochem Biophys* 2009, **490**:137–144.
34. López JJ, Salido GM, Pariente JA, Rosado JA: **Interaction of STIM1 with endogenously expressed human canonical TRP1 upon depletion of intracellular Ca²⁺ stores.** *J Biol Chem* 2006, **281**:28254–28264.
35. Tigyí G, Dyer D, Matute C, Miledi R: **A serum factor that activates the phosphatidylinositol phosphate signaling system in *Xenopus* oocytes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, **87**:1521–1525.
36. Miledi R, Parker I: **Chloride current induced by injection of calcium into *Xenopus* oocytes.** *J Physiol* 1984, **357**:173–183.
37. Nomura Y, Kaneko S, Kato K, Yamagishi S, Sugiyama H: **Inositol phosphate formation and chloride current responses induced by acetylcholine and serotonin through GTP-binding proteins in *Xenopus* oocyte after injection of rat brain messenger RNA.** *Brain Res* 1987, **388**:113–123.
38. Oron Y, Dascal N, Nadler E, Lupu M: **Inositol 1,4,5-trisphosphate mimics muscarinic response in *Xenopus* oocytes.** *Nature* 1985, **313**:141–143.
39. Takahashi T, Neher E, Sakmann B: **Rat brain serotonin receptors in *Xenopus* oocytes are coupled by intracellular calcium to endogenous channels.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987, **84**:5063–5067.
40. Putney JW: **Pharmacology of store-operated calcium channels.** *Mol Interv* 2010, **10**:209–218.
41. Preston SF, Sha'afi RI, Berlin RD: **Regulation of Ca²⁺ influx during mitosis: Ca²⁺ influx and depletion of intracellular Ca²⁺ stores are coupled in interphase but not mitosis.** *Cell Regul* 1991, **2**:915–925.
42. Petersen CC, Berridge MJ: **The regulation of capacitative calcium entry by calcium and protein kinase C in *Xenopus* oocytes.** *J Biol Chem* 1994, **269**:32246–32253.
43. Parker I, Ivorra I: **Characteristics of membrane currents evoked by photoreleased inositol trisphosphate in *Xenopus* oocytes.** *Am J Physiol* 1992, **263**:C154–C165.
44. Cahalan MD: **STIMulating store-operated Ca²⁺ entry.** *Nat Cell Biol* 2009, **11**:669–677.
45. Rothberg BS, Wang Y, Gill DL: **Orai channel pore properties and gating by STIM: implications from the Orai crystal structure.** *Sci Signal* 2013, **6**:pe9.
46. Hoth M, Niemeyer BA: **The neglected CRAC proteins: Orai2, Orai3, and STIM2.** *Curr Top Membr* 2013, **71**:237–271.
47. Oh-Hora M, Yamashita M, Hogan PG, Sharma S, Lamperti E, Chung W, Prakriya M, Feske S, Rao A: **Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance.** *Nat Immunol* 2008, **9**:432–443.
48. Kar P, Bakowski D, Di Capite J, Nelson C, Parekh AB: **Different agonists recruit different stromal interaction molecule proteins to support cytoplasmic Ca²⁺ oscillations and gene expression.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, **109**:6969–6974.
49. Darbellay B, Arnaudeau S, Ceroni D, Bader C, Koning S, Bernheim L: **Human muscle economy myoblast differentiation and excitation-contraction coupling use the same molecular partners, STIM1 and STIM2.** *J Biol Chem* 2010, **285**:22437–22447.
50. Sun S, Zhang H, Liu J, Popugaeva E, Xu NJ, Feske S, White CL, Bezprozvanny I: **Reduced synaptic STIM2 expression and impaired store-operated calcium entry cause destabilization of mature spines in mutant presenilin mice.** *Neuron* 2014, **82**:79–93.
51. Gomez-Fernandez C, Lopez-Guerrero AM, Pozo-Guisado E, Álvarez IS, Matín-Romero FJ: **Calcium signaling in mouse oocyte maturation: the roles of STIM1, ORAI1 and SOCE.** *Mol Hum Reprod* 2012, **18**:194–203.
- Miao Y-L, Williams CJ: **Calcium signaling in mammalian egg activation and embryo development: the influence of subcellular localization.** *Mol Reprod Dev* 2012, **79**:742–756.
- Miao Y-L, Williams CJ: **Calcium signaling in mammalian egg activation and embryo development: the influence of subcellular localization.** *Mol Reprod Dev* 2012, **79**:742–756.

doi:10.1186/s12899-014-0009-x

Cite this article as: Serrano-Flores et al.: Differential role of STIM1 and STIM2 during transient inward (I_T) current generation and the maturation process in the *Xenopus* oocyte. *BMC Physiology* 2014 **14**:9.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

